

**Molekularepidemiologische Analyse Vancomycin- und
Linezolid-resistenter Enterokokken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Frank Sebastian Fröschen

aus Bonn

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dominik Wolf

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.12.2016

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie
Direktor: Prof. Dr. med. Achim M. Hörauf

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	7
1.1	Die Gattung <i>Enterococcus</i>	7
1.1.1	Natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen	8
1.1.2	Bedeutung von Enterokokken als Infektionserreger	9
1.2	Allgemeine Prinzipien der antibiotischen Behandlung	10
1.2.1	Glykopeptid-Antibiotika	12
1.2.2	Oxazolidione	13
1.2.3	Resistenzen der Enterokokken gegen Glykopeptid-Antibiotika	14
1.2.4	Linezolidresistenz bei Enterokokken	16
1.3	Zielsetzung	18
2.	Material und Methoden.....	19
2.1	Laborgeräte	19
2.2	Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien	20
2.3	Antibiotika, Nährmedien, Chemikalien, Materialien und Medienzusätze	21
2.4	Methoden der Keimidentifizierung	21
2.5	Methoden der Resistenzprüfung.....	22
2.5.1	E-Test.....	22
2.5.2	Übernachtkultur (ÜNK)	22
2.5.3	Selektivagar	23
2.6	Herstellung von Lysaten	23
2.7	Molekularbiologische Methoden	23
2.7.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.7.1.1	Quantitative Real-time PCR (Echtzeit-PCR).....	25
2.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.9	Herstellung von Kontrollplasmiden	29
2.9.1	Restriktionsverdau des Plasmids und des Inserts	30
2.9.2	Dephosphorylierung des Vektors.....	31
2.9.3	Ligation	31
2.9.4	Transformation von <i>E. Coli</i> mit rekombinierten Plasmiden	32
2.9.5	Kontrolle der Klonierung	33
2.10	Methoden zur Typisierung	33
2.11	Verwendete EDV	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Molekulare Epidemiologie der Vancomycinresistenz bei Enterokokken am KMV.....	36
3.1.1	Lokale Epidemiologie	36
3.1.2	Genotypische Resistenzanalyse.....	38
3.1.2.1	Etablierung der VanA/VanB-PCR	38
3.1.2.2	Verteilung der VanA/VanB positiven VRE in den Kliniken	42
3.1.3	Molekulare Typisierung der VRE	45
3.1.3.1	Etablierung der rep-PCR zur Typisierung der Enterokokken.....	45

3.1.3.2	Typisierung ausgewählter VRE-Erstisolate und Korrelation mit der VanA/VanB-PCR.....	46
3.1.3.3	Clusteranalyse durch Nachverfolgung von Patientenbewegungen.....	49
3.1.3.4	Typisierung der VRE des Kontrollkollektivs und Korrelation mit der VanA/VanB-PCR	52
3.1.3.5	Klinikübergreifende Analyse der Typisierung der VRE	53
3.2	Linezolid-resistente Enterokokken am KMV	55
3.2.1	Überprüfung der Enterokokken auf Linezolidresistenz	55
3.2.2	Überprüfung der molekularen Ursache für die Linezolidresistenz	57
3.2.3	Molekulare Typisierung der Linezolid-resistenten Enterokokken.....	58
4.	Diskussion	59
4.1	VRE am KMV	59
4.1.1	Epidemiologie und Genotypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken am KMV	59
4.1.2	Molekulare Typisierung von Enterokokkenisolaten.....	68
4.1.2.1	Analyse der klinikbezogenen Typisierung.....	71
4.1.2.2	Präventive Maßnahmen zur Verhinderung von Transmissionen	74
4.2	Linezolid-resistente Enterokokken am KMV	76
4.2.1	Molekulare Typisierung Linezolid-resistenter Enterokokken.....	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Anhang	84
6.1	Tabellenverzeichnis.....	90
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	92
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AFLP	amplified fragment-length polymorphism
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST	antibiotic susceptibility testing
bp	Basenpaar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Lactamases
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GOD	Intensivstation des neurologischen Rehabilitationszentrum Godeshöhe in Bonn (Teil des KMV)
h	Stunden
IMC	intermediate care
IMMIP	Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn
ITC	intensive care
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
KBE	koloniebildende Einheit
KMV	untersuchtes Klinikum der Maximalversorgung
l	Liter
LB	lysogeny broth
mA	Milliampere
Med. I	Medizinische Klinik und Poliklinik I des KMV

MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
MKG	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
MKO	Medizinische Klinik und Poliklinik III des KMV
MKP	Medizinische Klinik und Poliklinik II des KMV
MRE	multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
neg.	negativ
ng	Nanogramm
NRZ	Nationales Referenzzentrum
PCR	Polymerasekettenreaktion
pos.	positiv
RE	Restriktionsenzym
rep-PCR	repetitiv-sequenced-based PCR
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV	Restriktionsverdau
s	Sekunden
S.	<i>Staphylokokkus</i>
UKB	Universitätsklinikum Bonn
µl	Mikroliter
V	Volt
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VSE	Vancomycin-sensible Enterokokken
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Enterococcus*

Enterokokken zählen zur normalen Darmflora des Menschen, sowie verschiedener Tiere z. B. Säugetiere oder Fische (Werner et al., 2008b). Diese fakultativ pathogenen Mikroorganismen machen ungefähr 1-5 % der residenten, physiologischen Darmflora aus und wurden lange Zeit als nur bedingt pathogen eingeschätzt. Das Vorkommen von *E. faecium* in Stuhlproben wird mit 10^5 bis 10^6 koloniebildenden Einheiten (KBE)/g Stuhl und 10^4 bis 10^5 KBE/g Stuhl für *E. faecalis* angegeben (Fisher und Phillips, 2009; Klare et al., 2012b).

Bei Enterokokken handelt es sich um Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokkenbakterien mit einer Unempfindlichkeit gegenüber Gallensalzkonzentrationen von 40 %. Des Weiteren zeichnet sie eine unvollständige Hämolyse (α -Hämolyse) aus.

Enterokokken sind zudem gegen Austrocknung resistent und überleben selbst auf abiotischen Oberflächen, wodurch unzureichende Flächendesinfektion ebenso wie direkter Stuhl- und Hautkontakt oder damit in Kontakt gekommenes medizinisches Personal als Risikofaktor für Übertragungen zwischen Patienten gelten (Klare et al., 2012b).

Dennoch sind Enterokokken mittlerweile die dritthäufigste Bakteriengattung, welche für nosokomiale Infektionen verantwortlich ist (Werner et al., 2008a; Klare et al., 2012b; Gastmeier et al., 2014). Als Risikofaktoren für die Besiedlung oder Infektion mit Enterokokken gelten Vancomycingabe, Immunsuppression, sowie vermehrte Klinikaufenthalte, wie dies häufig bei älteren Patienten der Fall ist (Mutters et al., 2013).

Aus klinischer bzw. humanmedizinischer Sicht haben von den derzeit 37 verschiedenen Enterokokkenspezies *E. faecium* und *E. faecalis* die größte humanmedizinische Bedeutung (RKI, 2010). Die Mehrzahl der durch Enterokokken in deutschen bzw. europäischen Krankenhäusern verursachten Infektionen wird hierbei durch *E. faecalis* (60-95 %) verursacht, dementsprechend kann *E. faecium* nur für 5-40 % der Infektionen verantwortlich gemacht werden (Klare et al., 2012b). In diesem Zusammenhang lässt sich ein Anstieg der durch *E. faecium* verursachten Infektionen beobachten (Klare et al., 2012b). Hierbei muss besonders auf den Unterschied zwischen Infektion und Kolonisation hingewiesen werden. Letztere ist deutlich häufiger (Klare et al., 2012b).

Dennoch ist immer an die Möglichkeit zu denken, dass eine Kolonisation zu einer Infektion bzw. einer Sepsis führen kann, insbesondere bei stammzelltransplantierten Patienten (Weinstock et al., 2007).

Von durch *E. faecium* bedingten Infektionen sind oft Patienten mit schweren Grund-
leiden betroffen (z. B.: Immunsuppression), da *E. faecium* ein geringeres Virulenz-
potential als *E. faecalis* besitzt (Werner et al., 2008b).

1.1.1 Natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen

Beeinflusst wird die oben erwähnte Häufigkeit der Enterokokkenarten durch das jeweilige Krankenhaus mit seinem entsprechenden Patientengut und dem jeweils vorherrschenden, mit dem Einsatz von Antibiotika korrelierenden Selektionsdruck. Insbesondere Krankenhäuser mit hämatologisch/onkologischem, neonatologischem, urologisch/nephrologischem oder transplantationsmedizinischem Schwerpunkt oder Mängeln in den Hygienemaßnahmen sind Risikobereiche für Infektionen bzw. Neukolonisationen von Patienten.

Wichtig ist hierbei, dass die Gattung *Enterococcus* viele natürliche und je nach Isolat auch erworbene Resistenzen gegen Antibiotika besitzt. Diese sind in der folgenden Tab. 1 aufgelistet.

Durch den Einsatz von Antibiotika, die viele Erreger treffen, aber Enterokokken auf Grund ihrer Resistenzen nicht („Enterokokkenlücke“), kann es zu einer Selektion entsprechender Stämme kommen. In diesem Zusammenhang sind auch Resistenzen gegen modernere Antibiotika wie neuere Cephalosporine zu erwähnen (RKI, 2010).

Enterokokken haben heutzutage gegen fast alle Chemotherapeutika Resistenzen entwickelt und somit ihr natürliches Resistenzspektrum deutlich erweitert (Werner et al., 2008b; RKI, 2010; Klare et al., 2012b), sodass eine Infektion für Patienten schwerwiegende Folgen haben kann.

Die Therapie einer Infektion mit Enterokokken erfolgt üblicherweise mit Penicillinen bzw. bei schweren Infektionen durch eine Kombination von Penicillin mit einem Aminoglykosid-Antibiotikum (z. B. Gentamicin), um durch Synergie einen bakteriziden Effekt zu erzielen. Liegt eine Resistenz gegen eines dieser beiden Pharmaka vor, versagt der synergistische Effekt. Das Mittel der Wahl ist in einem solchen Fall in der Regel ein

Glykopeptid-Antibiotikum, das Vancomycin oder alternativ Teicoplanin (Klare et al., 2012b).

Tab. 1: Natürliche und erworbene Resistenzen der Gattung *Enterococcus* (modifiziert nach Werner et al., 2008b; Klare et al., 2012b). Aufgelistet ist die Substanzklasse, sowie Antibiotika dieser Klasse gegen die Enterokokken natürliche oder erworbene Resistenzen besitzen können.

Substanzklasse	Natürliche (intrinsische) Resistenzen	Erworbene (extrinsische) Resistenzen
Penicilline	Semisynthetische Penicilline (Oxacillin, Flucloxacillin)	Ampicillin (vor allem <i>E. faecium</i> ; selten <i>E. faecalis</i>)
Cephalosporine	Alle Cephalosporine	
Glykopeptide	Vancomycin (Low-level-Resistenzen: <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>)	Glykopeptide (vor allem <i>E. faecium</i> , seltener <i>E. faecalis</i>)
Lincosamide	Lincosamide (<i>E. faecalis</i>)	
Streptogramine	Streptogramine (Quinupristin/Dalfopristin: nur <i>E. faecalis</i>)	Streptogramine (Quinupristin/Dalfopristin: <i>E. faecium</i>)
Makrolide		Makrolide
Tetracykline		Tetracykline inclusive neuer Glycylcycline (Tigecyclin)
Aminoglykoside	Aminoglykoside (Low-level-Resistenzen)	Aminoglykoside (High-level-Resistenzen)
Oxazolidionen		Linezolid
Cloramphenicol		Cloramphenicol
Chinolone		Fluorchinolone
Mupirocin	Mupirocin (nur <i>E. faecalis</i>)	

1.1.2 Bedeutung von Enterokokken als Infektionserreger

Enterokokken verursachen endogene Infektionen, d. h. von der besiedelnden Flora ausgehende Infektionen (Werner et al., 2008b). Der Pathogenitätswert der Enterokokken wird widersprüchlich diskutiert (Klare et al., 2012b). Die Bedeutung des Nachweises von Enterokokken in polymikrobiellen Wundinfektionen ist weitgehend ungeklärt (Werner et al., 2008b). Auch ihre Rolle bei Gallenwegsinfektionen ist noch weitgehend unbekannt. Dennoch wurden Enterokokken in mehreren Studien auf Gallenwegsstenosen nachgewiesen. Teilweise stellten sie die häufigste nachgewiesene Bakterienspezies auf diesen dar (Schneider et al., 2014). Die klinische Bedeutung dieses Nachweises ist

momentan noch umstritten (Rerknimitr et al., 2002; Basioukas et al., 2014; Schneider et al., 2014).

Viele Harnwegsinfektionen oder noch schwerwiegendere Infektionen, wie zum Beispiel die Sepsis oder Endokarditiden werden durch Enterokokken verursacht, obwohl sie als Normalflora den Körper kolonisieren und bei ihnen nur wenige Pathogenitätsfaktoren beschrieben sind.

Prädisponiert für Enterokokkeninfektionen sind Patienten mit Fremdkörpern z. B. künstliche Herzklappen, Harnwegskatheter oder zentralvenösen Zugängen, da Enterokokken sehr gute Biofilmbildner sind.

Biofilme können Enterokokken vor der Phagozytose, sowie Antibiotika schützen und eine Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen begünstigen. Somit kommt der Biofilmbildung eine bedeutende Rolle im Rahmen einer Infektion zu (Paganelli et al., 2012).

An der Bildung dieser mehrschichtigen Biofilme sind bei Enterokokken eine Vielzahl von Genen beteiligt, von denen viele erst in den letzten Jahren entdeckt wurden. Bis heute sind über 30 verschiedene an der Biofilmbildung beteiligte Gene z. B. *esp* bekannt (Paganelli et al., 2012).

Aus diesem Grunde besitzen Enterokokken eine wichtige Bedeutung bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen, zu deren häufigsten die von Biofilmen auf ZVK, Prothesen, künstlichen Herzklappen und Harnwegskathetern ausgehenden Infektionen zählen.

1.2 Allgemeine Prinzipien der antibiotischen Behandlung

Zur Behandlung von bakteriellen Infektionen stehen heute eine Vielzahl von Pharmaka zur Verfügung. Zwischen älteren Substanzen wie Vancomycin, welche bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts auf den Markt gekommen sind und den neueren Substanzen wie Linezolid mit einer Markteinführung um die Jahrtausendwende, kann der klinisch tätige Arzt auswählen.

Hierbei muss neben der aktuellen Erkrankung des Patienten immer auch ein Augenmerk auf die bestehenden Begleiterkrankungen, die betroffenen Organe, Allergien, Immunsuppression, besondere Begleitumstände z. B. Schwangerschaft und nicht zuletzt auf das Lebensalter gelegt werden.

Jedes Arzneimittel hat bestimmte Eigenschaften in Bezug auf seine Wirkweise, sowie seine Pharmakokinetik im Körper des Patienten.

Auch auf die Darreichungsform bzw. die Durchführbarkeit des Applikationsschemas muss, besonders im ambulanten Bereich, geachtet werden.

Zuletzt muss der das Antibiotikum verschreibende Arzt noch den zu erwartenden Erreger bzw. das erwartete Erregerspektrum mit der entsprechenden Resistenzlage beachten und berücksichtigen bzw. einschätzen, ob die bisherige Therapie oder die geplante Therapie zum gewollten Ziel, einer mikrobiologisch nachgewiesenen Erregerfreiheit, führen kann.

Hierbei muss eine Gradwanderung vollführt werden zwischen einer Breitspektrumtherapie bei lebensbedrohlichen Infektionen, einer kalkulierten empirischen Therapie je nach zu erwartendem Erregerspektrum und klinischem Bild des Patienten bei akuten Infektionen und einer gezielten Therapie, spezifisch auf den entsprechenden Erreger zugeschnitten, bei subakuten/chronischen Infektionen. Da der Resistenzstatus des Infektionserregers initial oft unbekannt ist, kommen häufig Reserveantibiotika zum Einsatz.

Generell gilt, dass eine antibiotische Therapie, wenn realisierbar, immer möglichst spezifisch auf den die Infektion verursachenden Erreger zugeschnitten sein sollte (Schmalspektrumtherapie). Diese Anpassung kann aber erst nach Bekanntwerden des Infektionserregers sowie seines Resistenzspektrums erfolgen (Deeskalation).

Nichtsdestotrotz führt jede antibiotische Behandlung zu einem Selektionsdruck auf den Erreger und damit zu der Gefahr der Entwicklung von Resistenzen, sowie der Selektion dieser resistenten Bakterien mit anschließender Unwirksamkeit des eingesetzten Pharmakons.

In letzter Zeit hat die Bedeutung der Antibiotika zugenommen. Eine Ursache hierfür ist eine alternde Gesellschaft mit einem zunehmenden Risiko für Infektionen, welches mit zunehmender Länge des Krankenhausaufenthaltes ansteigt, sowie die zunehmende Zahl von (iatrogen) immunsupprimierten Patienten. Unter Berücksichtigung der gerade genannten Gründe, insbesondere der zunehmenden Dauer des Krankenhausaufenthalts, kommt der nosokomialen Infektion eine besondere Bedeutung zu.

Nosokomiale Infektion

Die nosokomiale Infektion bezeichnet eine lokale oder systemische Reaktion des Organismus auf eine Infektion mit exo- oder endogenen Krankheitserregern, für welche kein Hinweis bei Aufnahme in das Krankenhaus bestanden hat bzw. welche sich zum Aufnahmezeitpunkt noch nicht in der Inkubationsphase befand (RKI, 2011). Infektionen, welche während des Krankenhausaufenthaltes (z. B. nach den ersten 48 Stunden für Harnwegsinfektionen (Definition der Centers for Disease Control and Prevention)) erworben und erst nach dessen Ende manifest werden, zählen ebenfalls zu den nosokomialen Infektionen (RKI, 2011). Dabei erfolgt im § 2 IfSG keine eindeutige Definition eines festgelegten Zeitintervalls, ab welchem Tag des Krankenhausaufenthaltes eine Infektion als nosokomial gilt (IfSG, 2015). Grundlage hierfür sind die unterschiedlichen Inkubationszeiten der einzelnen Erreger. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, hat das CDC Richtlinien erarbeitet, welche Kriterien (z. B. klinischer Befund, Ergebnisse von Laboruntersuchungen, sonstige diagnostische Maßnahmen) für einzelne Infektionen erfüllt sein müssen, damit von einer nosokomialen Infektion gesprochen werden kann (RKI, 2011).

1.2.1 Glykopeptid-Antibiotika

Der bekannteste Vertreter der Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika ist das Vancomycin. Es wurde bereits in der Mitte des letzten Jahrhunderts entwickelt, die Markteinführung in Deutschland fand im November 1980 statt (Griffith, 1984; Levine, 2006). Im Ausland wurde es bereits 1973 zur Therapie eingesetzt (Hawley und Gump, 1973).

Der Wirkmechanismus basiert auf der nicht-kovalenten Bindung von Substraten der Zellwandbiosynthese in eine für D-Alanyl-D-Alanin sehr spezifische dreidimensionale Tasche des großen Glykopeptidmoleküls mit anschließender sterischer Behinderung der weiteren Zellwandbiosynthese (Reynolds, 1989).

Typische Indikationen sind schwere Infektionen durch Gram-positive Kokken, Enterokokken oder die nach vorheriger Antibiotikatherapie durch das Toxin des *Clostridium difficile* hervorgerufene pseudomembranöse Kolitis.

Kontraindikationen für den Einsatz sind bestehende Vorerkrankungen des Ohrs und der Niere, da Vancomycin oto- und nephrotoxisch sein kann (Stahlmann et al., 2009).

Eine orale Aufnahme des Pharmakons für eine systemische Wirkung ist zudem nicht möglich, da keine Resorption im Darm stattfindet. Die Elimination erfolgt überwiegend renal, bei einer Halbwertszeit (HWZ) von 6 Stunden (h) mit der Möglichkeit einer Akkumulation bei entsprechend reduzierter glomerulärer Filtrationsrate (GFR). Zudem ist Vancomycin kaum liquorgängig und erreicht nur sehr geringe Spiegel im Knochen (Stahlmann et al., 2009).

Durch die hohe Anzahl der Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) sollte der Einsatz dieses Reserveantibiotikums nur gut überlegt erfolgen, um den Selektionsdruck zu reduzieren und eine hohe VRE-Inzidenz zu vermeiden (Klare et al., 2012b).

1.2.2 Oxazolidione

Das erste Antibiotikum dieser neuen Stoffklasse ist das Linezolid. Sein Wirkmechanismus basiert auf einer Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese über eine Inhibition der Bildung des Initiationskomplexes, welcher aus der ribosomalen 30S Untereinheit, mRNA, den Initiationsfaktoren IF1, IF2, IF3, sowie GTP besteht (Swaney et al., 1998). Somit besitzt es eine bakteriostatische Wirkung gegen Entero- und Staphylokokken. Aufgrund dieses Wirkmechanismus kann sich eine Kreuzresistenz mit anderen Antibiotika zumindest theoretisch nicht entwickeln (Fines und Leclercq, 2000; Eich und Krähenbrühl, 2002).

Die Indikation für den Einsatz ist die Behandlung von multiresistenten Gram-positiven Erregern. Die Wirksamkeit von Linezolid gegen VRE, MRSA, Methicillin-resistente, koagulase-negative Staphylokokken ist nachgewiesen, sodass es unter diesen Indikationen häufig eingesetzt wird (Clemett und Markham, 2000; Rybak et al., 2000; Eich und Krähenbrühl, 2002).

Zur Zeit kann Linezolid oral und intravenös appliziert werden, die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 100 %, die maximale Serumkonzentration (C_{max}) wird nach 1-2 Stunden erreicht und die HWZ beträgt 5 Stunden (Eich und Krähenbrühl, 2002). Die Wasserlöslichkeit ist im Bereich pH 5-9 gleichbleibend, die Ausscheidung erfolgt zu 78 % renal in unveränderter bzw. in Form der beiden Hauptmetabolite (Sörgel et al., 2004).

Als häufigste Nebenwirkungen werden Diarrhöen und Thrombozytopenie bzw. eine reversible Knochenmarksuppression beschrieben (Clemett und Markham, 2000; Eich und Krähenbrühl, 2002).

1.2.3 Resistenzen der Enterokokken gegen Glykopeptid-Antibiotika

Während die Beta-Lactam-Antibiotika mit Penicillinbindeproteinen (PBP) interagieren und dadurch die Zellwandbiosynthese der Bakterien verhindern, inaktivieren Glykopeptid-Antibiotika nicht die Enzyme der Peptidoglykanbiosynthese, sondern interagieren mit den für die Zellwandbiosynthese benötigten Substraten. Die Zielstruktur sind die beiden endständigen D-Alanyl-D-Alanin-Reste der Peptidseitenkette, die zu einer langen Kette aus Zellwandgrundbausteinen (N-Acetyl-Glucosamin-N-Acetyl-N-Muramin-säure-Pentapeptid) gehören und die Quervernetzung des Peptidoglykangerüsts und damit dessen Stabilität sicherstellen (Klare et al., 2012b). Normalerweise erfolgt durch die nicht-kovalente Bindung der Glykopeptidmoleküle eine sterisch bedingte Behinderung der Zellwandsynthese, d. h. die Bindung der die Zellwand aufbauenden Enzyme (Transpeptidasen, Transglykosidasen) an die Substrate wird blockiert (Reynolds, 1989, Courvalin, 2006). Durch die Größe dieser Moleküle ist eine Passage der äußeren Zellwand von diesen Molekülen nicht möglich. Deshalb sind Glykopeptid-Antibiotika nur gegen Gram-positive und nicht gegen Gram-negative Bakterien wirksam. Unmittelbare Folge der gestörten Zellwandsynthese ist die Instabilität und Durchlässigkeit des Mureinsacculus und folglich der Zelltod. Somit kommt es zu einer sekundären Bakterizidie von proliferierenden Bakterien bei der Zellteilung (Courvalin, 2006).

Als Antwort auf den Glykopeptid-induzierten Selektionsdruck entwickelte sich die Glykopeptid-Resistenz, die durch eine Modifikation der Zellwandbiosynthese mittels Austausch des endständigen D-Alanin gegen ein D-Lactat oder ein D-Serin erreicht wird. Als Folge ist die Ausbildung der oben beschriebenen nicht-kovalenten Bindung zwischen den entsprechenden Molekülen nicht mehr mit der gleichen Affinität möglich. Die Affinität des Glykopeptid-Antibiotikums zu seinem Substrat wird um Faktor 1000 verringert und somit wird die Inhibition der Zellwandbiosynthese aufgehoben. Diese Modifikation ist phänotypisch meist in einem Anstieg der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Vancomycin ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) messbar (Klare et al., 2012b).

Wie bereits aus der Tab. 1 ersichtlich war, unterscheidet man bei der Gattung *Enterococcus* intrinsische (natürliche) gegenüber extrinsischen (erworbene) Glykopeptid-Resistenzen (Werner et al., 2008b; Klare et al., 2012b).

Die natürlichen (intrinsischen) Resistenzen von Resistenztyp VanC₁ (*E. gallinosum*) und VanC₂ (*E. casseliflavus*) mit einem terminalem D-Alanyl-D-Serin-Rest führen ebenfalls

zu einer Änderung der Affinität des Glykopeptid-Antibiotikums Vancomycin zu der entsprechenden Aminosäureseitenkette (Pentapeptid).

Dennoch kommt es nicht zur vollständigen Aufhebung der Bindung, wie dies beim erworbenen VanA- bzw. VanB- Resistenztyp der Fall ist. Es resultiert eine MHK im Bereich von 2-8 µg/ml (Variationsbreite: 1-32 µg/ml). Die natürliche (VanC1/2) chromosomal lokalisierte Resistenz gilt als nicht übertragbar (Werner et al., 2008b).

Die erworbenen Glykopeptid-Antibiotika-Resistenzen lassen sich genotypisch untergliedern. Mittlerweile sind verschiedene Ligase-Gene (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN*) bekannt, welche zu veränderten Ligaseprodukten führen z. B. D-Alanyl-D-Lactat (Cercenado, 2011). Von diesen 8 Resistenztypen haben bis jetzt in der Humanmedizin nur der VanA- und der VanB-Resistenztyp, vermittelt durch das *vanA*- bzw. das *vanB*-Gen, eine klinische Bedeutung. Beide Gene können chromosomal, aber auch auf Plasmiden lokalisiert sein und sind somit konjugativ übertragbar (Leclercq et al., 1989; Werner et al., 2008b). Der bereits resistenterere (siehe Tab. 1) *E. faecium* gilt hierbei als Reservoir der übertragbaren *vanA*- und *vanB*-bedingten Resistenzen (Klare et al., 2012b).

Der Unterschied zwischen beiden Genen liegt im Resistenztyp. Der VanA-Resistenztyp bewirkt eine hohe Vancomycin- und zusätzlich eine Teicoplaninresistenz. Letzteres ist beim VanB-Resistenztyp nicht der Fall. Des Weiteren liegt die MHK des VanA-Resistenztyps mit 8-1000 µg/ml höher als die des VanB-Resistenztyps mit 4-32 µg/ml (Klare et al., 2012b).

Vancomycin-resistente Enterokokken mit übertragbaren Resistenzen sind schon seit längerem bekannt. Ihre Erstbeschreibung erfolgte zeitgleich bereits im Jahr 1988 in Frankreich und England (Leclercq et al., 1989; Uttley et al., 1989; Klare et al., 2012b).

Wichtig ist zudem, dass es sich bei beiden Resistenztypen um induzierbare Resistenzen handelt. Ein membranständiger Sensor (VanS) führt hierbei über einen nicht vollständig geklärten Mechanismus zu einer Autophosphorylierung und damit zu einer Aktivierung der sensoreigenen Histidinkinasefunktion am C-Terminus. Dies führt zu einer anschließenden Übertragung des Phosphatrestes auf ein zytoplasmatisches Regulatorprotein (VanR), welches dadurch aktiviert wird und als Transkriptionsfaktor die Genexpression verändert (Hong et al., 2008; Werner et al., 2008b). Bei fehlender Stimulation des VanS kommt es zur Dephosphorylierung und folglich zu keiner Änderung der Genaktivität.

Liegt eine Resistenz gegen Glykpeptid-Antibiotika vor, kommt es zu einer Reduktion der therapeutischen Möglichkeiten. Zum Einsatz kommen dann meist Tigecyclin, Daptomycin (Resistenzen sind sehr selten, besonders bei Vorliegen des VanB-Resistenztypes in < 1 % der Isolate), Quinupristin/Dalfopristin (nur gegen *E. faecium* wirksam und nicht in Deutschland verfügbar), sowie Linezolid. Sie alle wirken über andere Wirkmechanismen und gelten als Reserveantibiotika zum Einsatz bei Methicillin-resistenten *S. aureus* und *S. epidermidis* sowie VRE. Resistenzen gegen diese Substanzklassen sind heute noch selten, aufgrund des breiteren Einsatzes allerdings häufiger als in der Vergangenheit.

Nach aktueller Datenlage handelt es sich bei Linezolid und Tigecyclin um sehr gut wirksame Präparate gegen die Resistenzen in Deutschland selten sind (RKI, 2013).

In den letzten Jahren ist es zu einem deutlichen Anstieg von *vanB*-kodierten Glykpeptid-resistenten *E. faecium*-Stämmen gekommen. Dadurch kam es zu einer Steigerung der Häufigkeit der das *vanB*-Gen besitzenden Stämme, sodass man heute fast eine Gleichverteilung des VanA- und des VanB-Resistenztyps feststellen kann (RKI, 2013).

1.2.4 Linezolidresistenz bei Enterokokken

Gegen das oben erwähnte Reserveantibiotikum resistente Enterokokken sind heute noch sehr selten. Dennoch kommt es seit der Erstbeschreibung in Deutschland im Jahr 2004 zu einer Zunahme dieser Stämme (Schulte et al., 2008). In einer Studie des Robert-Koch-Institutes wurden Linezolidresistenzen bei 1,8 % der eingesandten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate nachgewiesen, sodass Linezolidresistenz bei Enterokokken keinesfalls eine Ausnahme darstellt. Dennoch ist ein Großteil der Linezolid-resistenten Enterokokken Vancomycin-sensibel (RKI, 2013).

Mittlerweile sind verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben worden, welche alle eine Veränderung der Domäne V der 23S rRNA zum Ziel haben, um eine Wirkung des Linezolid und damit eine bakterizide Wirkung durch Hemmung der Proteinbiosynthese auf das Bakterium zu verhindern. Der häufigste beschriebene Mechanismus ist eine Punktmutation in der DNS-Sequenz für die Stelle 2576 der Domäne V der 23S rRNA, durch welche es zu einem Austausch von Guanin gegen Thymin (G2576T) kommt (Patel et al., 2013; Sánchez-Díaz et al., 2014).

Bis heute konnte keine Übertragung dieser Mutation nachgewiesen werden, welche vermutlich spontan auftritt und unter dem Selektionsdruck einer entsprechenden Therapie mit Linezolid zu einem Linezolid-resistenten Stamm führt (Kehrenberg et al., 2007; Patel et al., 2013).

Die Frequenz dieser spontanen Mutationen wird, im Vergleich zu anderen Bakterienfamilien, mit 10^{-9} bis 10^{-11} bei Enterokokken als sehr niedrig angegeben (Prystowsky et al., 2001).

Zusätzlich zu diesem Mechanismus kann die Linezolidresistenz auch durch das *cfr*-Gen vermittelt werden. Das *cfr*-Gen ist ein für Enterokokken seltener Resistenzmechanismus und wurde vorher bereits in Staphylokokken beschrieben, dessen ungeachtet kann es vermutlich auch in einigen Fällen für Linezolidresistenz bei Enterokokken verantwortlich gemacht werden (Schwarz et al., 2000; Kehrenberg et al., 2005; Toh et al., 2007; Diaz et al., 2012; Flamm et al., 2012; Ntokou et al., 2012; Patel et al., 2013; Sánchez-Díaz et al., 2014). Dieses Gen kodiert für eine Methyltransferase, welche die posttranskriptionale Methylierung eines Adenins an der Stelle 2503 in der 23S rRNA bewirkt. Hierbei ist das *cfr*-Gen meist auf Plasmiden lokalisiert, welche zwischen Bakterienstämmen durch horizontalen Gentransfer übertragen werden können (Kehrenberg et al., 2007; Patel et al., 2013). Gleichwohl wurde dieses Gen ursprünglich in *S. sciuri* in Tieren beschrieben (Schwarz et al., 2000). Es vermittelt noch weitere Antibiotikaresistenzen z. B. gegen Chloramphenicol, Lincosamide, Pleuromutiline und Streptogramine (Long et al., 2006; Sánchez-Díaz et al., 2014).

Die Therapie Linezolid-resistenter Enterokokken gestaltet sich schwierig. Bei zusätzlichem Vorliegen einer Vancomycinresistenz wären andere Reserveantibiotika wie Tigecyclin oder Daptomycin das Mittel der Wahl. Im günstigsten Fall findet sich keine Resistenz für Vancomycin, sodass dieses Pharmakon zur Therapie eingesetzt werden kann.

1.3 Zielsetzung

Die Kenntnis der klinikeigenen Resistenzlage ist heute bei der Erstellung von klinikeigenen Leitlinien für die Antibiotikatherapie unumgänglich. Im Sinne des Antibiotic Stewardship (rationale Antiinfektivaverordnung) soll durch gezielte Antibiotikatherapie eine Einsparung von Breitbandantibiotika erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit soll eine klinikbezogene und klinikübergreifende Analyse der epidemiologischen Verteilung von Vancomycin-resistenten Enterokokken an einem Klinikum der Maximalversorgung (KMV) erfolgen. Zudem soll die Einsatzmöglichkeit einer real-time PCR zur Detektion von VRE in der Routinediagnostik mit ihren Vor- und Nachteilen eruiert werden. Aus der Kenntnis dieser Daten sollen Hinweise auf potentielle Optimierungspotentiale im Umgang mit VRE erhalten werden.

Zusätzlich soll eine Untersuchung der Epidemiologie und des Resistenzmechanismus von Linezolid-resistenten Enterokokken am KMV erfolgen, um Anhaltspunkte auf das bestehende oder zukünftige Risikopotential dieser Erreger zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Tab. 2: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Geräte (Bezeichnung, Modell, Hersteller).

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-steuerungseinheit	Consort EV243 Range Power supply Unit	Consort bvba, (Turnhout, Belgium)
Agarose-Gelelektrophoresekammer	40-0911	PEQLAB Biotechnologie GmbH, (Erlangen, Deutschland)
Densitometer	Densichek Plus	bioMerieux, SA, (Nürtingen, Deutschland)
Diversilab	2100 Bioanalyzer Instruments	bioMerieux, SA, (Nürtingen, Deutschland)
ImageMaster	ImageMaster VDS system Modellnummer: 80-6254-80	Pharmacia Biotech, (Freiburg, Deutschland)
integrierter Fotodrucker des ImageMasters	FUJIFILM THERMAL IMAGING SYSTEM FTI-500	FUJIFILM Europe GmbH, (Düsseldorf, Deutschland)
Magnetrührer mit Heizung	RCTbasic	Ika Labortechnik, (Staufen, Deutschland)
Nanodrop	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer mit Software V. 3.7.0	PEQLAB Biotechnologie GmbH, (Erlangen, Deutschland)
PCR-Cycler	Labcycler	Sensoquest, (Göttingen, Deutschland)
Rotor-Gene	RG 3000	Corbett Research UK, (Saint Neots, Cambridgeshire, England)
Schüttelinkubator	Vortemp 56 EVC	Labnet International Inc., (Edison, New Jersey, USA)
Schüttelinkubator im Brutraum	TR-250	INFORS AG, (Bottmingen, Schweiz)
Schüttelwasserbad	SW22	JULABO GmbH, (Seelbach, Deutschland)
Vortexer/Schütter	Vortex-Genie 2 (Model G560E)	Scientific Industries, Inc., (Bohemia, New Jersey, USA)
Zentrifuge	Heraeus Biofuge fresco	DJB Labcare Ltd, (Newport Pagnell, Buckinghamshire, England)

2.2 Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien

Tab. 3: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien (Bezeichnung, Hersteller (Standort, Land)).

Bezeichnung der Reagenzien	Hersteller (Standort, Land)
10 X Dreamtaq Buffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
10 X FastAP Buffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
10 X FastDigest Buffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
10 X T4 DNA Ligase Buffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
6 X DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
Amplitaq® DNA Polymerase with GeneAmp® 10 x PCR Buffer	Applied Biosystem, (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Diversilab® Enterococcus Kit	bioMerieux, SA, (Nürtingen, Deutschland)
dNTP Mix, 10 mM each	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µL)	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
FastDigest Sall	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
HotStarTaq Master Mix Kit (1000 U)	QIAGEN GmbH, (Hilden, Deutschland)
Phusion High-Fidelity Buffer	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, (Hilden, Deutschland)
QIAquick® PCR Purifikation Kit	QIAGEN GmbH, (Hilden, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Inc., (Carlsbad, Kalifornien, USA)
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies, Inc., (Santa Clara, Kalifornien, USA)

2.3 Antibiotika, Nährmedien, Chemikalien, Materialien und Medienzusätze

Tab. 4: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien und Materialien (Hersteller (Standort, Land)).

Bezeichnung der Reagenzien	Hersteller (Standort, Land)
0,1 mm Diameter.- Glas Beads	Carl Roth GmbH+Co.KG, (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Deutschland)
CHROMAGAR VRE	Mast Diagnostica GmbH, (Reinfeld, Deutschland)
Columbia Agar with 5 % Sheep Blood	BD, (Heidelberg, Deutschland)
Difco™ Skim Milk	BD, (Heidelberg, Deutschland)
Eppendorf Research plus (0.1– 2.5 µl; 2 – 20 µl; 20 – 200 µl; 100 – 1000 µl)	EPPENDORF AG, (Hamburg, Deutschland)
Impfshlingen	Sarstedt, (Nümbrecht, Deutschland)
LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar (BD 214030)	BD, (Heidelberg, Deutschland)
LB-Medium: 0,05 % (w/v) Hefeextrakt (OXOID L 21 (106404)), 0,05 % (w/v) NaCl (Merck 106404), 1 % (w/v) Bacto-Trypton (BD 211705)	OXOID Deutschland GmbH, (Wesel, Deutschland) Merck KGaA, (Darmstadt, Deutschland) BD, (Heidelberg, Deutschland)
Linezolid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (München, Deutschland)
Linezolid E-Test	bioMérieux Deutschland GmbH, (Nürtingen, Deutschland)
Müller-Hinton-Agar II	BD, (Heidelberg, Deutschland)
Safe-Lock 1,5 ml EPPENDORF TUBES®	EPPENDORF AG, (Hamburg, Deutschland)
TipONE® Pipettenspitzen	Starlab GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Ultrapure™ Agarose	Life Technologies GmbH, (Darmstadt, Deutschland)

2.4 Methoden der Keimidentifizierung

In die Stichprobe wurden nur Erstisolate von Vancomycin-resistenten Enterokokken von Patienten aus der Routinediagnostik des IMMIP (Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des Universitätsklinikums Bonn) im Zeitraum Januar bis Dezember 2013, sowie Linezolid-resistente Enterokokken von Patienten am UKB (fortgeschrieben als KMV) im Zeitraum Februar 2013 bis Februar 2014 eingeschlossen. Die Speziesdifferenzierung erfolgte mit Hilfe des MALDI-TOF MS. Die Resistenzbestimmung erfolgte durch den VITEK2® (bioMérieux, SA, Nürtingen, Deutschland) AST Karte 611. Als Screening Agar wurde der CHROMAGAR VRE von Mast Diagnostica

GmbH (Reinfeld, Deutschland) verwendet. Die Linezolidresistenz wurde mit dem E-Test (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) bestätigt.

2.5 Methoden der Resistenzprüfung

2.5.1 E-Test

Beim E-Test (=Epsilometertest) handelt es sich um eine einfache Methode, die minimale Hemmkonzentration (MHK) und damit die Wirksamkeit eines Antibiotikums (AB) gegen einen Mikroorganismus zu bestimmen. Dabei wird ein Antibiotika-haltiger Kunststoffstreifen auf einen vorher rasenförmig beimpften Agar gelegt. Durch die Diffusion des AB in den Agar und durch die vom unteren zum oberen Ende des Teststreifens exponentiell zunehmende AB-Konzentration kommt es zur Entstehung eines AB-Gradienten im Agar. Nach einer Bebrütung von 18 ± 2 Stunden kann die MHK als höchste Konzentration, bei der sich noch kein Hemmhof um den Teststreifen gebildet hat, entsprechend dem ellipsenförmigen Schnittpunkt des Bakteriumwachstums und dem Teststreifen, abgelesen werden (siehe Abb. 14, 15).

Es wurden Linezolid E-Tests und Müller-Hinton-Agar, welche vorher mit einer 0.5 McFarland Bakteriensuspension beimpft wurden, für die Bestimmung der Linezolid MHK der Enterokokken benutzt. Die Auswertung erfolgte entsprechend den aktuellen EUCAST-Richtlinien (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Sogenannte Breakpoint Tab. sind unter <http://www.eucast.org> für die MHK Interpretation und die Hemmhofdurchmesser hinterlegt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Version 4.0, 2014 verwendet (EUCAST, 2014).

2.5.2 Übernachtkultur (ÜNK)

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Resistenzen bzw. zur Selektion von resistenten Bakterien ist die ÜNK. Hierbei handelt es sich um ein mit Antibiotika versetztes LB-Nährmedium, welches für 10-12 Stunden im Schüttelinkubator bei 160 rpm inkubiert wird. Beim Vorliegen von Resistenzen kommt es zu einem Wachstum des Bakteriums und damit zur Trübung der Flüssigkultur. Zur Überprüfung der Enterokokken auf Linezolidresistenz wurden ÜNK mit Linezolidkonzentrationen von 4 bzw. 8 µg/ml eingesetzt.

Zur selektiven Anreicherung von positiven Klonen zur Plasmidisolierung wurden ÜNK mit einer Konzentration von 40 µg/ml Ampicillin eingesetzt.

2.5.3 Selektivagar

Zur Überprüfung der Vancomycinresistenz des VITEK2[®] wurden Vancomycin-haltige Agarplatten (Mast Diagnostica GmbH) verwendet, welche nach Beimpfung mit der entsprechenden Probe mittels 3-Ösen-Ausstrich bei 37 ± 1 °C für 18 ± 2 Stunden bebrütet wurden. Beim Vorliegen von resistenten Enterokokken kommt es zum Wachstum, bei dem sich die entsprechenden Kolonien auf Grund eines Indikatorumschlags lila färben können.

Zur selektiven Anreicherung von Linezolid-resistenten Enterokokken wurde LB-Agar mit einer Linezolidkonzentration von 4 µg/ml verwendet.

2.6 Herstellung von Lysaten

50 µl H₂O wurden in 1,5 ml Eppendorf Tubes aliquotiert. 1-2 Kolonien einer Reinkultur des entsprechenden Bakteriums wurden anschließend resuspendiert und bei 95 °C und 50 rpm für 10 min im Schüttelinkubator inkubiert.

Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, sowie die Abnahme des Überstandes unter Vermeidung des Pellets.

Zur Herstellung von Lysaten Linezolid-resistenter Enterokokken wurden die Kolonien in Eppendorf Tubes mit Glasbeads resuspendiert. Des Weiteren erfolgte vor der Zentrifugation noch eine Inkubation bei Raumtemperatur und maximaler Stufe (3200 rpm) für 10 min im Schüttler (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New Jersey, USA).

Die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch mit Hilfe des Nanodrop gemessen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um die gezielte enzymatische *in-vitro* Vervielfältigung eines bestimmten Genomabschnittes bzw. eines Genabschnittes z. B. eines Mikroorganismus. Dabei wird die Größe des entstehenden Fragmentes durch die Bindungsstelle der

Primer an der DNS bestimmt. Im Verlauf der PCR kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Fragmente unter Verwendung von bereits entstandenen Fragmenten.

Für die 23S-, VanA/VanB-Klonierungs-PCR, sowie für die Kontroll-PCR der Klonierung wurden folgende Reaktionsansätze (siehe Tab. 5: DreamTaq) bzw. für die *cfr*-PCR wurde folgender Ansatz (siehe Tab. 5: Phusion) nach Anleitung des Herstellers verwendet:

Tab. 5: Versuchsansätze der DreamTaq- und Phusion-PCR. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen, welche im Rahmen einer PCR mit der DreamTaq bzw. Phusion DNA Polymerase benutzt wurden.

	DreamTaq	µl/Ansatz	Phusion	µl/Ansatz
H ₂ O		18,875		35
dNTP Mix, 10 mM each		0,5		1
Primer Fw		0,25		0,5
Primer Rv		0,25		0,5
Puffer	10 X Dreamtaq Buffer	2,5	Phusion High-Fidelity Buffer	10
Polymerase	DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5
Probe		2,5		2,5
Gesamt		25 µl		50 µl

Folgende Cycling-Bedingungen wurden nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers benutzt:

Tab. 6: Temperatur und Zeiten der einzelnen PCRs. Angegeben sind die Temperaturen und Zeiten der einzelnen PCRs in Abhängigkeit von der Zyklusphase. Mit X gekennzeichnete Werte sind in Tab. 8 für die jeweilige PCR angegeben.

Zyklusphase	DreamTaq		Phusion		Zykluszahl	VanA/VanB-PCR	
	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zeit (s)		Dreamtaq (Phusion)	Temperatur (°C) / Zeit (s)
Initiale Denaturierung	80	300	98	180	1(1)	95 / 900	1
Denaturierung	95	45	98	10	35 (30)	95 / 15	37
Anlagerung	X	45	X	30		56 / 30	
Elongation	72	X (1 min/kb)	72	30		72 / 30	
Finale Elongation	72	600	72	600	1 (1)	72 / 600	1

Das Primerdesign wurde mit Hilfe des CodonCode Aligner V. 4.2.4. sowie NCBI durchgeführt. Die Herstellung der lyophilisierten Primer erfolgte durch Biologio (Nimwegen,

Niederlande). Anschließend erfolgte eine Verdünnung auf 100 µmol/l als „stock solution“ und 10 pmol/µl als „working primer solution“. Für die verwendeten Primer siehe Tab. 8. Zur Aufreinigung der Produkte der 23S-, VanA/VanB-Klonierungs-PCR, sowie für die Kontroll-PCR der Klonierung (pGI3-Basic) wurde das QIAquick® PCR Purifikation Kit verwendet.

Die Sequenzierung wurde durch SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt und die Analyse der resultierenden Sequenz wurde mit Hilfe des CodonCode Aligner V. 4.2.4, sowie NCBI BLAST vorgenommen. Alle Reagenzien wurden bei - 20 °C gelagert.

2.7.1.1 Quantitative Real-time PCR (Echtzeit-PCR)

Bei der real-time PCR handelt es sich um eine Variante der oben beschriebenen PCR unter Verwendung von Sonden, welche bereits bei höheren Temperaturen und damit vor dem Synthesebeginn der DNS-Polymerase an die DNS binden. Sie besitzen an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (=Reporter) und am anderen Ende einen Quencher, welcher die vom Reporter emittierte Farbe absorbiert. Hierdurch ist mit Ausnahme der Hintergrundfluoreszenz kaum Fluoreszenz messbar. Beim Auftreffen der DNS-Polymerase im Rahmen der Elongationsphase auf die Sonde kommt es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zu einer Trennung des Reporters und des Quenchers. Da nun keine Fluoreszenzabsorption mehr stattfindet, kommt es zu einem messbaren Fluoreszenzanstieg. Die Fluoreszenzmessung erfolgt am Ende der Elongationsphase aller Zyklen und ermöglicht in Echtzeit eine Aussage, ob es durch die PCR zur Vervielfältigung eines zur Sonde passenden Fragments kommt.

Die real-time PCR wurde zum Nachweis des VanA- oder VanB-Gens, sowie eines Kontrollgens (16S-Eubac) aller in der Stichprobe enthaltenen VRE bzw. aller VSE des Kontrollkollektivs benutzt und auf dem RG 3000 (Corbett Research UK, Saint Neots, Cambridgeshire, England) mit der Rotor-Gene-Analysis Software 6.1 durchgeführt.

Positive (pGL3-Basic mit entsprechendem Insert, bzw. sequenzierte VRE; Vancomycin-sensibler Enterokokkus) und negative Kontrollen (H₂O) wurden bei jedem Lauf mitgeführt, um die Gültigkeit des Ergebnisses zu bestätigen und eine Kontamination auszuschließen.

Es wurde folgender Versuchsansatz benutzt:

Tab. 7: Mengen und Konzentrationen der verwendeten Reagenzien der VanA/VanB-PCR. Diese Multiplex-PCR besteht aus der VanA-, VanB- und 16S-PCR. Zu jedem Ansatz kann entweder eine Kontrollprobe oder eine zu untersuchende Probe hinzugefügt werden.

		Konzentration	µl/Ansatz
HotStarTaq Master Mix			12,5
VanA	VanA-Fw	50 pmol/µl	0,25
	VanA-Rv	50 pmol/µl	0,25
	VanA-Sonde	10 pmol/µl	0,37
VanB	VanB-Fw	50 pmol/µl	0,25
	VanB-Rv	50 pmol/µl	0,25
	VanB-Sonde	10 pmol/µl	0,37
16S	16S-Eubac-Gen (Unibac) Fw	5 pmol/µl	0,25
	16S-Eubac-Gen (Unibac) Rv	5 pmol/µl	0,25
	16S-Eubac-Gen (Unibac) Sonde	10 pmol/µl	0,37
H ₂ O			7,4
Probe			2,5
Gesamt			25

Für die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden siehe Tab. 8. Für Cycling-Bedingungen nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers siehe Tab. 6. Die Lagerung aller verwendeten Reagenzien erfolgte bei - 20 °C.

Tab. 8: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Primer und Sonden mit entsprechenden Sequenzen und Quellen. Bei den gekennzeichneten Primern (*) besteht die Sequenz der Primer (5'→ 3') aus Alibibasen (**fett**), der Schnittstelle für die Restriktionsenzyme (unterstrichen) und der entsprechenden Zielsequenz. bp=Basenpaare.

Gene bzw. Vektor	Bezeichnung bzw. Beschreibung	Primer 5'-3'	Fragmentgröße (bp)	Quelle (Bei dieser Studie: Anlagerung und Elongation (nach DeamTaq-Protokoll))
<i>vanA</i>	VanA Fw	Fw 5'-ATG AAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA CT-3'	212	(Werner et al., 2011)
	VanA Rv	Rv 5'-GGC GAG AGT ACA GCT GAA TA-3'		
	VanA Sonde	5'-TET-CTC AGA GGA GCA TGA CGT ATC GGT-BHQI-3'		
	VanA Fw mit Schnittstelle Hind III*	Fw 5'- GTA TAA <u>GCT TAT</u> GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT ACT-3'	232	Diese Studie: Anlagerung 57 °C, Elongation 72 °C - 30 s
	VanA Rv mit Schnittstelle Sal I*	Rv 5'- AAA <u>AGT CGA</u> <u>CGG CGA</u> GAG TAC AGC TGA ATA-3'		
	VanA vollständiges Gen mit Schnittstelle Hind III bzw. Sall*	Fw 5'- GTA TAA <u>GCT TAT</u> GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT ACT-3' Rv 5'- GTA TGT <u>CGA CTC</u> ACC CCT TTA ACG CTA ATA C-3'	1052	Diese Studie: Anlagerung: 57 °C, Elongation: 72 °C - 65 s
<i>vanB</i>	VanB Fw	Fw 5'-GGA CAA ATC ACT GGC CTA CAT TC-3'	295	(Werner et al., 2011)
	VanB Rv	Rv 5'-CGC CGA CAA TCA AAT CAT C-3'		
	VanB Sonde	5'-FAM-ACC TAC CCT GTC TTT GTG AAG CCG -BHQI-3'		
	VanB Fw mit Schnittstelle Hind III*	Fw 5'- ATA AAG <u>CTT GGA</u> CAA ATC ACT GGC CTA CAT TC-3'	313	Diese Studie: Anlagerung: 57 °C; Elongation: 72 °C - 30 s
	VanB Rv mit Schnittstelle Sal I*	Rv 5'- ATA <u>GTC GAC</u> CGC CGA CAA TCA AAT CAT C-3'		
	VanB vollständiges Gen mit Schnittstelle Hind III bzw. Sall*	Fw 5'- GCG CAA <u>GCT TAT</u> GAA TAR AAT AAA AGT YGC A-3 Rv 5'- GTA TGT <u>CGA CTC</u> ACC YCT YTA WCG CYA AT-3'	1049	Diese Studie: Anlagerung: 57 °C; Elongation: 72 °C - 65 s
<i>16S-rDNS</i>	16S-Eubac-Gen (Unibac) Fw	Fw 5'-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-3'	159	(Werner et al., 2011)
	16S-Eubac-Gen (Unibac) Rv	Rv 5'-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A-3'		
	16S-Eubac-Gen (Unibac) Sonde	5'-TX Red-CAC GAG CTG ACG ACA (AG)CC ATG CA -BHQII-3'		
pGL3-Basic Vektor	pGL3-Basic	Fw 5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CCC AG-3' Rv 5'-GAC GAT AGT CAT GCC CCG CG-3'	2138: Vektor unverdaut; 181: Vektor ligiert ohne Insert; 393: Vektor ligiert mit <i>VanA</i> -Insert	Promega (Madison, Wisconsin, USA): Anlagerung: 57 °C; Elongation 72°C - 30 s; (160 s für initiale Prüfung)
<i>23S-rDNS</i>	23S Fw	Fw 5'-CCA AAG GTT CCC TCA GAA TGG TTG-3'	425	Diese Studie; Anlagerung: 57 °C; Elongation: 72 °C - 35 s
	23S Rv	Rv 5'-CCT TGG CAG AAC AAC TGG TAC AC-3'		
	23S Fw L	Fw 5'-GAA TTG AAG CCC CAG TAA ACG GC-3'	1000	Diese Studie: Anlagerung: 57 °C; Elongation: 72 °C - 60 s
	23S Rv L	Rv 5'-CCT CGA TCG ATT AGT ATC AGT CCG-3'		
<i>cfr</i>	cfr-Fw	Fw 5'-TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA-3'	746	(Kehrenberg und Schwarz, 2006)
	cfr- Rv	Rv 5'-ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC-3'		

2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren bei dem man DNS Fragmente z. B. einer PCR nach der Größe auftrennen kann. Das Ergebnis ist von der Konzentration des Agarosegels, sowie der Dauer und Höhe der angelegten Spannung abhängig. Für alle Agarose-Gelelektrophoresen wurden 50 ml Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1 % hergestellt.

Tab. 9: Im Rahmen der Agarose-Gelelektrophorese benutzte Puffer, Lösungen und Molekulargewichtsmarker. RT=Raumtemperatur.

10 x TBE (Tris-Borat-Elektrophorese) Puffer	
<ul style="list-style-type: none"> - 108 g (89 mM) TRIS Base - 55 g (89 mM) Borsäure - 7,44 g (2 mM) EDTA-Na₂ - Mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt - Die resultierende Lösung wurde auf 1:10 verdünnt und bei RT aufbewahrt 	
Probenladepuffer	
<ul style="list-style-type: none"> - 6 X DNA Loading Dye <p>Aufbewahrung bei 4 °C</p>	Fisher Scientific - Germany GmbH, (Schwerte, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker	
<ul style="list-style-type: none"> - FastRuler Low Range DNA Ladder - FastRuler Middle Range DNA Ladder - FastRuler High Range DNA Ladder <p>Aufbewahrung bei 4 °C</p>	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA) Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA) Thermo Fisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
Ethidiumbromid:	
<ul style="list-style-type: none"> - Ethidiumbromidbad mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,01-0,02 % 	

Zu 0,5 g Ultrapure™ Agarose (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden 50 ml 1 x TBE-Puffer hinzugefügt, mit Hilfe eines Magnetrührers mit Heizplatte durchmischt und einmal aufgekocht.

Das resultierende Agarosegemisch wurde in die Gelelektrophoresekammer gegossen und nach dem Erstarren beladen. Hierbei wurden 1 µl Loading Dye mit 2,0 µl Probe (23S-PCR), 11 µl Probe (CFR-PCR) oder mit 5,0 µl Probe (alle weiteren PCRs, s.u.) gemischt und danach aufgetragen.

Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei 140 V und 100 mA für 25 min in der Gelelektrophoresekammer durchgeführt.

Abschließend wurden die Gele für 30-50 min in der Ethidiumbromidlösung gefärbt, danach mit Aqua dest. abgespült, mit dem ImageMaster ausgewertet und das resultierende Foto gespeichert bzw. mit Hilfe des integrierter Fotodrucker des ImageMasters ausgedruckt. Die Molekulargewichtsmarker wurden in Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße ausgewählt.

2.9 Herstellung von Kontrollplasmiden

Tab. 10: Übersicht der Plasmidkonstruktion des Vektors pGL3-Basic. Abgebildet ist eine Vektorkarte des im Rahmen der Klonierung benutzten Vektors mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme (Promega, 2008). Zusätzlich sind die im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme, die resultierenden Fragmente nach dem Restriktionsverdau, die Klonierungsbedingungen, sowie das Transformationsziel des Plasmids und die zur Kontrolle verwendeten PCRs aufgelistet. bp=Basenpaare, h=Stunden.

	pGL3-Basic
Plasmidkarte	
Verwendete Restriktionsenzyme	HindIII + Sall
Resultierende Fragmente	2861 bp mit Amp-Gen 1957 bp
Verhältnis Insert zu Vektor und Ligationsbedingungen	3:1, Ligation 1 h bei Raumtemperatur
Transformationsziel des Plasmids	XL-10-Gold Ultracompetent Cells <i>E. Coli</i>
Ligations- und Transformationskontrolle	VanA/VanB-Klonierungs-PCR

Die verwendete DNS bzw. das verwendete Plasmid wurde durch das UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit bzw. QIAprep[®] Spin Miniprep Kit isoliert. Das benötigte

Genfragment wurde mit Hilfe der in Tab. 8 erwähnten Primer hergestellt, nachdem das vollständige Gen mit den entsprechenden Primer (siehe Tab. 8) sequenziert worden war. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte immer mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers. Die DNS-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop photometrisch ermittelt.

Für die Berechnung der für die Klonierung benötigten Insertmenge wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{Insert (ng)} = \frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Größe des Insert in kb}}{\text{Gesamtgröße des unverdauten Vektors (kb)}} \times 3$$

Pro Ansatz wurden 100 ng pGL3-Basic eingesetzt, die Größe des Inserts betrug 232 bp (VanA) und 313 bp (VanB). Gesamtgröße des unverdauten Vektors betrug 4,8 kb. Die benötigten Volumina wurden nach Bestimmung der DNS-Konzentration mit Hilfe des Nanodrops ermittelt.

2.9.1 Restriktionsverdau des Plasmids und des Inserts

Der Restriktionsverdau wurde mit den RE HindIII und Sall (siehe Abschnitt 2.2) im 10 µl Ansatz nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers durchgeführt:

Tab. 11: Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen. Für die Berechnung der eingesetzten Insert- und Vektormenge siehe Abschnitt 2.9.

Reagenz	µl/Ansatz
10 X FastDigest Buffer	1 µl
FastDigest HindIII	1 µl
FastDigest Sall	1 µl
Insert bzw. Vektor	µl nach Berechnung
H ₂ O	ad 10 µl
Gesamt	10 µl

Anschließend wurde der Ansatz gemischt, kurz an zentrifugiert und bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 30 min inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 85 °C für 5 min im Schüttelinkubator. Als Kontrolle, ob der RV erfolgreich war, wurde mit einem Teil des Plasmidverdaus eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für erwartete Fragmentgrößen bei erfolgreichem Verdau siehe Tab. 10.

2.9.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung des verdauten pGL3-Basic wurde mit Hilfe der FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase durchgeführt. Ziel war es, die Rate der ohne Insert religierten Plasmide zu verringern. Folgender Ansatz wurde nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers benutzt:

Tab. 12: Reaktionsansatz der Dephosphorylierung des Vektors. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen. Für den Plasmidrestriktionsverdauansatz siehe Tab. 11.

Reagenz	$\mu\text{l}/\text{Ansatz}$
Plasmidrestriktionsverdauansatz	10 μl
10 X FastAP Buffer	2 μl
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 μl
H ₂ O	ad 20 μl
Gesamt	20 μl

Wie oben wurde der Ansatz gemischt, kurz anzentrifugiert und anschließend bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 30 min inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 75 °C für 5 min im Schüttelinkubator.

2.9.3 Ligation

Für alle Ligationsansätze wurde die T4 DNA Ligase mit dem entsprechenden 10 X T4 DNA Ligase Buffer verwendet. Die Konzentration der Ligase betrug 1000 CEU/ μl . 1 CEU ist definiert als die benötigte Enzymmenge um 50 % der HindIII Fragmente der lambda DNS in 30 min bei 16 °C zu ligieren. Bei der durchgeführten Ligation konnte das Insert nur in einer Richtung eingebaut werden, da beim RV sog. „sticky ends“ entstanden waren. Eine Religation des Vektors ohne Insert wurde durch die vorher durchgeführte Dephosphorylierung verhindert.

Die Ligation wurde nach folgendem Ansatz nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers durchgeführt:

Tab. 13: Reaktionsansatz der Ligation. Aufgelistet sind die benutzten Reagenzien mit entsprechenden Mengen.

Reagenz	$\mu\text{l}/\text{Ansatz}$
Insert im 10 μl Ansatz	10 μl
Vektor	Volumen entsprechend 100 ng
10 X T4 DNA Ligase Buffer	3 μl
T4 DNA Ligase	0,4 μl
H ₂ O	ad 30 μl
Gesamt	30 μl

Als Kontrolle wurde auch der dephosphorylierte Vektor mit der Ligase ohne Insert in einem weiteren Ansatz inkubiert, um zu überprüfen, ob die Dephosphorylierung erfolgreich war. Der Ansatz wurde auch hier gemischt, kurz anzentrifugiert und bei RT im Schüttelwasserbad für 1 h inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 65 °C für 10 min im Schüttelinkubator.

2.9.4 Transformation von *E. Coli* mit rekombinierten Plasmiden

Generell gilt, dass der Anteil, der mit Insert erfolgreich ligierten Plasmide, nicht sehr groß ist. Folglich sollten die Transformationsbedingungen optimal sein, damit die Chance einer erfolgreichen Einschleusung des gewünschten Plasmids in das Bakterium möglichst groß ist. Dazu wurden XL10-Gold Ultracompetent Cells *E. coli* verwendet. Ihre Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

Zur Kontrolle der Dephosphorylierung, Ligation und Transformation der Klonierung wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

Tab. 14: Verwendete Kontrollansätze der Klonierung. Aufgelistet sind das transformierte Material und die qualitativ erwartete Koloniezahl nach Ausplattierung und Inkubation.

Transformiertes Material	Erwartete Koloniezahl qualitativ
Dephosphorylierter mit T4-Ligase ohne Insert inkubierter Vektor	keine
Unverdauter, nicht dephosphorylierter Vektor aus Stock	sehr viele

Die Transformation erfolgte nach folgendem leicht modifiziertem Protokoll des Herstellers:

Ein 37,5 µl (VanA-Klonierung, Kontrollansätze) bzw. ein 50 µl (VanB-Klonierung) Aliquot der ultrakompetenten *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut und durch Inkubation mit 1,5 µl (VanA-Klonierung, Kontrollansätze) bzw. 2 µl (VanB-Klonierung) β-Mercaptoethanol für 10 min unter 2-minütigem Mischen chemokompetent gemacht. Anschließend wurden 13 µl (VanA-Klonierung-Ansatz), 30 µl (VanB-Klonierung-Ansatz, jeweils dephosphorylierter, verdauter mit Ligase inkubierter Vektor), 30 µl (dephosphorylierter mit T4-Ligase ohne Insert inkubierter Vektor) bzw. 100 ng unverdauter Vektor (aus Stock, Volumen entsprechend der Stockkonzentration) zum jeweiligen Ansatz zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, sowie anschließend für 30 s bei 42 °C im Schüttelwasserbad erhitzt. Dann wurde der Ansatz sofort wieder für 2 min auf Eis inkubiert, hierauf wurde 0,95 ml

auf 42 °C erwärmtes LB-Medium hinzugefügt und 1 Stunde bei 37 °C im Brutraum unter 225 rpm inkubiert.

Zur Selektion wurden die Zellen anschließend auf Ampicillin-haltigem LB-Medium (40 µl/ml) ausplattiert und für 17-20 h bei 37 °C im Brutraum inkubiert.

2.9.5 Kontrolle der Klonierung

Zur Kontrolle, ob es zur erfolgreichen Transformation mittels des entsprechenden Plasmids (pGL3-Basic+Insert) gekommen war, wurden Lysate der Klone hergestellt und mittels PCR (siehe Abschnitt 2.7.1) gegen eine positive und eine negative Kontrolle überprüft.

Tab. 15: Benutzte Primer und erwartete Fragmentgröße. Aufgelistet ist bei welchem Insert, welches Primerpaar zur Kontrolle eingesetzt wurde, sowie die jeweils erwartete Fragmentgröße nach erfolgreicher Klonierung. Es wurde die DreamTaq-PCR benutzt (siehe Abschnitt 2.7.1). bp=Basenpaare.

Insert	Primer	erwartete Fragmentgröße bei erfolgreicher Klonierung
VanA	pGL3 – Basic Fw, Rv	393 bp
VanB	VanB Fw, Rv mit Schnittstelle Hind III, Sall	313 bp

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und kontrolliert.

Positiv getestete Klone wurden in ÜNK mit Ampicillin 40 µl/ml vermehrt, anschließend erfolgte eine Plasmidpräparation mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit aus 4 ml der ÜNK nach Anleitung des Herstellers. Die Plasmid-DNS-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrop gemessen. Eine Überprüfung der DNS-Sequenz erfolgte durch Sequenzierung. Die Lagerung der Klone erfolgte bei - 80 °C in skim milk, (Kondensmilch; BD, Heidelberg, Deutschland) nach Anleitung der Herstellers hergestellt.

2.10 Methoden zur Typisierung

Die für die Typisierung benötigte DNS wurde mit Hilfe des UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA) isoliert. Typisiert wurden alle in der Stichprobe enthaltenen Isolate der Intensivstation der Medizinischen

Kliniken und Polikliniken I und II, alle in der Stichprobe enthaltenen Isolaten der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, sowie alle im Zeitraum Februar 2013 bis Februar 2014 gesammelten Linezolid-resistenten Enterokokken des KMV.

Die molekulare Typisierung dieser Enterokokkenstämme wurde mittels rep-PCR mit Hilfe des Diversilab Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Bei der rep-PCR (repetitiv-sequenced-based PCR) handelt es sich um ein genomisches Typisierungsverfahren. Diese PCR zielt auf repetitive zufällig im Genom verteilte chromosomale Elemente ab. Diese repetitiven Elemente kodieren nicht für Proteine oder rRNA, sind meist kurz (< 500 bp) und befinden sich zwischen Genen.

Die bei dieser Methode benutzten Primer binden spezifisch an diese repetitiven Elemente. Sollten diese in ausreichender Nähe beieinander liegen, kann die DNS des entsprechenden Organismus an dieser Stelle amplifiziert werden. Die Bindung der Primer ist hierbei spezifisch für ihre entsprechende DNS-Sequenz. Die Auftrennung der einzelnen Fragmente erfolgt mittels Elektrophorese. Die Analyse der Größe, Länge und Anzahl der Amplifikate einzelner Organismen ermöglicht eine Aussage über ihre Verwandtschaftsbeziehung bzw. über die Ähnlichkeit der entsprechenden Genome zueinander. Diese verstreute Verteilung der repetitiven Elemente erzeugt somit bei jedem Organismus ein unterschiedliches Bandenmuster.

Durch dieses Prinzip kommt es zur Entstehung eines reproduzierbaren, einzigartigen genetischen Fingerabdrucks des jeweils untersuchten Mikroorganismus ohne Analyse der Genexpression oder der enzymatischen Aktivität von Proteinen.

Es wurde das Diversilab[®] Enterococcus Kit mit für Enterokokken spezifischen Primern benutzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Elektrophoresis Bioanalyzers. Die Auswertung wurde mit der DiversiLab[®] Software V. 3.4, die Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Krankenhausinformationssystems ORBIS des KMV vorgenommen.

2.11 Verwendete EDV

Mit Hilfe der EDV der Mikrobiologie (Bonn-LIS V. 2.3) erfolgte die Überprüfung und Auswertung der einzelnen im Rahmen der Arbeit verwendeten Isolate.

Die Analyse von Patientenbewegungen am KMV erfolgte mit Hilfe des Klinikinformationssystems ORBIS (Version Sol.-Vers. 08.04.22.01.0011800, DB-Version 08.04.22.11, Kernel-Version 2.0.151-rc01(release)).

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Epidemiologie der Vancomycinresistenz bei Enterokokken am KMV

3.1.1 Lokale Epidemiologie

Über die Verteilung und Häufigkeit des Auftretens von Vancomycin-resistenten Enterokokken am KMV war zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit nur wenig bekannt. Deshalb wurden im Folgenden Erstisolate von VRE von Patienten an den vom IMMIP versorgten Kliniken des KMV über das gesamte Jahr 2013 gesammelt und typisiert. Es ergab sich eine Stichprobe von $N_{\text{ges}}=197$. Auf diese Stichprobe wird im restlichen Teil der Arbeit Bezug genommen, wenn Analysen von Erstisolaten durchgeführt wurden. Demgegenüber steht die Anzahl aller VRE-Nachweise im Jahr 2013 ($N_{\text{ges}}=1327$; davon 1324 *E. faecium* und 3 *E. faecalis*). Diese Zahl berücksichtigt nicht, ob es sich um Erstisolate oder Folgenachweise im Rahmen der Surveillance handelt.

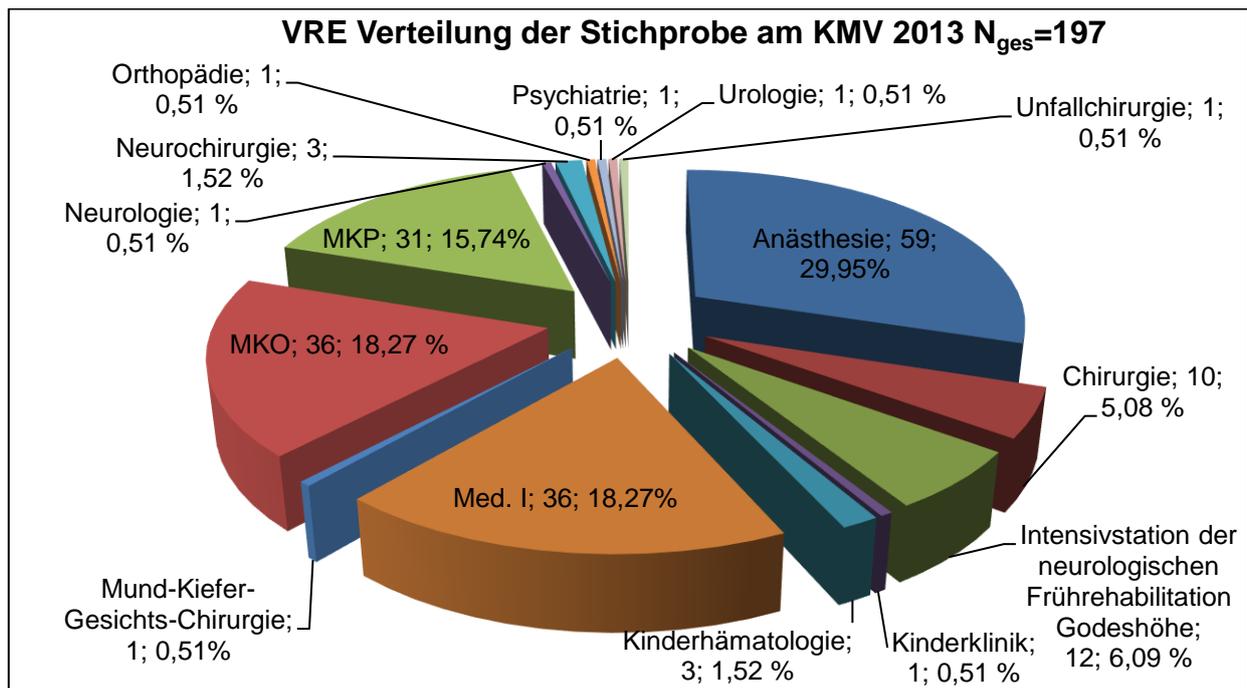


Abb. 1: VRE-Erstisolat Verteilung am KMV 2013. $N_{\text{ges}}=197$. Dargestellt ist der Name der Klinik, die Anzahl der VRE-Erstisolate dieser Klinik, sowie der prozentuale Anteil auf $N_{\text{ges}}=197$ bezogen. Med. I.=Medizinische Klinik und Poliklinik I; MKP=Medizinische Klinik und Poliklinik II; MKO=Medizinische Klinik und Poliklinik III. Alle sind Teil des KMV.

In Abb. 1 ist die Verteilung der VRE-Erstisolate am KMV 2013 dargestellt. Der größte Teil stammt von der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin mit $N=59$ (29,95 %), welche mit Ausnahme der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und

Polikliniken I und II alle Intensivbetten des KMV betreut, sowie von den Medizinische Kliniken und Polikliniken I, II und III.

Abb. 2 stellt die Verteilung und den Vergleich der VRE-Nachweise und VRE-Erstnachweise im Jahr 2013 dar.

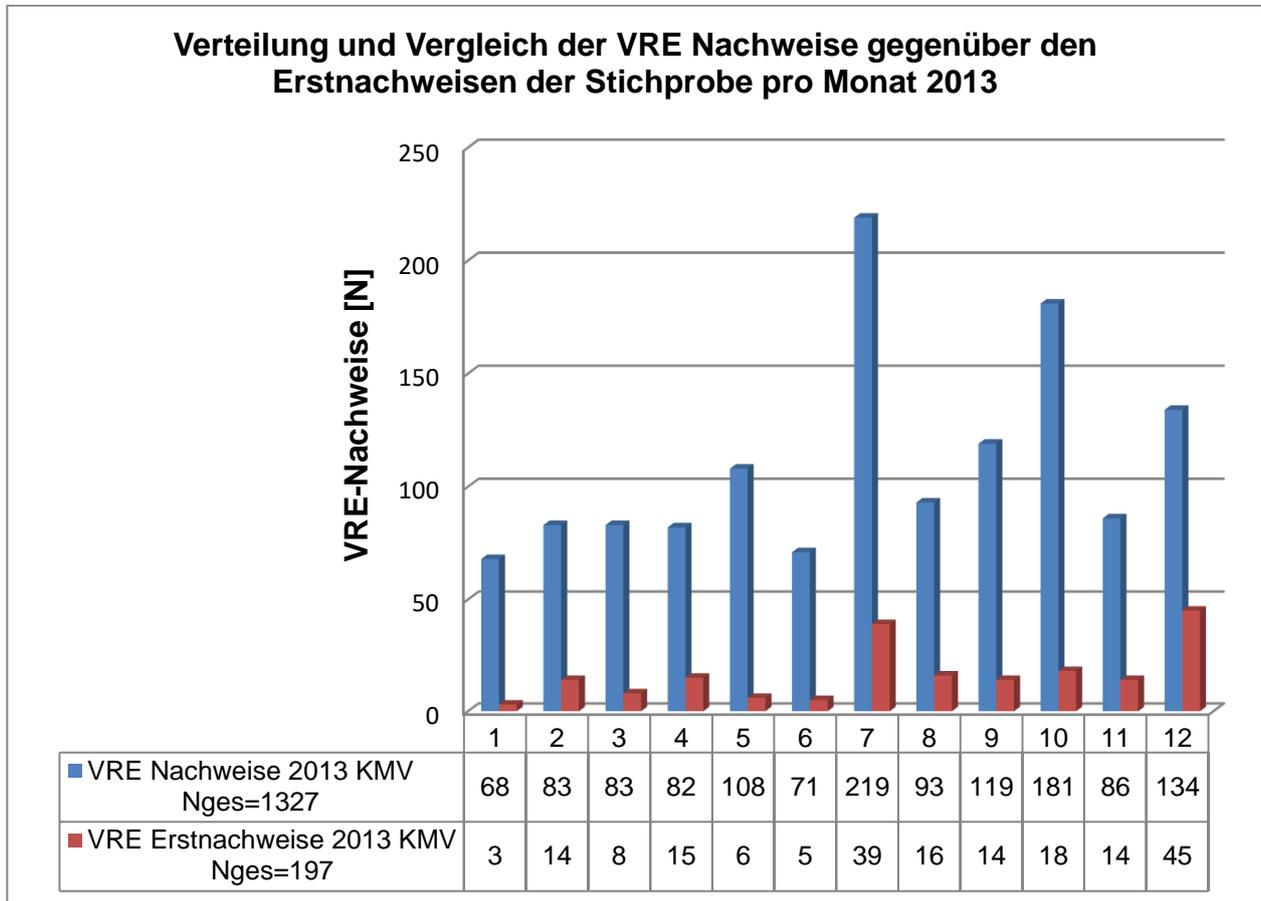


Abb. 2: Verteilung und Vergleich der VRE-Nachweise gegenüber den VRE-Erstnachweisen der Stichprobe pro Monat des Jahres 2013. In der in der Abb. enthaltenen Tab. ist die Anzahl der Isolate über das Jahr numerisch wiedergegeben.

Die Zahl der VRE-Nachweise verläuft wellenförmig über das Jahr 2013 gesehen mit 3 Spitzenwerten im Juli, Oktober, Dezember, welche sich analog zu den Spitzenwerten der VRE-Erstnachweise verhalten (ebenfalls im Juli, Oktober, Dezember). Durchschnittlich gab es 110,6 VRE-Nachweise bzw. 16,4 Erstnachweise pro Monat über das Jahr 2013. Der Spitzenwert mit 219 VRE-Nachweisen lag im Juli (39 VRE-Erstnachweise) vor, der Spitzenwert der VRE-Erstisolatnachweise der Stichprobe ist im Dezember mit 45 Isolatn zu finden, bei 134 VRE-Nachweisen. Die wenigsten VRE-Nachweise lagen im Januar 2013 (N=68) gegenüber 3 VRE-Erstisolaten in der Stichprobe vor.

Des Weiteren ist durch Abb. 2 ersichtlich, dass es in der zweiten Jahreshälfte des Jahres 2013 mehr VRE-Nachweise (N=832; entsprechend 62,69 % auf N=1327 bezogen) gab. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in der Stichprobe wieder (N=146; entsprechend 74,11 % auf N=197 bezogen).

3.1.2 Genotypische Resistenzanalyse

3.1.2.1 Etablierung der VanA/VanB-PCR

Der Nachweis von VRE hat zur Folge, dass die betroffenen Patienten im Falle einer Infektion, die durch den VRE verursacht wird, nicht mehr mit Vancomycin, dem gängigsten und kostengünstigsten Reserveantibiotikum im Gram-positiven Erregerspektrum behandelt werden können. Klinisch bedeutsam sind momentan nur die durch das *vanA*- und *vanB*-Gen vermittelten gegen Glykopeptid-Antibiotika gerichteten Resistenzen.

Für die frühzeitige Erkennung des VRE werden daher sensitive und schnelle diagnostische Werkzeuge benötigt, die die Vancomycinresistenz bzw. die *vanA*-/*vanB*-Gene nachweisen.

In der mikrobiologischen Diagnostik im IMMIP wird bislang nur eine phänotypische Identifizierung der VRE anhand der gemessenen MHK (VITEK2-AST + Bestätigung durch E-Test bzw. Wachstum auf VRE Selektivagar + VITEK2-AST) durchgeführt (siehe Abb. 3).

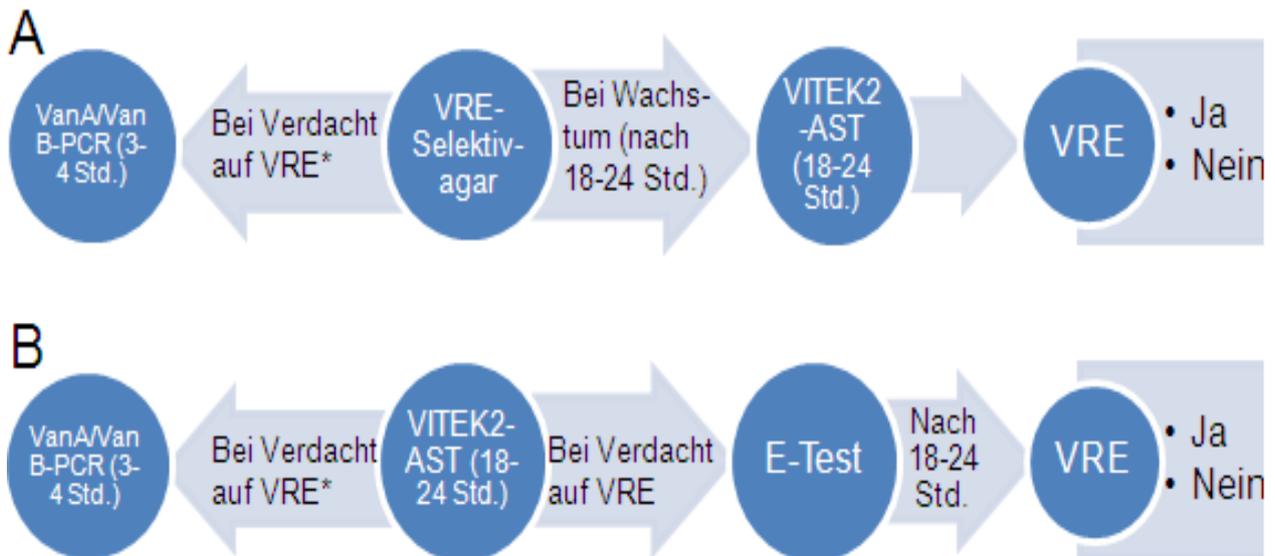


Abb. 3: Einsatzmöglichkeiten der VanA/VanB-PCR und aktueller Ablauf in der Diagnostik bei Verdacht auf VRE unter Angabe der benötigten Arbeitszeit. Der mit * gekennzeichnete Pfeil (links) verdeutlicht, an welcher Stelle die VanA/VanB-PCR eingesetzt werden könnte. A: Screening zur Erkennung von multiresistenten Erregern (Krankenhaushygiene). B: Identifizierung des Infektionserregers (Mikrobiologie).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine quantitative PCR zum Nachweis der *vanA*-, *vanB*-Gene etabliert und validiert. Abb. 3 zeigt, ab welchem Zeitpunkt im diagnostischen Prozess (work flow) ein Einsatz möglich wäre.

Die spezifischen Primer und Sonden zum Nachweis des *vanA*-, *vanB*-Gens und der 16S rDNS wurden von Werner et al. (2011) übernommen. Wie in Werner et al. (2011) publiziert, wurde als Laufkontrolle eine universelle Bakterien-PCR im gleichen Ansatz mitgeföhren.

Das optimierte Multiplex-PCR-Protokoll ist im Material- und Methodenteil detailliert aufgeföhrt (siehe Abschnitt 2.7.1.1). Für die Positivkontrollen wurden die PCR-Produkte des *vanA*- bzw. *vanB*-Gens in den Plasmidvektor pGL3-Basic kloniert (siehe Abschnitt 2.9).

Davon wurden 0,2 ng pro PCR-Ansatz verwendet. Eine Wasser-Kontrolle wurde als Negativkontrolle immer mitgeföhrt. Zur Kontrolle der universellen Bakterien-PCR (Kontroll-PCR) wurden 2,5 µl vorher isolierte DNS (siehe Abschnitt 2.10; entspricht 100 µg) eines VanA- bzw. VanB-negativem Kontrollisolat (VSE) verwendet. Zudem wurden 2,5 µl des zu untersuchenden Probenlysats eingesetzt (siehe Abschnitt 2.6).

Für die Ergebnisinterpretation war es des Weiteren notwendig, einen *cut-off* Wert festzulegen, d. h. einen Grenzwert oberhalb dessen die Probe als positiv bzw. unterhalb dessen die Probe als negativ zu werten ist. Die Grenzwerte wurden wie folgt gewählt: Auf der Basis aller erhobenen PCR-Messungen sowie der dazugehörigen Ergebnisse der kulturellen Resistenztestung wurden für die VanA/VanB-PCR am Rotor-Gene 0,06 Fluoreszenzeinheiten und für die Kontroll-PCR 0,05 Fluoreszenzeinheiten gewählt. Bei der VanA/VanB-PCR wurden alle 37 Zyklen in die Auswertung einbezogen. Bei der Kontroll-PCR erfolgte die Auswertung bis einschließlich Zyklus 32.

Grundlage hierfür war ein leichter Anstieg der emittierten Fluoreszenz ab Zyklus 33 bzw. 34 bis Zyklus 37 in der Wasser-Kontrolle, welcher nach Rücksprache mit dem Hersteller (Qiagen, Hilden, Deutschland) als Artefakt zu werten ist bzw. durch den Zerfall der Sonden oder durch Überstrahlung des gemessenen Kanals durch die emittierte Fluoreszenz eines anderen Kanals entstehen könnte. Ein PCR-Produkt in der Wasser-Kontrolle ließ sich mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nicht nachweisen.

Die nachstehende Abb. 4 zeigt exemplarisch einen Lauf mit den klonierten Plasmiden, Lysaten von sequenzierten das *vanA*- bzw. *vanB*-Gen besitzenden Enterokokken und einer Negativkontrolle mit H₂O. Es ist erkennbar, dass in der VanA-Positivkontrolle,

sowohl das Plasmid, als auch das Lysat einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz aufweisen. Analog lässt sich dies auch für die VanB-Kontrollen beobachten.

Ab dem 15. Zyklus (Ansatz mit dem das VanA-Fragment enthaltenden Plasmid) bzw. ab dem 11. Zyklus (Ansatz mit dem das VanB-Fragment enthaltenden Plasmid) lässt sich eine exponentielle Zunahme der gemessenen Fluoreszenz nachweisen. Der Fluoreszenzanstieg der entsprechenden Kontrolllysate mit dem jeweiligen sequenziertem *van*-Gen erfolgte ab dem 23. (VanA) bzw. 20. (VanB) Zyklus.

Bei der Kontroll-PCR beobachtete man bei dem VanA- bzw. VanB-negativem Kontrollisolat einen Fluoreszenzanstieg ab dem 12. Zyklus bzw. ab dem 20. Zyklus für die oben genannten Lysate. Ab Zyklus 31 kam es zum Erreichen einer Plateauphase (emittierte Fluoreszenz: > 0,225). Dieses VanA- bzw. VanB-negative Kontrollisolat zeigte keinen Anstieg der emittierten Fluoreszenz in der VanA- bzw. VanB-PCR.

Die entsprechenden VanA- oder VanB- positiven Kontrolllysate zeigten einen Anstieg in der Kontroll-PCR um Zyklus 20 bis 23. Bei den Plasmiden, mit Ausnahme des VanB-Plasmids (emittierte Fluoreszenz 0,07 bei Zyklus 32) und der H₂O-Negativkontrolle, kam es zu keinem Anstieg der emittierten Fluoreszenz in der Kontroll-PCR.

Mit dieser PCR konnte bei allen in der Stichprobe enthaltenen 197 VRE-Erstisolaten entweder das *vanA*- oder das *vanB*-Gen nachgewiesen werden und somit der Genotyp bestimmt werden. Es gab keinen Stamm bei dem sowohl das *vanA*-, als auch das *vanB*-Gen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus gab es keinen Stamm, der anhand der MHK Vancomycin-resistent gewesen wäre, aber in der PCR VanA/VanB negativ war (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Vierfeldertafel I. Dargestellt ist das Ergebnis der VanA-/VanB-PCR in Bezug auf die analysierten 197 VRE unter Angabe der falsch-negativen Ergebnisse.

	VanA	VanB	Gesamt
positiv	79	118	197
negativ	0	0	0
Gesamt	79	118	197

Zur Bestimmung der Falsch-Positiv-Rate wurde ein Kontrollkollektiv von 65 Vancomycin-sensiblen Enterokokken-Isolaten (43 *E. faecium*, 21 *E. faecalis*, 1 *E. avium*) aus Blutkulturen (N=61) bzw. von Katheterspitzen (N=4) mit der Multiplex-PCR überprüft. Bei keinem dieser Isolate kam es zum Nachweis des *vanA*-/*vanB*-Gens durch die Multiplex-

PCR. Alle Isolate waren Patientenbereinigt d. h. 1 Isolat pro Patient und stammten aus dem Jahr 2013. Folglich beträgt die mit Hilfe von Tab. 17 ermittelte Sensitivität und Spezifität 100 %.

Tab. 17: Vierfeldertafel II. Zusammenfassend dargestellt ist das Ergebnis der VanA/VanB-PCR in Bezug auf die analysierten 197 VRE und die 65 Vancomycin-sensiblen Enterokokken (VSE) des Kontrollkollektivs. Hierbei bedeutet positiv, dass das *vanA*- und/oder *vanB*-Gen durch die Multiplex-PCR nachgewiesen wurde.

	VRE	Kontrollkollektiv (VSE)	Gesamt
positiv	197	0	197
negativ	0	65	65
Gesamt	197	65	262

Alle PCR-Läufe wurden nur bei korrektem Ergebnis in den Kontrollproben als gültig gewertet.

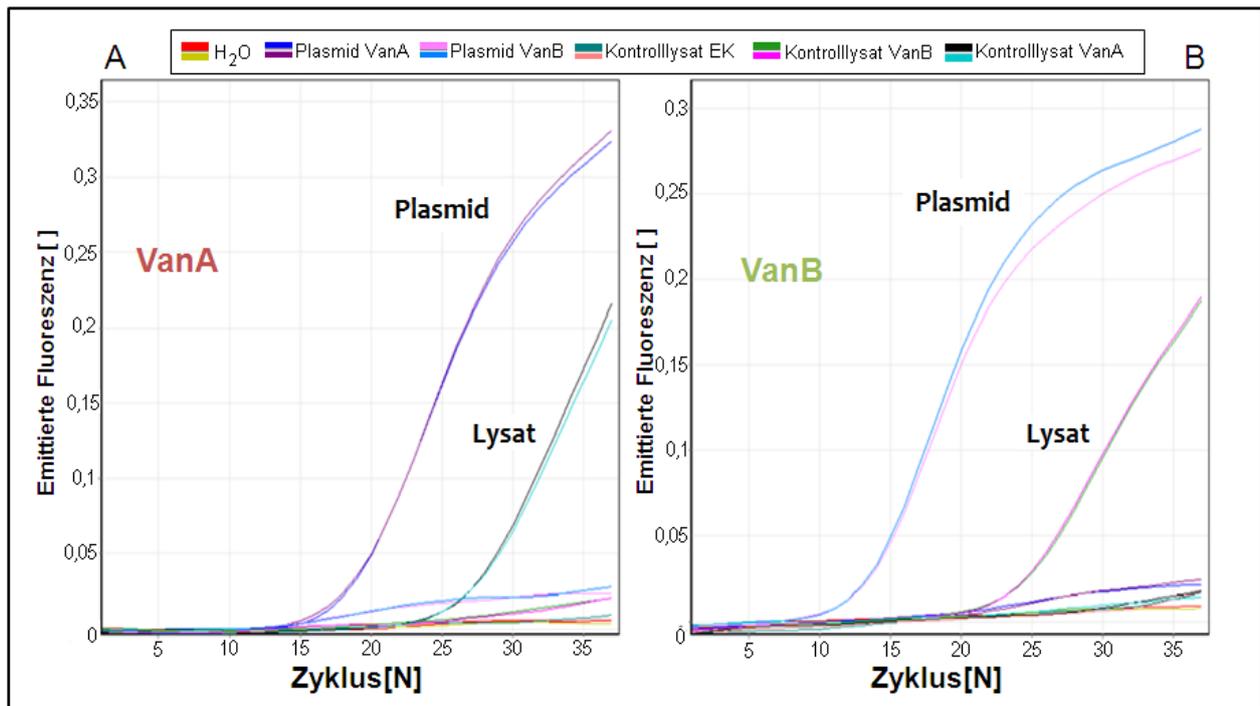


Abb. 4: Beispiellauf der VanA/VanB-Multiplex-PCR mit Kontrollplasmiden, Kontrolllysaten und H₂O als Negativkontrolle. Auf der x-Achse ist die Zyklusanzahl [N] auf der y-Achse die emittierte gemessene Fluoreszenz [ohne Einheit] aufgetragen. (A) Messung der emittierten Fluoreszenz der VanA-Sonde gegen die entsprechenden Kontrollproben pro Zyklus. (B) Messung der emittierten Fluoreszenz der VanB-Sonde gegen die entsprechenden Kontrollproben pro Zyklus. EK=Enterococcus.

3.1.2.2 Verteilung der VanA/VanB positiven VRE in den Kliniken

Die nachstehende Abb. 5 zeigt die mit Hilfe der Multiplex-PCR ermittelte Genotypenverteilung in den vom IMMIP versorgten Kliniken. Insgesamt ergab sich ein Verhältnis von 40 % (VanA, entsprechend 79 Isolaten) zu 60 % (VanB, entsprechend 118 Isolaten). Die verwendete Stichprobe bestand überwiegend aus *E. faecium* (N=196) und nur einem *E. faecalis*. Letzterer besaß den Genotyp VanA.

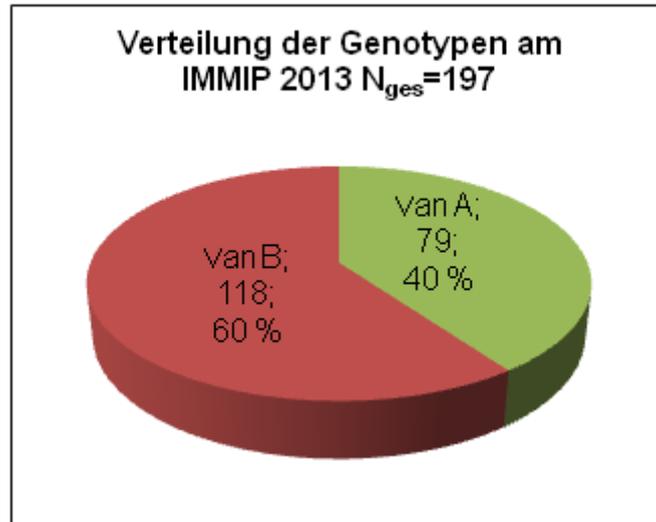


Abb. 5: Verteilung der Genotypen in den vom IMMIP versorgten Kliniken 2013 mit N_{ges}=197. Dargestellt sind der Genotyp, die Anzahl der Erstisolate mit dem entsprechenden Genotyp und der entsprechende prozentuale Anteil auf N_{ges}=197 bezogen. IMMIP= Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie des KMV.

Anschließend wurde das Verhältnis der Genotypen VanA gegenüber VanB an den 5 Kliniken mit den höchsten VRE Nachweiszahlen analysiert (Abb. 6).

Eine VanA/VanB-Ratio mit Werten von deutlich > 1 ist nur an folgenden Kliniken nachweisbar: Sonstige (1,778). Eine Dominanz von VanB ist in der medizinischen Klinik und Poliklinik II (0,632) und III (0,125), sowie in der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin (0,553), ein relativ ausgewogenes Verhältnis ist in der Klinik für Chirurgie (1,5) und in der medizinischen Klinik und Poliklinik I (1,25) zu erkennen.

Unter Sonstige sind die Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (1 Isolat (VanB)), Neurologie (1 Isolat (VanB)), Neurochirurgie (3 Isolate (VanA)), Orthopädie (1 Isolat (VanB)), Psychiatrie (1 Isolat (VanA)), Urologie (1 Isolat (VanA)), Unfallchirurgie (1 Isolat (VanA)), Kinderheilkunde (1 Isolat (VanB)), Kinderhämatologie (2 Isolate (VanA)), 1 Isolat (VanB)), sowie die Intensivstation des neurologischen Rehabilitationszentrums Godeshöhe (8 Isolate (VanA), 4 Isolate (VanB)) zusammengefasst.

Es ist somit ersichtlich, dass der Anteil VanB positiver VRE an der Klinik für Anästhesiologie und Operative Medizin, der Medizinischen Klinik und Poliklinik II und III größer ist als der VanA-Anteil.

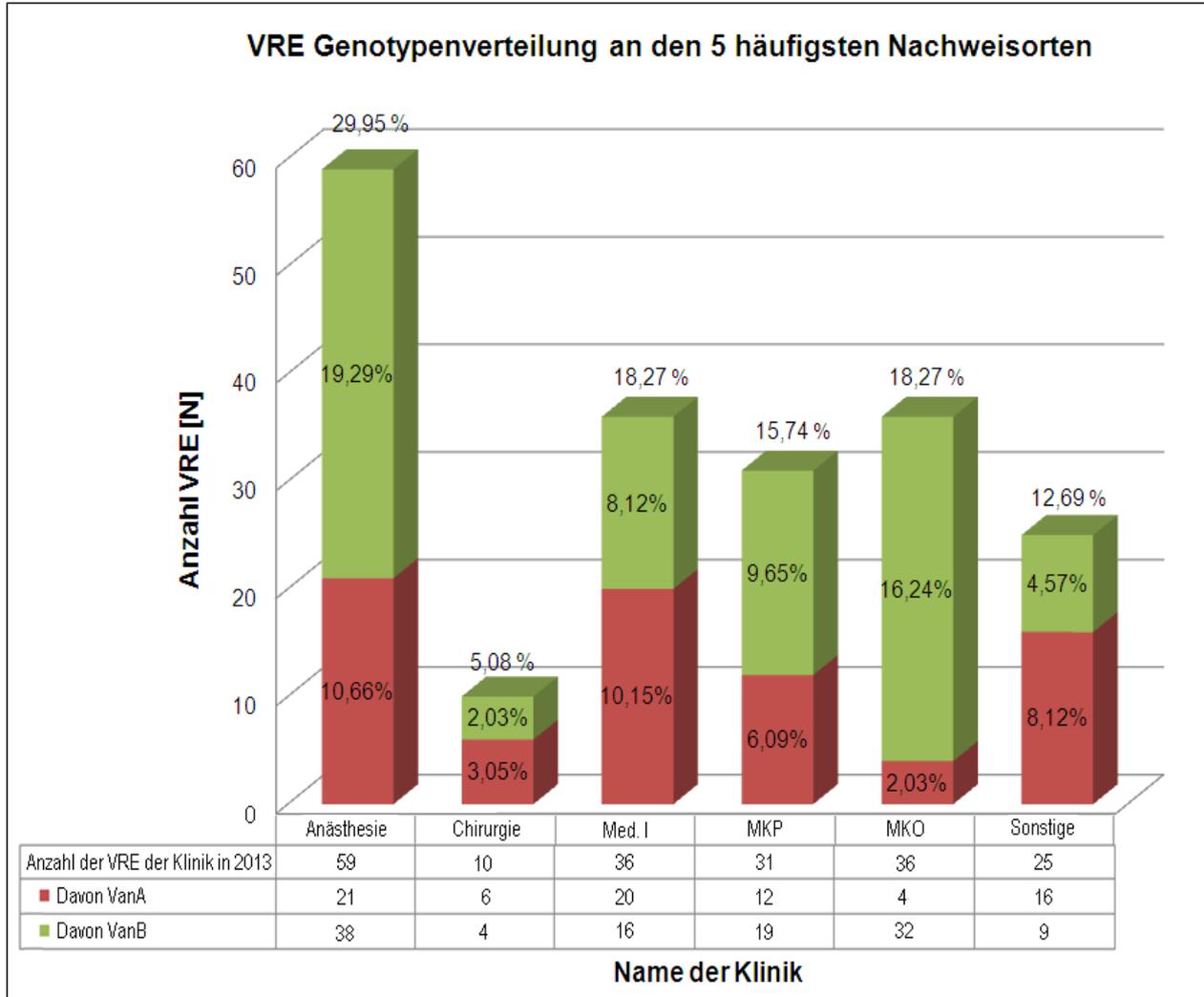


Abb. 6: VRE Genotypenverteilung der Isolate der Stichprobe an den 5 häufigsten Nachweisorten. Die dargestellten Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtheit der Stichprobe ($N_{\text{ges}}=197$). In der unter der Grafik in der Abb. stehenden Tab. ist die entsprechende Anzahl der Isolate (Gesamtanzahl, davon Genotyp VanA bzw. VanB) aufgeschlüsselt dargestellt. Med. I.=Medizinische Klinik und Poliklinik I; MKP=Medizinische Klinik und Poliklinik II; MKO=Medizinische Klinik und Poliklinik III. Unter Sonstige sind die Isolate aller übrigen Kliniken zusammengefasst. Alle Kliniken sind Teil des KMV.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie die saisonale Verteilung der Genotypen pro Monat des Jahres 2013 ungeachtet der Klinik im Verhältnis zueinander aussieht. Dies wird grafisch in Abb. 7 dargestellt. Es ist erkennbar, dass im Januar, Februar und Mai mehr VanA als VanB aufgetreten sind. Im Juni wurden hingegen nur VanB nachgewiesen. In der zweiten Jahreshälfte wird deutlich, dass in jedem Monat mehr Enterokokkenisolate

mit dem Genotyp VanB als mit dem Genotyp VanA vorhanden sind. Dieses Verhältnis wird im Juli 2013 besonders deutlich.

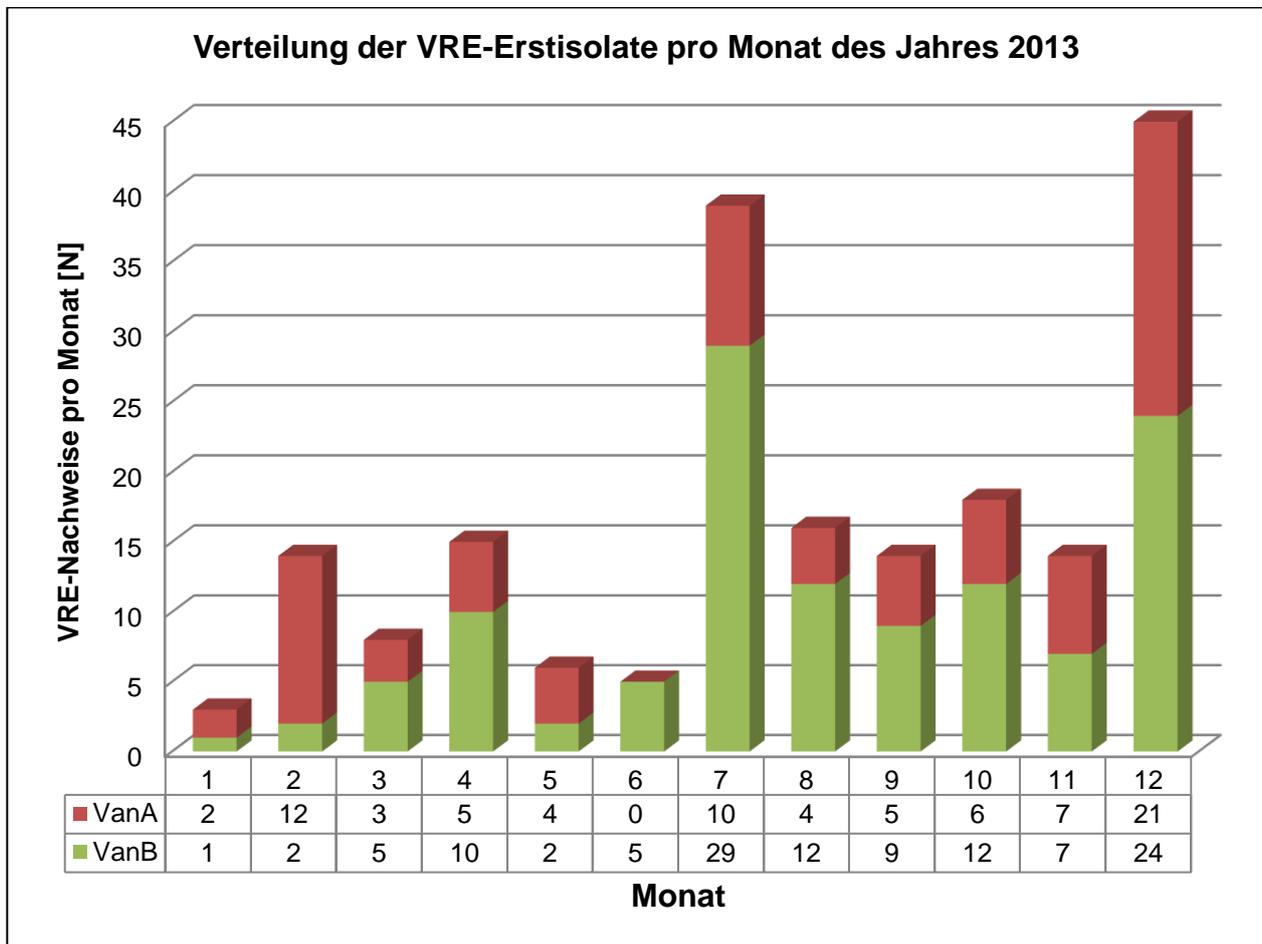


Abb. 7: Verteilung der VRE-Erstisolate der Stichprobe pro Monat des Jahres 2013. In der unter der Grafik stehenden Tab. ist die entsprechende Anzahl der Isolate (Genotyp VanA bzw. VanB) pro Monat aufgeschlüsselt dargestellt. Die Gesamtanzahl der Isolate beträgt $N_{\text{ges}}=197$.

Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses stellte sich die Frage nach der Verteilung der VRE-Erstisolate pro Monat pro Klinik des Jahres 2013, um ein differenzierteres Bild der VRE-Verteilung zu erhalten (siehe nachstehende Tab. 18).

Hierbei fiel auf, dass es je nach Klinik nicht jeden Monat zum Nachweis neuer VRE-Erstisolate bei Patienten kam, des Weiteren gab es deutliche Schwankungen der Häufigkeit. In der Klinik für Anästhesiologie traten gehäuft im Juli bis September und Dezember 2013 VRE-Erstisolaten auf. In der Medizinischen Klinik und Poliklinik I traten hingegen VRE-Erstisolate vermehrt im Februar, Juli und Dezember, in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II besonders im September, sowie Dezember und in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III vermehrt im Februar, April, Juli, Oktober bzw. Dezember auf.

Tab. 18: Verteilung der VRE-Erstisolate der Stichprobe pro Monat pro Klinik. Dargestellt ist in welcher Klinik, in welchen Monaten des Jahres 2013 VRE-Erstisolate nachgewiesen wurden. Isolate der zusätzlich grau hinterlegten Kliniken wurden in einem weiteren Teil der Arbeit typisiert.

Klinik	Monate des Jahres 2013											
	Jan.	Febr.	März	Apr.	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.
Klinik für Anästhesiologie												
Klinik und Poliklinik für Chirurgie												
Intensivstation des neurologischen Rehabilitationszentrums Godeshöhe												
Kinderklinik												
Kinderhämatologie												
Medizinische Klinik I												
Medizinische Klinik II												
Medizinische Klinik III (Onkologie)												
Klinik für Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie												
Neurologische Klinik und Poliklinik												
Neurochirurgische Klinik												
Klinik und Poliklinik für Orthopädie												
Klinik für Psychiatrie												
Klinik und Poliklinik für Urologie												
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie												

3.1.3 Molekulare Typisierung der VRE

3.1.3.1 Etablierung der rep-PCR zur Typisierung der Enterokokken

Das Ziel der mittels rep-PCR und Diversilab durchgeführten Typisierung ist die Erstellung eines einzigartigen molekularen Fingerabdrucks und dadurch die Eröffnung der Möglichkeit eines Vergleichs zwischen Isolaten untereinander (siehe Abschnitt 2.10). Somit ergibt sich die Möglichkeit Hinweise auf Transmissionen zu erhalten oder ebendiese auszuschließen, besonders in Kombination mit Informationen über Patientenbewegungen durch das Krankenhausinformationssystem ORBIS. Es wurden alle in Abschnitt 2.10 erwähnten Isolate typisiert. Folglich besteht nun erstmals die Möglichkeit, die oben erwähnte Frage für das KMV zu evaluieren.

Als Grenzwert zur Diskriminierung wurde 95 % Homologie angelegt, um Hinweise auf mögliche Transmissionen zu erhalten. Zur detaillierten Analyse im Hinblick auf Transmissionen wurde 98 % Homologie als Grenzwert benutzt.

3.1.3.2 Typisierung ausgewählter VRE-Erstisolate und Korrelation mit der VanA/VanB-PCR

Da der Großteil der VRE-Erstisolate der Stichprobe von den Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II von der Intensivstation derselben stammte (N=38 bei N_{ges}=67 (entsprechend 56,71 %)), stellte sich die Frage nach möglichen Ähnlichkeiten von Isolaten verschiedener Patienten. Deshalb erfolgte die Typisierung aller VRE-Erstisolate der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II. Die folgende Abb. 8A stellt das Ergebnis unter zusätzlicher Angabe des Genotyps dar.

Anhand der Grafik wird deutlich, dass es 7 Cluster gibt, die ≥ 2 Stämme enthalten, welche ≥ 95 % homolog sind. Des Weiteren gibt es 5 Stämme, die zu den übrigen Isolaten keine Homologie ≥ 95 % aufweisen. Für die Korrelation zwischen den Ergebnissen den VanA/VanB-PCR und der rep-PCR gilt, dass alle Stämme der Cluster 2, 3 (VanA), 6, 7 (VanB) den gleichen Van-Genotyp besaßen. Bei den übrigen Clustern (1, 4, 5), in denen sowohl VanA als auch VanB als Genotyp vorkam, betrug die Homologie ≥ 95 % aber < 98 %. Gleichwohl ist erkennbar, dass innerhalb dieser Cluster nur Isolate mit einer Homologie ≥ 98 % denselben Genotyp besaßen.

Folgende Isolate besitzen in Abb. 8A eine Homologie von ≥ 98 %: Nr. 173 und Nr. 169 (Cluster 2), Nr. 103, 100, 102, und Nr. 53 (Cluster 3), Nr. 136, 66, und 133 (Cluster 4), Nr. 150, 135, 159, 154, sowie Nr. 138 und Nr. 86 (Cluster 5), Nr. 104, Nr. 93 und Nr. 31 (Cluster 6) und Nr. 175, 174, 179, 172, 170, sowie Nr. 182 (Cluster 7).

Bezugnehmend auf die Ergebnisse dieser Abb. erfolgte eine quartalsweise Analyse dieser Isolate mit der Frage nach Clustern von Isolaten mit einer Homologie ≥ 98 %.

Abb. 9 stellt das erste bis vierte Quartal des Jahres 2013 dar.

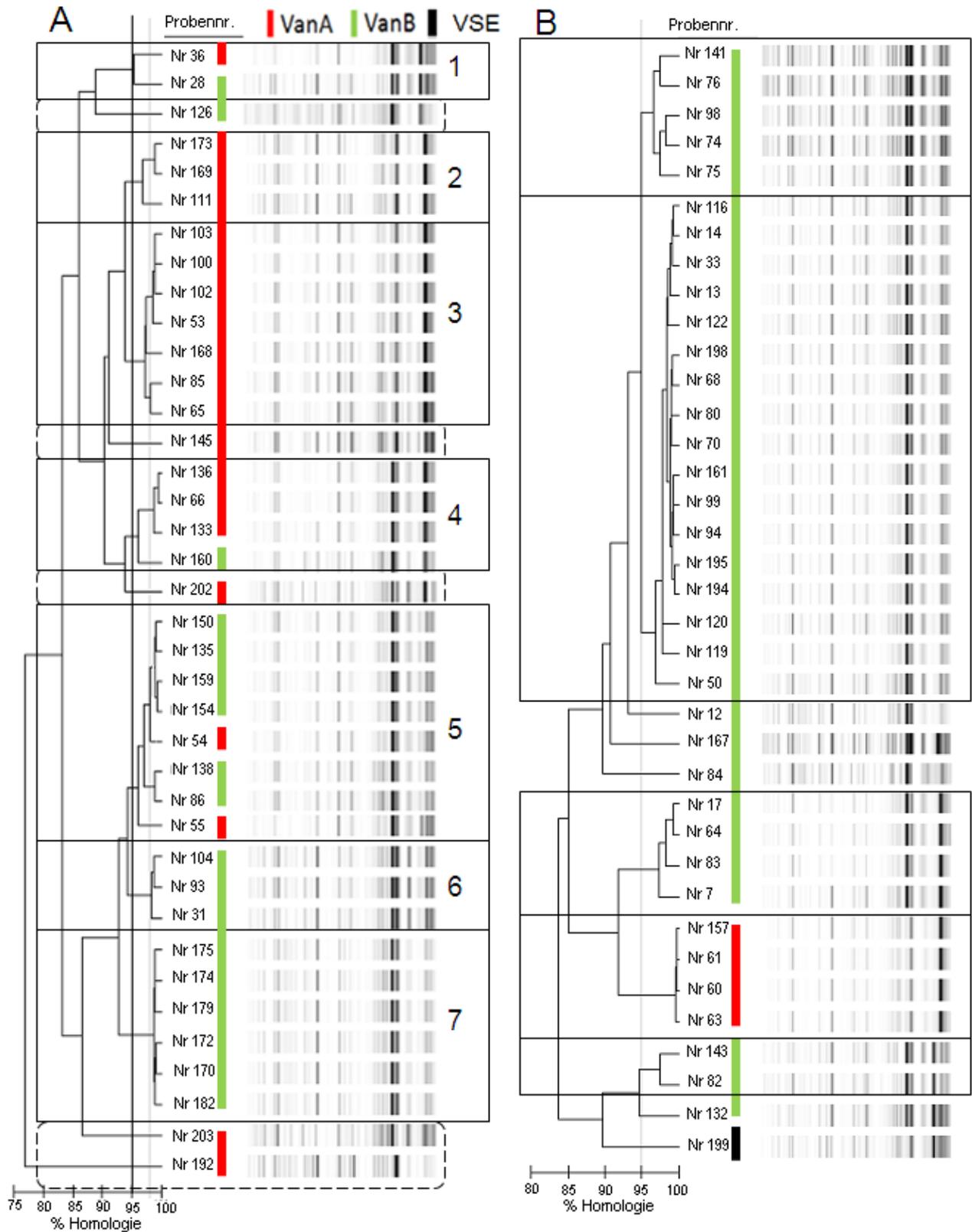
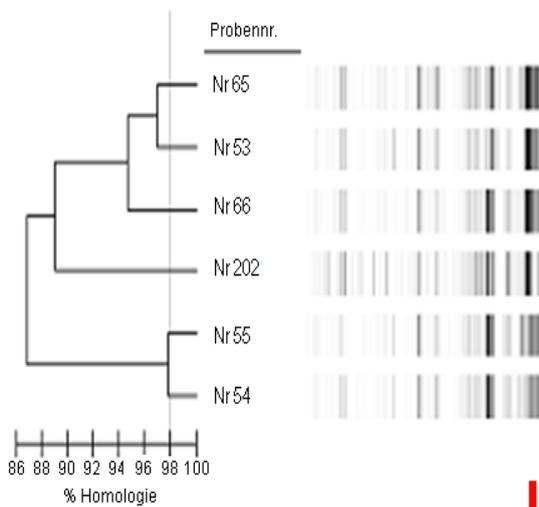
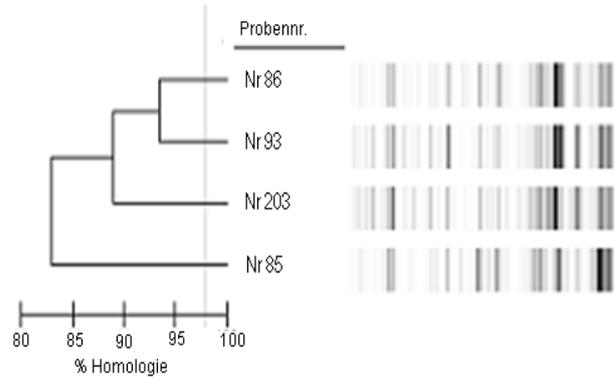


Abb. 8: Ergebnis der molekularen Typisierung ausgewählter VRE-Erstisolate. (A) Molekulare Typisierung aller VRE-Erstisolate der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II der Stichprobe. $N_{ges}=38$. Cluster mit ≥ 95 % Homologie sind von Rechtecken umrahmt. Stämme mit Homologien < 95 % sind mittels gestrichelter Linien hervorgehoben. (B) Molekulare Typisierung aller VRE-Erstisolate der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Stichprobe. $N_{ges}=37$. Cluster mit ≥ 95 % Homologie sind von Rechtecken umrahmt. Der Van-Genotyp (VanA bzw. VanB) ist farblich hinter der Probennummer dargestellt.

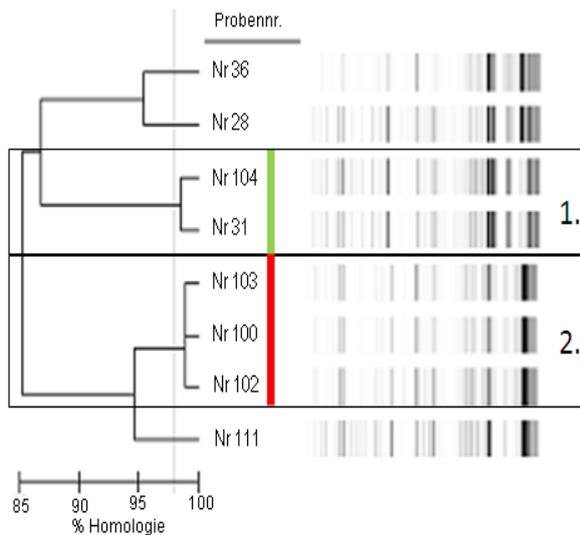
A 1. Quartal 2013



B 2. Quartal 2013



C 3. Quartal 2013



D 4. Quartal 2013

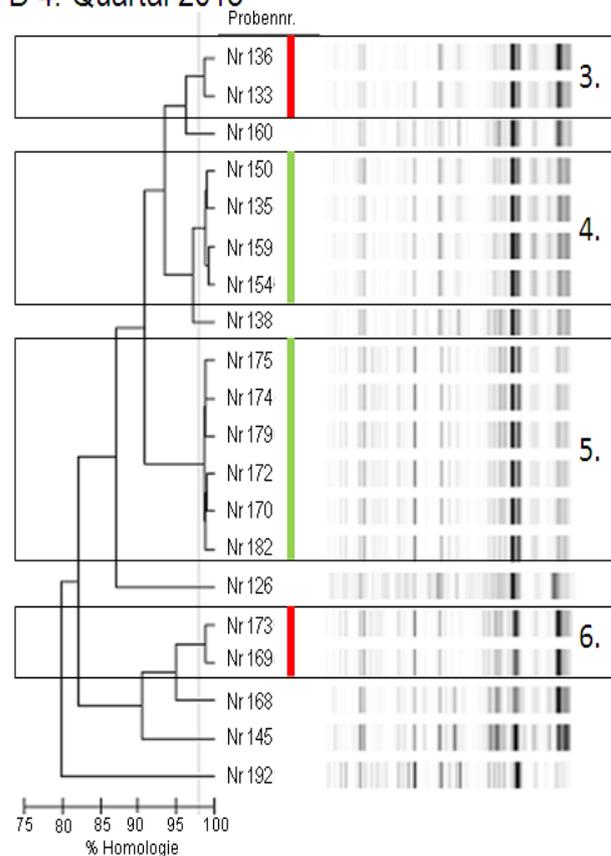


Abb. 9: Quartalsweise Analyse der molekularen Typisierung der VRE-Erstisolate der Intensivstationen der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II. Dargestellt sind die 4 Quartale des Jahres 2013 (A bis D). Cluster mit Isolaten mit einer Homologie ≥ 98 % sind umrahmt dargestellt und nummeriert (1-6). Der Van-Genotyp (VanA bzw. VanB) ist farblich hinter der Probennummer dargestellt.

Im ersten und zweiten Quartal gibt es keine Cluster ≥ 98 % (Nr. 55 und Nr. 54 weisen eine Homologie von 97,8 % auf). Im dritten und vierten Quartal gibt es 6 Cluster mit Homologien ≥ 98 %. Für die Homologien der einzelnen Stämme innerhalb eines Clusters zueinander siehe Tab. 19.

Tab. 19: Homologie der einzelnen Stämme innerhalb eines Clusters zueinander. Angegeben ist die niedrigste Homologie zwischen Stämmen der in Abb. 9 markierten Cluster.

Nummer des Clusters	Homologie (%)
1	≥ 99
2	≥ 98,6
3	≥ 98,7
4	≥ 98,8
5	≥ 99
6	≥ 98,8

3.1.3.3 Clusteranalyse durch Nachverfolgung von Patientenbewegungen

Durch die oben beschriebenen und in Abb. 9 gezeigten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die entsprechenden Patienten räumlich oder zeitlich in Kontakt miteinander gestanden haben. Dazu wurde mit Hilfe des Krankenhausinformationssystems ORBIS und eines Lageplans der entsprechenden Station (siehe Anhang) die Zeit, sowie die Position jedes einzelnen Patienten dieser Clusters analysiert. In Tab. 20 sind diese Daten dargestellt.

In Cluster 1 ist kein zeitlicher Zusammenhang der Patienten erkennbar, jedoch besteht ein räumlicher Zusammenhang zwischen IMC II und IMC III.

Für Cluster Nr. 2 gilt: Nr. 102 war bereits im Aufnahmescreening positiv. Deshalb handelt es sich um einen mitgebrachten VRE. Bei Nr. 103, Nr. 100 gab es kein Vorscreening, deshalb ist die Analyse besonders bei Nr. 100 erschwert. Bei diesem wurde erst 1,2 Monate nach Aufnahme auf die Intensivstation ein Screening auf VRE mit VRE-Nachweis durchgeführt. Eine eindeutige Analyse ist hier nicht möglich.

Für Nr. 133 und 136 (Cluster 3) wurde der VRE-Nachweis innerhalb der ersten 11 Tage bzw. 24 h nach Aufnahme auf die Intensivstation erbracht. Es besteht ein räumlicher (IMC II B05 und IMC III B09) und ein zeitlicher Zusammenhang (25.11.13 und 29.11.13).

Auch in Cluster 4 besteht die Schwierigkeit der Analyse, da nicht bei allen Patienten ein Vorscreening vorgenommen wurde. Nr. 150, Nr. 154 besitzen negative Vorscreenings. Dadurch gilt es als sicher, dass sie den VRE erworben haben. Zur zeitlichen Situation: Nr. 159, 154, 150 befanden sich zur gleichen Zeit auf der Intensivstation, der Intensiv-aufenthalt von Nr. 135 endete Tage vor der Aufnahme von Nr. 159 und Nr. 154, jedoch befanden sich Nr. 135 und Nr. 150 gleichzeitig auf der Intensivstation. Eine zu diesem Zeitpunkt bereits bestehende Kolonisation von Nr. 135 lässt sich auf Grund eines

fehlenden Vorscreenings nicht beweisen bzw. ausschließen. Fest steht, dass Nr. 150 (ITC 005) und Nr. 154 (ITC 004) sich in direkt benachbarten Zimmern befanden und somit durch dieselbe Pflegekraft versorgt wurden. Analoges gilt für Nr. 135 und Nr. 159 (IMC II und IMC III). Ein direkter räumlicher Zusammenhang bei dem alle 4 Patienten zum gleichen Zeitpunkt benachbart gelegen haben, lässt sich nicht feststellen. Durch das nicht erfolgte Eingangsscreening kann zudem nicht geklärt werden, ob Nr. 135 den VRE initial mitgebracht hat oder nicht.

Bei dem 5. Cluster handelt es sich mit 6 Patienten um das größte Cluster. Es lässt sich kein räumlicher und zeitlicher Zusammenhang zwischen allen Patienten gleichzeitig finden. Fehlende Vorscreenings bei Nr. 175, 179, 174, 182 erschweren die Analyse. Hingegen ist bei Nr. 172 sicher, dass es sich um eine während des Aufenthaltes erworbene Kolonisation handelt. Zudem fand bei Nr. 174 und 182 erst nach 21 bzw. 8 Tagen Aufenthalt auf der Intensivstation das erste Screening, bei dem es auch zum Nachweis des VRE kam, statt.

Wie in der Tab. ersichtlich, befanden sich Nr. 172, 175, 179 zur selben Zeit und zum Zeitpunkt des Nachweises schon seit längerem auf der Intensivstation und lagen zudem noch in benachbarten Zimmern (ITC 009 - 011).

Bei Nr. 174 und 170 lässt sich auch ein räumlicher und zeitlicher Zusammenhang nachweisen. Bei beiden wurde die Probe am selben Tag entnommen und beide lagen zu diesem Zeitpunkt in benachbarten Betten im selben Zimmer (IMC III B09 und B10). Zudem gibt es bei Nr. 170 ein negatives Vorscreening, sodass von einer erworbenen Besiedelung ausgegangen werden sollte.

Kein zeitlicher Zusammenhang besteht zwischen Nr. 182 und den übrigen Isolaten des Clusters (Oktober gegenüber Dezember), besonders da Nr. 170 und 172 negative Vorscreenings besitzen zu einem Zeitpunkt als sich Nr. 182 nicht mehr als Patient im KMV befand.

Durch dieses Analyseergebnis lässt sich eine Übertragung nicht restlos ausschließen.

Auch die Patienten des 6. Clusters befanden sich zur selben Zeit, als es zum Nachweis der VRE kam, auf der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II. Es besteht somit ein zeitlicher Zusammenhang. Nr. 169 war negativ auf VRE getestet worden, für Nr. 173 gibt es kein Vorscreening und das erste dann direkt positive Screening erfolgte erst nach ca. 2 Wochen Aufenthalt auf der Intensivstation. Einen

direkten räumlichen Zusammenhang zwischen den beiden Patienten gibt es nicht (ITC 004 und IMC II B05).

Tab. 20: Daten für die Clusteranalyse. Aufgelistet sind die Clusternummer, die Patientennummer, Vorscreenings, das Datum der Entnahme der positiven Probe, der Aufenthaltszeitraum im KMV (Aufenthalt davon auf der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II) und die Zimmernummer auf der Intensivstation aller fraglichen Isolate mit einer Homologie $\geq 98\%$ (siehe Abb. 9). In Fett markiert ist das Zimmer, in dem die positive Probe entnommen wurde. pos.=positiv, neg.=negativ.

Clus-ternr.	Patient-enr.	Vorscreening	Datum der pos. Probe	Aufenthalt im KMV (davon Aufenthalt auf der Intensivstation)	Zimmernummer auf der Intensivstation (Zeitraum)
1	104	24.06.13 neg. für VRE	04.07.13	12.06.13-17.07.13 (12.06-08.07.13)	IMC III B09 (12.06-08.07.13)
	31	02.08.13 neg. für VRE	19.08.13	25.07-09.09.13 (02.-24.08.13)	IMC II B06 (02.-23.8.13) ITC 011 (23-24.08.13)
2	103	Kein Vorbefund	06.07.13	03.07.-08.08.13 (03-17.07.13)	IMC II B07 (03.-08.07.13) IMC III B12 (08-14.07.13) ITC 005 (14.-17.07.13)
	102	Kein Vorbefund	02.07.13	02.-16.07.13 (02.-08.07.13)	ITC 014 (02-04.07.13) IMC II B05 (04.-07.07.13) ITC 002 (07.-08.07.13)
	100	Kein Vorbefund	02.07.13	25.05.-06.07.13 (25.05.-06.07.13)	ITC 002 (25.05.-06.07.13)
3	136	31.07.13 Neg. Vorscreening	29.11.13	29.11-06.12.13 (29.11.-03.12.13)	IMC II B05 (29.11.-03.12.13)
	133	20.11.13 Neg. Vorscreening	25.11.13	14.11.-09.12.13 (20.11.-09.12.13)	IMC III B09 (20.-30.11.13) ITC 006 (30.11.-09.12.13)
4	135	Kein Vorbefund	30.11.13	28.11.-06.12.13 (30.11.-04.12.13)	IMC III B09 (30.11-02.12.13) ITC 012 (02.-04.12.13)
	159	Kein Vorbefund	13.12.13	14.11.-06.12.13 (Voraufenthalt im KMV) 13.12.13-06.01.14 (13.12.13)	IMC II B07 (13.12.13)
	150	26.11.13 Anal VRE neg.	05.12.13	28.08.13-30.01.14 (05.-06.09.13; 21.09.-29.10.13; 04.11.13-30.01.14)	ITC 005 (04.11.13-30.01.14)
	154	26.11.13 VRE-Vorscreening neg.	10.12.13	05.-17.12.13 (05.-10.12.13)	ITC 004 (05.-10.12.13)
5	175	Kein Vorbefund	24.12.13	01.12.13-05.01.14 (24.12.13-05.01.14)	ITC 011 (24.12.13-05.01.14)
	179	Kein Vorbefund	28.12.13	21.12.13-17.01.14 (28.12.13-01.01.14)	ITC 010 (28.12.13-01.01.14)
	172	18.12.13 VRE-Vorscreening neg.	23.12.13	08.12.13-16.01.14 (09.-13.12.13; 18.12.13-10.01.14)	ITC 010 (09.-13.12.13) ITC 009 (18.12.13-10.01.14)
	174	Kein Vorbefund	23.12.13	03.-26.12.13 (03-19.12.13; 20.-25.12.13)	IMC III B10 (03-19.12.13) IMC III B09 (20.-25.12.13)
	170	19.11.13 VRE-Vorscreening neg.	23.12.13	23.12.13-14.03.14 (23.12.-06.02.14)	IMC III B10 (23.-28.12.13) ITC 008 (28.12.13-06.02.14)
	182	Kein Vorbefund	23.10.13	16.-29.10.13 (16.-29.10.13)	IMC II B05 (16.-29.10.13)
6	169	25.10.13 VRE-Vorscreening neg.	23.12.13	22.12.13-07.01.14 (22.-24.12.13)	ITC 004 (22.-24.12.13)
	173	Kein Vorbefund	23.12.13	07.-27.12.13 (07.-27.12.13)	IMC II B05 (07.-26.12.13) ITC 010 (26.-27.12.13)

Um der Frage eines möglichen Datenverlustes durch die quartalsweise Darstellung der Daten (siehe Abb. 9) aus Abb. 8A nachzugehen, erfolgte eine zusätzliche Analyse von weiteren Isolaten unter Berücksichtigung der entsprechenden Informationen (quartalsübergreifende Cluster mit einer Homologie von $\geq 98\%$). Die dafür zusätzlich benötigten Daten wurden mit Hilfe des Krankenhausinformationssystems ORBIS und eines Lageplans der Station erhoben und sind in Tab. 25 (siehe Anhang) dargestellt.

Demzufolge stellt sich die Frage nach einem räumlichen und zeitlichen Zusammenhang zwischen Nr. 93 (2. Quartal 2013) und dem 1. Cluster (Abb. 9C), Nr. 53 (1. Quartal 2013) und dem 2. Cluster (Abb. 9C), Nr. 66 (1. Quartal 2013) und dem 3. Cluster (Abb. 9D), sowie Nr. 86 (2. Quartal) und Nr. 138 (4. Quartal 2013).

Zwischen Nr. 93 (2. Quartal 2013) und dem 1. Cluster (Abb. 9C, bestehend aus Nr. 31 und Nr. 104) lässt sich ein zeitlicher Zusammenhang nachweisen. Es fällt auf, dass durch Nr. 93 (Aufenthalt auf der Intensivstation vom 14.06.-15.08.13) eine Verbindung der Intensivaufenthalte von Nr. 31 (02.-24.08.13) und Nr. 104 (12.06.-08.07.13) entsteht. Außerdem lag Nr. 93 sowohl in IMC II als auch in IMC III. Folglich besteht ein räumlicher und zeitlicher Zusammenhang. Erschwerend für die Beurteilung sind fehlende Vorscreenings von Nr. 93.

Zwischen Nr. 53 (1. Quartal 2013) und dem 2. Cluster (Abb. 9C; Nr. 103, 102, 100) lässt sich hingegen kein zeitlicher und räumlicher Zusammenhang nachweisen. Zwar lag Nr. 53 auch in IMC II, genau wie Nr. 103 und 102, jedoch waren beide bereits vorher positiv auf VRE getestet worden.

Auch zwischen Nr. 66 (1. Quartal 2013) und dem 3. Cluster (Abb. 9D; Nr. 133 und 136) lässt sich kein zeitlicher Zusammenhang nachweisen. Dennoch fällt auf, dass Nr. 66 im 1. Quartal sowohl in IMC II (wie Nr. 136) als auch in IMC III (wie Nr. 133) gelegen hat.

Zwischen Nr. 86 (2. Quartal) und Nr. 138 (4. Quartal 2013) besteht kein zeitlicher Zusammenhang. Hingegen lagen beide kurzzeitig in IMC III. Durch das positive Eingangsscreening von Nr. 138 ist die Analyse erschwert. Dennoch ist eine Übertragung möglich, da sich Nr. 138 bereits im Oktober auf der Intensivstation aufgehalten hat und im Rahmen dieses Aufenthaltes kein VRE-Screening stattgefunden hat. Eine Transmission kann somit nicht restlos ausgeschlossen werden.

3.1.3.4 Typisierung der VRE des Kontrollkollektivs und Korrelation mit der VanA/VanB-PCR

Durch die beschriebenen Ergebnisse kam die Vermutung auf, dass es endemische Stämme in der Umgebung des KMV geben könnte, die zu einem hohen Eintrag von „außerhalb“ führen und zusammen mit einzelnen Übertragungen innerhalb des KMV für die Zahl der VRE verantwortlich sein könnten.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zusätzlich noch alle VRE-Erstisolate der Medizinischen Klinik und Poliklinik III typisiert und mit dem obigen Patientenkollektiv verglichen (siehe Abschnitt 3.1.3.5).

Grund für diese Klinikauswahl war das völlig unterschiedliche Patientenspektrum (Hämatookologie) im Vergleich mit dem der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II und somit ein fast vollständig getrenntes Patientengut für die folgende Analyse. Zudem besteht die Besonderheit, dass die Medizinische Klinik und Poliklinik III räumlich komplett von der Medizinischen Klinik und Poliklinik I bzw. II und deren Intensivstation getrennt ist und auch regelmäßig VRE-Screenings im Rahmen des stationären Aufenthalts durchführt. Somit findet kein Austausch von Patienten in diesem Zusammenhang unter normalen Bedingungen statt.

Abb. 8B zeigt die Typisierung von allen Erstisolaten der Medizinischen Klinik und Poliklinik III untereinander. Es fällt auf, dass es 5 Cluster mit Homologien $\geq 95\%$ gibt. Des Weiteren gibt es innerhalb jedes dieser 5 Cluster auch Isolate, die eine Homologie von $\geq 98\%$ zueinander aufweisen. Auf eine Analyse wurde verzichtet, da Patienten mehrfach pro Jahr in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III behandelt werden (teilweise mehr als 4 Mal). Aufgrund dieses Umstandes ist eine manuelle Analyse nach obigem Beispiel, besonders des 2. Clusters mit 17 Patienten, nicht möglich.

Bei der Analyse der Korrelation der Ergebnisse der molekularen Typisierung mit den Ergebnissen der VanA/VanB-PCR ist erkennbar, dass alle VRE eines Clusters denselben Genotyp besitzen (siehe Abb. 8B).

3.1.3.5 Klinikübergreifende Analyse der Typisierung der VRE

Abb. 10 zeigt den Vergleich der Typisierungsergebnisse zwischen den Isolaten der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II (Intensivstation) mit denen der Medizinischen Klinik und Poliklinik III.

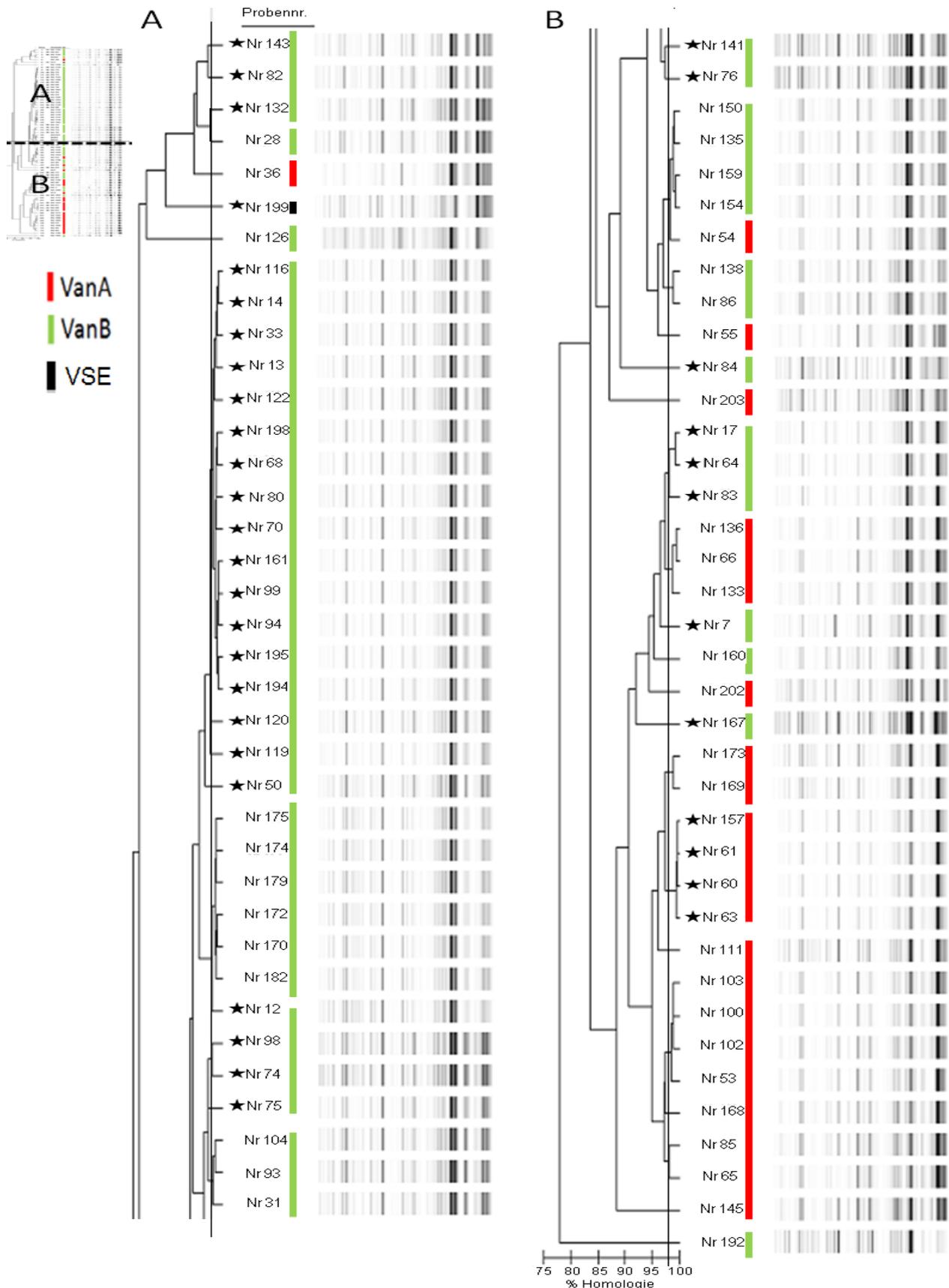


Abb. 10: Ergebnis der molekularen Typisierung der VRE-Erstisolate der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I, II (nur Intensivstation) und III (mit Stern markiert). Der Van-Genotyp (VanA bzw. VanB) der entsprechenden Isolate ist farblich hinter der Probennummer dargestellt. Aufgrund der Größe der Abb. erfolgte zur besseren Übersicht eine Teilung in Teil A (ursprünglich oberer Teil) und B (ursprünglich unterer Teil).

Es finden sich keine Homologien $\geq 98\%$ zwischen den Isolaten der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II und denen der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, somit lassen sich keine klinikübergreifenden Cluster nachweisen.

3.2 Linezolid-resistente Enterokokken am KMV

3.2.1 Überprüfung der Enterokokken auf Linezolidresistenz

Im Zeitraum Februar 2013 bis Februar 2014 wurden 14 Linezolid-resistente Enterokokkenstämme asserviert. Mit Hilfe des VITEK2, des E-Tests und Linezolid-haltiger ÜNK wurden Enterokokken auf ihre MHK und somit auf das Vorliegen einer phänotypischen Linezolidresistenz getestet (siehe Abschnitt 2.4, 2.5). Gemäß den aktuellen EUCAST-Richtlinien gelten Enterokokken mit einer MHK $> 4 \mu\text{g/ml}$ als resistent und mit einer MHK ≤ 4 als sensibel (EUCAST, 2014).

In der nachfolgenden Tab. 21 sind alle Linezolid-resistenten Enterokokkenisolate aufgelistet. Alle 14 Isolate wiesen eine MHK $> 8 \mu\text{g/ml}$ auf. Die durchschnittliche mittels E-Test ermittelte MHK betrug $17,4 \mu\text{g/ml}$. Das Isolat Nr. 203 wies die höchste MHK ($48 \mu\text{g/ml}$) auf. Übernachtkulturen mit 4 und $8 \mu\text{g/ml}$ Linezolid zeigten bei allen Isolaten eine MHK $> 8 \mu\text{g/ml}$ an. Bei den analysierten Isolaten handelte es sich vorwiegend um *E. faecium* und nur einen *E. faecalis*. Letzter war Vancomycin-sensibel und seine Linezolid-MHK im E-Test betrug $24 \mu\text{g/ml}$.

Insgesamt wiesen 11 der 14 Isolate zusätzlich zur Linezolidresistenz noch eine Vancomycinresistenz auf. Die VanA/VanB-Ratio betrug 1,2 (6 VanA, 5 VanB).

Tab. 21: Linezolid-resistente Enterokokken. Aufgelistet sind die Bezeichnung des Isolats, die Resistenz, die MHK (Linezolid), der Resistenzmechanismus gegen Linezolid und die Enterokokkenart. Gekennzeichnete (*) Isolate sind Vancomycin-sensibel und Linezolid-resistent. ÜNK=Übernachtskultur, MHK=minimale Hemmkonzentration.

Nr. des Isolats	Resistenz		MHK ($\mu\text{g/ml}$)		Resistenzmechanismus		Enterokokkenart
	Vancomycin (Genotyp)	Linezolid	E-Test	ÜNK	23S	CFR	
3	X (VanB)	X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
12	X (VanB)	X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
66	X (VanA)	X	16	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
75	X (VanB)	X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
162	X (VanA)	X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
207*		X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
199*		X	16	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
200*		X	24	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecalis</i>
201	X (VanB)	X	16	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
202	X (VanA)	X	12	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
203	X (VanA)	X	48	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
204	X (VanA)	X	32	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
205	X (VanB)	X	8	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>
206	X (VanA)	X	32	≥ 8	G2576T pos.	CFR neg.	<i>E. faecium</i>

Abb. 11 zeigt die Verteilung der Isolate auf die einzelnen Kliniken. Es wird deutlich, dass die meisten Isolate von der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin (N=5; 36 %), gefolgt von der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (N=4; 29 %) und III (N=3; 21 %) stammen.

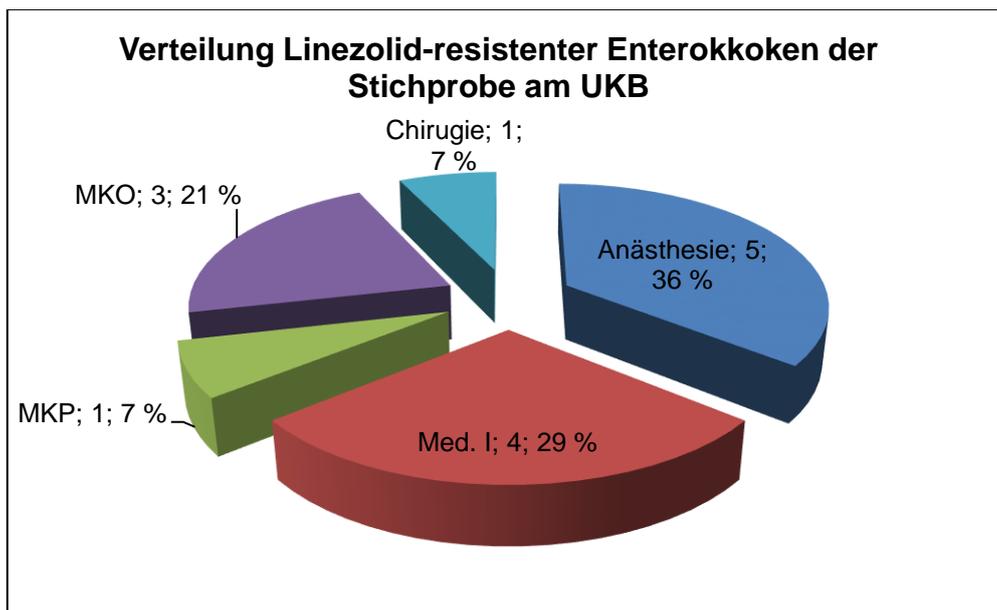


Abb. 11: Verteilung Linezolid-resistenter Enterokokken der Stichprobe am KMV. Dargestellt ist der Name der Klinik, die Anzahl der Isolate, sowie der prozentuale Anteil auf $N_{\text{ges}}=14$ bezogen. Med. I.=Medizinische Klinik und Poliklinik I; MKP=Medizinische Klinik und Poliklinik II; MKO=Medizinische Klinik und Poliklinik III. Alle Kliniken sind Teil des KMV.

3.2.2 Überprüfung der molekularen Ursache für die Linezolidresistenz

Eine Überprüfung der Isolate auf das Vorliegen des *cfr*-Gens als molekularen Resistenzmechanismus erfolgte mit Hilfe der PCR unter den in Material & Methoden beschriebenen Bedingungen (siehe Abschnitt 2.7; für Primer siehe Tab. 8). Die *cfr*-PCR wurde mit Hilfe einer Positiv- und einer Negativkontrolle auf ihre Gültigkeit überprüft. Ihre Auswertung erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese unter den vorgenannten Bedingungen (siehe Abschnitt 2.8). Die Positivkontrolle war hierbei ein *cfr*-positiver wildtyp Enterokokken-Stamm (Bereitstellung durch Herrn PD Dr. Werner (RKI Wernigerode)).

Bei keinem Isolat konnte das *cfr*-Gen nachgewiesen werden (siehe Tab. 21).

In einem weiteren Schritt erfolgte die Überprüfung der Linezolid-resistenten Enterokokken auf Mutationen in der DNS-Sequenz für die Domäne V der 23S rRNA mittels PCR (siehe Abschnitt 2.7.1) und anschließender Sequenzierung des Amplikons. Es konnte gezeigt werden, dass alle 14 Enterokokken-Isolate die genomische Mutation G2576T in mindestens einem der sechs Allele der DNS-Sequenz für die Domäne V der 23S rRNA trugen (siehe Tab. 21). Weitere Mutationen, wie z. B. die G2447T, C2461T,

T2500A, A2503G, T2504C oder die G2505A konnten bei keinem der Isolate nachgewiesen werden.

3.2.3 Molekulare Typisierung der Linezolid-resistenten Enterokokken

Um der Frage nach möglichen Transmissionen bzw. Stammverwandtschaften nachzugehen, wurde eine molekulare Typisierung mittels rep-PCR (Diversilab-Methode) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.10). Abb. 12 zeigt das Ergebnis. Wie für die Vancomycin-resistenten Isolate wurde hier der Grenzwert von 98 % für die Stammverwandtschaft festgelegt.

Es wird deutlich, dass es keine Homologien $\geq 96,7\%$ gibt. Auch bei den Isolaten, die $\geq 95\%$ Homologie aufweisen (z. B.: Nr. 204 und Nr. 202; Nr. 66 und Nr. 206; Nr. 207 und Nr. 199; Nr. 75 und Nr. 201) handelt es sich um zeitlich und örtlich unzusammenhängende Isolate. Somit besteht bei keinem Isolat der Verdacht, dass es zu einer Übertragung gekommen sein könnte.

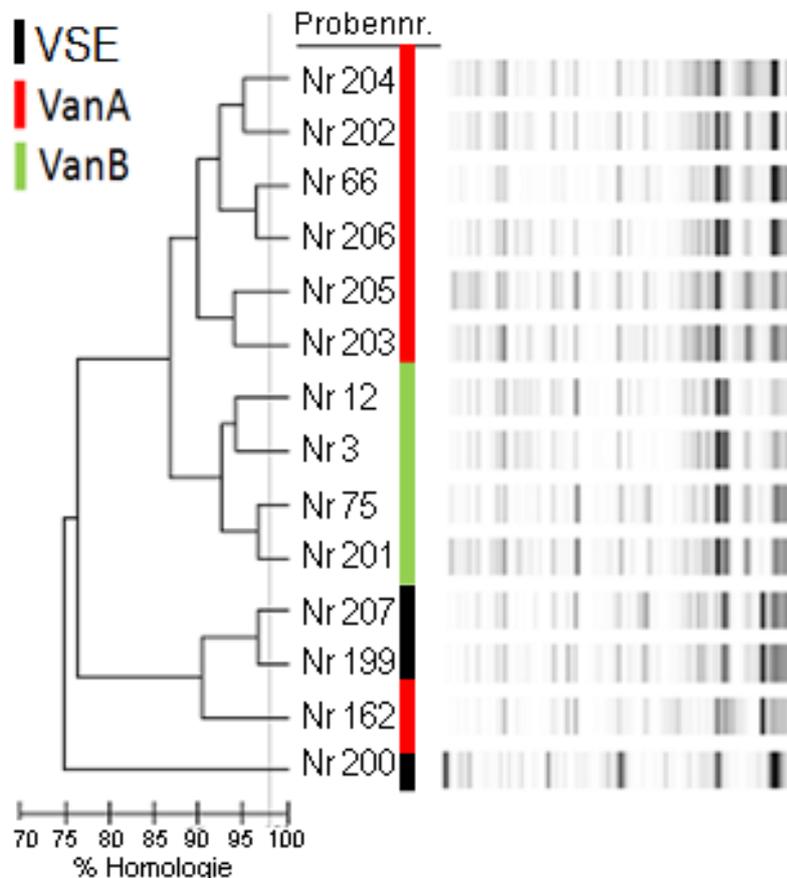


Abb. 12: Ergebnis der molekularen Typisierung der untersuchten Linezolid-resistenten Enterokokken des KMV. Hinter der Probennummer ist der Genotyp farblich dargestellt.

4. Diskussion

Für eine Reduktion der im Krankenhaus erworbenen Kolonisationen und Infektionen ist eine genaue Kenntnis der bestehenden Situation von großer Bedeutung, um aus dieser Rückschlüsse auf mögliche Verbesserungsmöglichkeiten ziehen zu können. Nicht nur die Kenntnis der Häufigkeit, sondern auch der Verteilung von resistenten Isolaten ist hierbei wichtig, um Strategien für ein erfolgreiches Hygiene-Management zu entwickeln. Letztlich soll dies das Risiko für Kolonisation und Infektion senken und damit die Zahl der Isolationstage reduzieren, was aus wirtschaftlicher Sicht für das Krankenhaus wichtig ist.

Obwohl Enterokokken nur einen geringen Anteil der für Patienten schwerwiegenden Infektionen ausmachen und viel häufiger für symptomlose Kolonisationen verantwortlich sind, hat ihre Bedeutung und Häufigkeit in den letzten Jahren deutlich zugenommen (siehe Abschnitt 1.1; Werner et al., 2008a; Klare et al., 2012b; Gastmeier et al., 2014). Dies belegt auch die Entwicklung der VRE-Nachweishäufigkeit am KMV. Hier lässt sich ebenfalls ein Anstieg nach Angaben des Resistenzbericht des KMV beobachten (Blutkultur: 2007-2013 Zunahme um 14,61 %; Urinkultur 2007-2013 Zunahme um 6,49 %).

4.1 VRE am KMV

4.1.1 Epidemiologie und Genotypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken am KMV

Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der Erstisolate aus dem Jahr 2013 die Verteilung und Häufigkeit von Vancomycin-resistenten Enterokokkenerstisolaten am KMV untersucht.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, zeigt die klinik- und stationsbezogene Analyse, dass der Großteil der Isolate aus den bettenstärksten Kliniken stammte (Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, sowie Medizinische Kliniken und Polikliniken I bis III). Diese Information muss vor dem Hintergrund bewertet werden, dass viele Isolate der oben genannten Kliniken von der Intensivstation derselben stammen. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, welche lediglich Intensivbetten betreut. Als ein Grund hierfür könnten die Überwachungsscreenings, welche im Idealfall bei Aufnahme des Patienten, sowie meist in einem wöchentlichen Rhythmus stattfinden, gelten. Diese sind auf der Normalstation nicht Bestandteil des normalen Stationsalltags. Verstärkt wird diese

Annahme dadurch, dass oftmals das erste Screening bzw. das Aufnahmescreening direkt positiv ist (siehe Abschnitt 3.1.3.3 Tab. 20).

Besonderes Augenmerk bei der Analyse wurde hierbei auf die Korrelation zwischen Erstisolaten und Anzahl der Gesamtnachweise pro Monat des Jahres 2013 gelegt.

Die resultierenden Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es keine Gleichverteilung von VRE pro Monat über das Jahr 2013 gibt, sondern dass es durchaus Häufungen von VRE-Nachweisen gibt, welche im Jahr 2013 in den Monaten Juli, Oktober und Dezember liegen und sehr gut mit der Häufung der VRE-Erstisolate in den Monaten Juli, Dezember korrelieren (siehe Abschnitt 3.1.1). Zudem lässt sich in der zweiten Jahreshälfte 2013 insgesamt ein vermehrtes Auftreten von VRE-Erstisolaten und VRE-Nachweisen feststellen. Mögliche Gründe dafür könnten Personalengpässe in den Ferienzeiten, durch Krankheitsfälle oder durch Sparmaßnahmen, bei gleichbleibender oder steigender Patientenzahl, sein.

Aktuell gibt es mehrere Arbeiten, die einen systematischen Gesamtüberblick über die epidemiologische Situation der VRE in Krankenhäusern auf unterschiedlichen Ebenen liefern (Arias und Murray, 2012; Klare et al., 2012b; Mutters et al., 2013).

Weltweit wurde eine deutliche Zunahme der VRE-Häufigkeit beobachtet (Mutters und Frank, 2013; Mutters et al., 2013).

Neben der weitweiten Ebene ist jedoch auch die europäische Ebene interessant. Hier sind deutliche Unterschiede in der VRE-Häufigkeit in den einzelnen europäischen Ländern beschrieben worden mit einer Einordnung des Anteils Vancomycin-resistenter *E. faecium* in Deutschland im europäischen Vergleich im oberen Mittelfeld (16,2 %). Nur Irland (44,0 %), Portugal (23,3 %) und Griechenland (17,1 %) wiesen höhere Resistenzraten auf. Dennoch weisen auch einige Nachbarländer Deutschlands deutlich niedrigere Resistenzraten Vancomycin-resistenter *E. faecium* auf (Polen (8,4 %), Dänemark (2 %), Österreich (3,2 %), Belgien (1,4 %), Frankreich (0,8 %), Niederlande (0 %); (Gastmeier et al., 2014)).

Diese Zahlen sind nicht als absolut anzusehen und können besonders für Deutschland auch noch höher liegen, je nach betrachtetem Netzwerk und analysiertem Bereich (Gastmeier et al., 2014). Teilweise sind Resistenzraten von *E. faecium* gegen Vancomycin bis zu 28 % beschrieben (Werner et al., 2008a; Theilacker et al., 2009;

Mutters und Frank, 2013). Laut Resistenzbericht des KMV lag die Resistenzrate von *E. faecium* in Urinkulturen gegen Vancomycin bei 26 % und somit über dem oben angegebenen Wert von 16,2 % für Deutschland.

Neben der oben erwähnten weltweiten Zunahme Vancomycin-resistenter Enterokokken, stellen Arbeiten auch für Deutschland eine deutliche Zunahme fest (Vonberg et al., 2007; Klare et al., 2012b; RKI, 2013). Speziell das RKI hat in seinen jährlich durchgeführten Studien zur Analyse der Häufigkeit, Verteilung und des Genotyps eine deutliche Zunahme der VRE-Häufigkeit festgestellt, welche hauptsächlich auf einer Zunahme Vancomycin-resistenter *E. faecium* beruht (Mutters et al., 2013; RKI, 2013).

Des Weiteren beschreiben Arbeiten zur Verteilung von VRE innerhalb einzelner Gebiete Deutschlands deutliche Unterschiede in der Häufigkeit Vancomycin-resistenter Enterokokken mit auffallend höheren VRE-Raten in Nordrhein-Westfalen im Vergleich zu den nördlichen bzw. östlichen Gebieten Deutschlands (Mutters et al., 2013; Gastmeier et al., 2014). Diese Arbeiten verdeutlichen auch den zeitlichen Verlauf der VRE-Zunahme unter Berücksichtigung der regionalen Verteilung auf die einzelnen Bundesländer bzw. auf entsprechend größere eingeteilte Gebiete und beschreiben, wie bereits oben erwähnt, einerseits eine Zunahme der Gesamtanzahl der VRE-Isolate, als auch einen deutlichen Anstieg dieser besonders in Nordrhein-Westfalen, Hessen, Thüringen, Sachsen ohne eine Erklärung oder Vermutung für die Ursache dieses Anstieges liefern zu können (Gastmeier et al., 2014).

Arbeiten zur genauen VRE-Verteilung innerhalb Nordrhein-Westfalens gibt es bis jetzt nach meinem Kenntnisstand noch nicht. Dennoch ist aus den Einsendeorten des NRZ (Nationales Referenzzentrum) des RKI für Enterokokken ersichtlich, dass besonders viele Isolate aus dicht besiedelten Gebieten wie dem Rheinland und dem Ruhrgebiet stammen (RKI, 2013). Laut einer Arbeit von Liss et al. wurde in Köln in der Hämatologie und Onkologie eines Hauses der Maximalversorgung eine VRE Prävalenz von 9,9 %, von denen 61 % nosokomial verursacht waren, nachgewiesen. 2 % dieser Patienten entwickelten eine Sepsis (Liss et al., 2012). Ein ähnliches Bild lässt sich am KMV beobachten mit einer VRE Prävalenz für das Jahr 2013 von 23,5 % (EDV der Mikrobiologie; 2013: 1327 VRE-Nachweise, 5648 Enterokokken-Nachweise).

Bei der Analyse der Enterokokkenarten ist auffällig, dass in den Übersichtsarbeiten 99 % der VRE-Isolate zur Spezies *E. faecium* gehören und nur eine Minderheit zur Spezies *E.*

faecalis (Klare et al., 2012b). Somit ist *E. faecium* als Hauptreservoir der VRE anzusehen (Mutters und Frank, 2013; Mutters et al., 2013).

Dieses Verhältnis spiegelt sich auch in der analysierten Stichprobe mit nur einem *E. faecalis* wieder (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Somit muss die Prävalenz Vancomycin-resistenter *E. faecium* deutlich höher liegen. Dies lässt sich anhand der Daten des KMV mit einer Prävalenz Vancomycin-resistenter *E. faecium* von 61,5 % im Jahr 2013 bestätigen (EDV der Mikrobiologie; 2013: 1324 Nachweise Vancomycin-resistenter *E. faecium*, 2153 Nachweise Vancomycin-sensibler *E. faecium*). Dennoch entspricht diese Verteilung nicht dem in der Darmflora vorkommenden physiologischen Verhältnis (siehe Abschnitt 1.1). Ein Grund hierfür könnte die höhere Antibiotikaresistenzrate von *E. faecium* sein (Fisher und Phillips, 2009).

Andere Arbeiten zur Analyse des Anteils Vancomycin-resistenter Enterokokken unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Krankenhausabteilungen, beschreiben eine deutliche Zunahme des Anteils Vancomycin-resistenter Enterokokken vor allem auf chirurgischen Stationen, sowie Intensivstationen (RKI, 2013; Gastmeier et al., 2014). Nach den Daten des NRZ für Enterokokken machen VRE aus chirurgischen Abteilungen (mit/ohne Intensivstation), sowie aus der Inneren Medizin (mit/ohne Intensivstation) fast 50 % der eingesendeten Isolate aus, jedoch unter der Prämisse, dass in ca. 25 % der Fälle der Einsendeort nicht genau bekannt ist (RKI, 2013). Somit könnte der Anteil dieser Abteilungen noch um einiges höher liegen. Vergleicht man diese Resultate mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten fällt auf, dass die Verteilung der VRE-Erstisolate am KMV (siehe Abschnitt 3.1.1) ähnlich zu den prozentualen Anteilen der Einsendungen an das NRZ ist (RKI, 2013). Dies unter Beachtung der Tatsache, dass die Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin die Intensivstationen bzw. Intensivbetten aller anderen Kliniken (Klinik für Herzchirurgie, Transplantationsmedizin, Urologie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Unfallchirurgie, Orthopädie, Neurologie, Neurochirurgie, Neonatologie, Kinderheilkunde) mit Ausnahme der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II betreut und ihr Anteil, bei gleichzeitig weniger Isolaten aus den entsprechenden Kliniken, folglich höher ausfällt.

Zudem konnte die auf Bundeslandebene und auf internationaler Ebene beschriebene VRE-Zunahme auch am KMV beobachtet werden. Im Jahr 2011 und 2012 wurden insgesamt jeweils 669 VRE nachgewiesen, im Jahr 2013 1327 (siehe Abschnitt 3.1.1). Dies

entspricht einer Zunahme um 98,35 %. Der Anteil der *E. faecalis* betrug 0,0025 %. Gleichzeitig kam es zu einer leichten Abnahme der Enterokokken-Nachweise (2011: 6419; 2012: 5753; 2013: 5648).

In einem weiteren Teil der Arbeit erfolgte eine Genotypisierung der Erstisolate im Hinblick auf das Vorkommen des *vanA*- bzw. des *vanB*-Genclusters mit der Frage nach dem Verhältnis der Genotypen zueinander (siehe Abschnitt 2.7.1.1, 3.1.2).

Mittlerweile sind zur Detektion dieser Gencluster eine Vielzahl von zum Teil auch kommerziellen PCRs verfügbar (Bourdon et al., 2010; Depardieu et al., 2004; Sloan et al., 2004; Stamper et al., 2007; Young et al., 2007; Werner et al., 2011).

Der Vorteil dieser Methode des Nachweises ist neben der Beschleunigung der Diagnostik bzw. des Nachweises von Vancomycin-resistenten Enterokokken innerhalb von ca. 2-4 h, statt 18-20 h, wie dies im Rahmen eines E-Tests sonst üblich wäre, die direkte genetische Testung eines Bakteriums auf die Anwesenheit des die Resistenz vermittelnden Genclusters. Somit muss nicht mehr mittels E-Test oder Vancomycin-haltigem Selektivmedium auf ein phänotypisches Merkmal getestet werden. Dieser Zeitfaktor kann besonders bei Infektionen mit VRE, insbesondere im Rahmen einer VRE-Sepsis, von entscheidender Bedeutung sein. Hier kann sich die üblicherweise gewählte empirische antibiotische Therapie als unwirksam erweisen. Dies kann vermutlich auch als einer der Gründe für die um Faktor 2,5 erhöhte Letalität einer VRE-Sepsis im Vergleich zu einer durch Vancomycin-sensible Enterokokken verursachten Sepsis angesehen werden (Salgado und Farr, 2003; DiazGranados et al., 2005; Vonberg et al., 2007).

Dennoch muss hierbei angemerkt werden, dass VRE-bedingte Sepsisfälle von 1997-2003 (laut KISS-Datenerfassung) nicht vorgekommen sind und erst 2004 erste Sepsisfälle durch VRE gemeldet wurden, welche 0,22 % der fatalen primären Sepsisfälle ausmachten (Vonberg et al., 2007).

Tab. 22: Vergleich der Enterokokken- und VRE-Nachweise am KMV in Blutkulturen der Jahre 2007 und 2013.

	2007		2013	
	Anzahl	Davon VRE	Anzahl	Davon VRE
<i>E. faecium</i>	16	0 (0 %)	89	19 (21,3 %)
<i>E. faecalis</i>	16	0 (0 %)	41	0 (0 %)
Gesamt	32	0 (0 %)	130	19 (14,6 %)

Auch am KMV lässt sich eine deutliche Zunahme der VRE-Nachweise in Blutkulturen in den letzten 6 Jahren beobachten (Tab. 22). Wie viele dieser Bakteriämien fatal waren, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht ermitteln. Zudem sind diese Daten nicht patientenbereinigt. Außerdem müssen diese Daten vor dem Hintergrund bewertet werden, dass von 2007 bis 2013 die Anzahl der am IMMIP untersuchten Blutkulturen um 113,16 % zugenommen hat (2007: 8039; 2013: 17136).

Als weiterer indirekter Vorteil durch die schnellere Diagnostik und folglich schnellere Therapieanpassung ist neben positiven Effekten für den Patient auch ein wirtschaftlicher Effekt für die Klinik anzuführen. Laut aktuellen Arbeiten können die zusätzlichen Kosten durch eine VRE-Infektion mit bis zu 27-38 000 \$ (Stosor et al., 1998; Bhorade et al., 1999; Vonberg et al., 2007) und gleichzeitiger Verlängerung der Liegezeit um 7-27 Tage (Linden et al., 1996; Lodise et al., 2002; Vonberg et al., 2007) angegeben werden. Diese Angaben sind jedoch umstritten, einige Arbeiten haben keine signifikante Veränderung der Kosten bzw. der Verweildauer bei einer Infektion mit Vancomycin-resistenten Enterokokken gegenüber einer Infektion mit Vancomycin-sensiblen Enterokokken feststellen können (Pelz et al., 2002; Vonberg et al., 2007). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Verlängerung der Liegedauer durch die falsche Therapie bedingt sein könnte oder ob die erkrankten Patienten sich bereits vorher in einem schlechten Allgemeinzustand befanden bzw. multimorbide waren.

Ein weiterer Vorteil PCR-basierter Testung ist die hohe Sensitivität und Spezifität. In einer Studie wurde die Sensitivität mit 96,6 % und die Spezifität mit 87 % angegeben, jedoch unter Anmerkung eines hohen Anteils falsch VanB-positiver Isolate im Vergleich mit dem kulturbasierten Nachweis als Goldstandard, welche zu einer deutlichen Reduktion der Spezifität führten (Stamper et al., 2007).

Als Nachteile der PCR-basierten Testung sind bei kommerziellen PCR Kits die Kosten zu nennen. Zudem weist die PCR eine große Abhängigkeit von der Qualität (Reinkultur) der getesteten Probe auf. Die Reinkultur ist für die Auswertbarkeit der PCR entscheidend, da auch in *Staphylokokkus aureus* und *Clostridium spp.* das *vanA*- bzw. *vanB*-Gen bereits beschrieben wurde (Marvaud et al., 2011; Saadat et al., 2014). Folglich ist die direkte PCR aus dem Stuhl als schnelle Methode zum Nachweis von VRE vermutlich nicht geeignet. Nach Inokulation eines Mediums mit einer entsprechenden Anzahl an KBE wird von einer Arbeit die Sensitivität der PCR mit fast 100 %

angegeben (Mutters und Frank, 2013). Auch die im Rahmen dieser Arbeit benutzte PCR weist eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität auf (siehe Abschnitt 3.1.2.1).

Die Ergebnisse der Genotypisierung zeigen, dass zum einen alle Isolate mittels PCR genotypisiert werden konnten und zum anderen durch die ausgewählten Grenzwerte eine problemlose Auswertung der PCR-Ergebnisse möglich war (siehe Abschnitt 3.1.2.1).

Auch die 16S-Kontroll-PCR lieferte positive Ergebnisse bei allen getesteten Isolaten. Für die Interpretation der H₂O-Negativkontrolle gilt, dass besonders die Möglichkeit der Überstrahlung des gemessenen Kanals durch die emittierte Fluoreszenz eines anderen Kanals sehr wahrscheinlich ist, da im Bereich Zyklus 33-37 die gemessene emittierte Fluoreszenz der anderen PCRs sehr hoch war (siehe Abschnitt 3.1.2.1 Abb. 4).

Wie unter Abschnitt 3.1.2.1 bereits erwähnt wurden bei jedem Lauf Kontrollproben für jede einzelne PCR dieser Multiplex-PCR mitgeführt, um die korrekte Funktion und somit die Gültigkeit der Resultate der einzelnen Proben zu bestätigen. Die deutlichen und frühen Anstiege der Fluoreszenz in den mittels Plasmiden als Proben durchgeführten Kontroll-PCRs sind durch die sehr hohe Konzentration des Zielgens, bei zusätzlichem Fehlen von weiteren die PCR evtl. inhibierenden Substanzen einschließlich DNS, verursacht worden. Insbesondere unter der Annahme, dass nach erfolgreicher Klonierung und unter optimaler Bedingungen in der resultierenden, aufgereinigten Lösung fast ausschließlich das gewünschte Plasmid vorhanden sein sollte. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass durch die Aufreinigung nie eine 100 %ig reine Lösung zu erreichen ist.

Auf Grundlage der obigen Ergebnisse stellt sich die Frage, wie das Verhältnis der durch VanA- bzw. VanB-vermittelten Resistenzen weltweit bzw. in Deutschland aussieht.

Bis in das späte letzte Jahrzehnt galt die VanA-vermittelte Vancomycinresistenz in den USA, Lateinamerika, Asien, Europa (inklusive Deutschland) als häufiger als die VanB-vermittelte (Werner, 2012a, 2012b; RKI, 2013). VRE, welche das *vanB*-Gen besaßen, waren selten und wurden nicht im Zusammenhang mit Ausbrüchen dokumentiert (RKI, 2013). Kolonisationen, Infektionen und Ausbrüche wurden meist durch VanA-positive Isolate verursacht (Zhu et al., 2009; Wardal et al., 2014).

Dieses Verhältnis hat sich, mit einer deutlichen Zunahme VanB-vermittelter Vancomycin-resistenter Enterokokken in Deutschland und einigen seiner Nachbarländer

z. B. Polen, Schweden, Frankreich zunehmend verändert (Soderblom et al., 2010; Bourdon et al., 2011a; Klare et al., 2012b).

Für das Jahr 2013 beobachtete das RKI als NRZ beinahe eine Gleichverteilung eingesendeter VanA- und VanB-positiver VRE-Stämme (RKI, 2013). Somit ist ein Nachweis des *vanB*-Gens bei Enterokokken keine Seltenheit mehr (siehe Abschnitt 3.1.3).

Verstärkt wird diese Annahme in Deutschland dadurch, dass in einigen Krankenhäusern die Resistenzrate gegenüber Vancomycin, bei gleichbleibender Teicoplaninresistenzrate, deutlich angestiegen ist, sowie direkt durch den häufigeren Nachweis von VanB-positiven *E. faecium* innerhalb von Krankenhäusern (Klare et al., 2012b).

Somit verhält sich die am KMV und damit an einem großen deutschen Krankenhaus der Maximalversorgung beobachtete Genotypenverteilung mit 40 % (VanA) zu 60 % (VanB) analog zu den oben beschriebenen Trends. Unerwartet ist jedoch, dass der Anteil VanB-positiver Isolate deutlich höher liegt als der der VanA-positiven. Zusammen mit den Ergebnissen der Clusteranalyse (siehe Abschnitt 3.1.3.2, 3.1.3.3) stellt sich die Frage inwieweit Schwankungen des VanA/VanB-Verhältnisses durch Transmissionen bedingt sind.

Bei der Analyse der Genotypenverteilung an den 5 häufigsten Nachweisorten ließen sich unterschiedliche Verhältnisse feststellen. Ein Vergleich mit anderen Kliniken oder eines Hauses der Maximalversorgung ist jedoch nicht möglich, da es nach aktuellem Kenntnisstand keine entsprechenden Arbeiten zu diesem Thema gibt.

Dennoch muss erwähnt werden, dass das *vanB*-Gen besitzende Enterokokken auch eine MHK im Bereich von 1-4 mg/l haben können, wodurch diese nicht mehr als resistent gelten (Klare et al., 2012b; RKI, 2013). Unter Beachtung dieser Isolate könnte der Gesamtanteil VanB-positiver Enterokokken noch steigen, wodurch das Verhältnis weiter zugunsten der VanB-positiven Stämme verschoben werden könnte. Die Vermeidung dieses Fehlers wäre einerseits durch den Einsatz einer PCR mit direktem genomischem Nachweis des entsprechenden Gens, andererseits durch sensitivere Testverfahren im Bereich von minimalen Hemmkonzentrationen von 1-4 mg/l möglich (Grabsch et al., 2008; Klare et al., 2012a, 2012b).

Es stellt sich dabei die Frage nach der klinischen Relevanz von laut EUCAST sensiblen mit Vancomycin therapierbaren, dessen ungeachtet VanB-positiven, Enterokokkenisolaten.

Bei den Ursachen des Anstiegs der Häufigkeit von Vancomycin-resistenten VRE handelt es sich vermutlich um ein multifaktorielles Geschehen.

Zum einen könnte eine Zunahme des Antibiotikaverbrauchs durch eine Erhöhung des Selektionsdrucks zu einer Zunahme resistenter Bakterien geführt haben, welche man erst mit zeitlicher Verzögerung beobachten konnte (Klare et al., 2012b). Ein gehäuftes Auftreten von VRE wurde bereits im Zusammenhang mit einem vermehrten Einsatz von Glykopeptid-Antibiotika beobachtet (Kolar et al., 2002; Vonberg et al., 2007). Am KMV hat der Vancomycin-Verbrauch im Zeitraum 2010-2013 nach Auskunft der Apotheke des Klinikums nur um 5,57 % zugenommen, sodass die oben erwähnte Zunahme der VRE-Nachweise um 98,36 % nicht allein durch den Einsatz von Vancomycin begründet sein kann.

Zum anderen könnte auch ein systematischer methodischer Fehler bei der Zählung Vancomycin-resistenter Enterokokken vorliegen, welcher zu einer deutlichen Überschätzung der absoluten VRE-Zahlen führen könnte (Mutters und Frank, 2013).

Eine weitere Ursache könnte eine Änderung der EUCAST Bewertungskriterien hin zu niedrigeren Grenzwerten sein (Klare et al., 2012b; EUCAST, 2014).

Ein alternativer Erklärungsversuch wären mangelnde Hygienemaßnahmen, die eine Ausbereitung Vancomycin-resistenter Enterokokken in Kliniken erleichtern würden. Hierbei muss besonders berücksichtigt werden, dass Enterokokken bei intestinaler Kolonisation von Menschen mit intaktem Immunsystem kaum Symptome verursachen würden und eine Kolonisation dementsprechend erst sehr spät auffällt. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum oft z. B. das Aufnahmescreening positiv ist. Einige Arbeiten beschreiben ein hohes Verhältnis von Kolonisationen zu Infektionen durch VRE, sodass auf eine VRE-Infektion eine um einiges größere Anzahl von kolonisierten diesen Patienten umgebenden Patienten kommt, folglich steigt die Wahrscheinlichkeit weiterer Infektionen (Olivier et al., 2008; Werner et al., 2011).

Die steigenden VRE-Zahlen lassen sich jedoch auch durch die Steigerung der Aufmerksamkeit gegenüber multiresistenten Erregern mit folglich Erhöhung des Screeningaufkommens erklären. Viele Intensivstationen führen bereits regelmäßig Screenings durch (siehe Abschnitt 3.1.3.4). Zusätzlich stellt sich die Frage, ob ein VanA/VanB-spezifisches Screening mittels PCR sinnvoll ist. Für dieses sprechen die Möglichkeit der

früheren Erkennung von potentiellen Transmissionen und die kürzere Zeit bis zum Nachweis eines VRE.

Die dargestellten Gründe für den Anstieg der VRE-Häufigkeit können natürlich nicht nur für Deutschland gelten, sondern auch den in Nachbarländern beobachteten VRE-Anstieg erklären (Soderblom et al., 2010; Bourdon et al., 2011a; Klare et al., 2012b).

4.1.2 Molekulare Typisierung von Enterokokkenisolaten

Durch die in Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2.2 dargestellten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob es sich bei den beobachteten Häufungen von VRE an bestimmten Kliniken bzw. bei dem Verhältnis der einzelnen Genotypen zueinander, um ein zufälliges Phänomen handeln könnte oder ob es andere Erklärungen für diese Ergebnisse geben könnte.

Beispiele für Erklärungsmöglichkeiten wären, dass es sich bei den im Krankenhaus nachgewiesenen Isolaten um endemische Stämme handeln könnte oder dass die VRE-Häufigkeit in bestimmten Kliniken durch Transmissionen innerhalb dieser erklärt werden könnte. Diese Frage wurde mittels rep-PCR mit Hilfe des Diversilabsystems (siehe Abschnitt 2.10) angegangen.

Das Verfahren der rep-PCR mit seinen Vor- und Nachteilen ist momentan Gegenstand verschiedener Arbeiten.

Die Vorteile dieses Verfahrens sind schon länger bekannt. Zum einen sind dies die halb-automatische, standardisierte Durchführung zum anderen die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unabhängig von verwendeten Geräten (z. B. Thermocycler), sowie den durchführenden Personen (Pounder et al., 2006; Bourdon et al., 2011b). Hierbei muss auf den folgenden Umstand hingewiesen werden, dass die hohe Reproduzierbarkeit erst durch das in Abschnitt 2.10 verwendete System erreicht wurde und in früheren Arbeiten umstritten war (Malathum et al., 1998; Bourdon et al., 2011b).

Durch die digitale Speicherung und Auswertung der Daten ist ein einfacher Austausch von Ergebnissen zwischen Laboren möglich. Es bedarf somit keinem erneuten Lauf von bereits bekannten Stämmen, um diese mit unbekanntem Stämmen zu vergleichen. Dies kann Kosten deutlich reduzieren.

Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Methoden ist die Zeit, welche mit ca. 4 Stunden für die Durchführung einer rep-PCR deutlich kürzer ist als 3-7 Tage, welche für die Durchführung einer PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) benötigt werden (Chuang et al.,

2010; Bourdon et al., 2011b; Hilmi et al., 2013). Durch diesen Umstand wird die schnelle, zeitnahe Analyse von Proben ermöglicht, besonders im Kontext nosokomialer Infektionen, welche die Aufenthaltsdauer und die Behandlungskosten deutlich erhöhen können (Sheng et al., 2005; Chuang et al., 2010).

Als Nachteil dieses Verfahrens sind im Besonderen die hohen Kosten des Diversilabsystems zu nennen, welche mit Anschaffungs- und Materialkosten von ca. 35 000 \$ und ca. 27 \$ pro Reaktion im Gegensatz zu 33 500 \$ (Anschaffungskosten) und 8 \$ (Kosten pro Reaktion) für die PFGE deutlich höher sind (Pounder et al., 2006; Chuang et al., 2010).

Dafür sind die Personalkosten des Diversilabsystems, im Vergleich mit der PFGE (3-7 Tage), um ein Vielfaches geringer (4 Stunden Arbeitszeit).

Zudem ist die Genauigkeit der Differenzierung einzelner Isolate mittels rep-PCR umstritten (Chuang et al., 2010). Laut einer Arbeit von Bourdon et al. ist die Differenzierungsfähigkeit der rep-PCR (Diversilabsystem) besser als die der PFGE und somit ein Vorteil dieses Systems (Bourdon et al., 2011b).

Wie bereits oben erwähnt, kommt der Vergleichbarkeit der rep-PCR mit der PFGE eine besondere Bedeutung zu.

Bei der PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) handelt es sich um ein Verfahren bei dem mit Restriktionsenzymen verdaute DNS des zu untersuchenden Isolats mit Hilfe eines pulsierenden d. h. in bestimmten zeitlichen Abständen umgepolten elektrischen Feldes aufgetrennt wird. Die Grundidee hinter dieser Technik basiert auf einer besseren Auftrennung eines DNS-Fragmentgemisches mit resultierender Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks.

Grundlage für den oben erwähnten Vergleich ist, dass die PFGE als Goldstandard in der Typisierung bzw. in der Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks gilt (Miranda et al., 1991; Chuang et al., 2010; Bourdon et al., 2011b).

Auch diese Methode hat einige Vor- und Nachteile. Einige sind bereits oben diskutiert.

Als Vorteil im Vergleich zur rep-PCR ist neben den etwas geringeren Materialkosten die Differenzierungsfähigkeit zu nennen. Nachteile sind besonders die Abhängigkeit von der durchführenden Person (Untersucherabhängigkeit), sowie der hohe Zeit- und Arbeitsauf-

wand (Bourdon et al., 2011b). Besonders letzteres verhindert den vermehrten Einsatz der PFGE zur Analyse von Isolaten.

Neben diesen beiden Verfahren gibt es noch einige weitere Methoden, die zur Analyse von Isolaten eingesetzt werden können.

Zum einen ist hier die MLST (Multilocus sequence typing) zu nennen. Bei diesem Verfahren macht man sich Sequenzunterschiede in der DNS in einer Anzahl konstitutiv exprimierter Gene (Haushaltsgene, housekeeping genes) zu Nutze. Mittels PCR werden interne Fragmente dieser Gene verdoppelt und anschließend sequenziert. Da Zellen mehrere eventuell unterschiedliche Allele eines oder mehrerer dieser Gene enthalten können, kann durch die Sequenzierung ein Sequenztyp (sequence type, ST) der abgegriffenen DNS-Abschnitte eines Organismus erstellt werden und somit ein Isolat mit einem anderen verglichen werden.

Es gibt mehrere Arbeiten, die dieses Verfahren an Enterokokken durchgeführt, Populationen bzw. Subpopulationen definiert und deren Prävalenz analysiert haben (Homan et al., 2002; Willems et al., 2005). Dennoch gilt dieses Verfahren aufgrund der hohen Kosten, niedrigen Genauigkeit in der Differenzierung einzelner Isolate und des hohen Zeitaufwandes in der generellen Routineanalyse von Ausbrüchen als nicht durchführbar (Bourdon et al., 2011b).

Zum anderen ist hier auch die MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis), welche mit Hilfe von variable number tandem repeats (VNTR, variablen DNS-Abschnitten) Isolate analysiert und vergleicht (Top et al., 2004) und die AFLP (Pangallo et al., 2008), die eine ähnliche Technik zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks wie die MLVA unter Verwendung von Restriktionsenzymen, einer PCR und anschließender Gelelektrophorese verwendet, zu nennen.

Im Vergleich der Diskriminationsfähigkeit der rep-PCR und der PFGE unter Verwendung des Differenziertheitsindex von Simpson (Simpson's index of diversity, D) (Hunter und Gaston, 1988) und des Konkordanzkoeffizienten von Kendall (Kendall's coefficient of concordance, W), lassen sich mit einem D Index von 0,980 (rep-PCR) und 0,985 (PFGE), sowie eines Konkordanzkoeffizienten von $W=0,773$ zwischen der PFGE und der rep-PCR gute Werte für die rep-PCR im Vergleich zur PFGE ermitteln (Bourdon et al., 2011b).

Somit ist die rep-PCR eine sehr gute Ausschlussmethode. Unterscheiden sich Isolate, ist eine Transmission oder Verwandtschaft unwahrscheinlich. Besteht eine hohe Homologie zwischen den Isolaten, sollte eine retrospektive Analyse im Hinblick auf einen zeitlichen oder räumlichen Zusammenhang und auf medizinische Daten (z. B. Antibiotikagabe) erfolgen. Ein isolierter Einsatz dieser Verfahren sollte dabei möglichst vermieden werden.

Dementsprechend kann die rep-PCR als eine Möglichkeit zur Analyse von Isolaten, speziell unter Berücksichtigung der Vorteile gegenüber der PFGE wie niedrigerem Zeitaufwand, guter Reproduzierbarkeit und hoher Standardisierung angesehen werden. Vor dem Hintergrund eines Ausbruchs kann sich die rep-PCR folglich als nützlich in der Analyse von Isolaten erweisen, in dessen Kontext sie bereits eingesetzt worden ist (Sherer et al., 2005; Singh et al., 2005; Chuang et al., 2010).

4.1.2.1 Analyse der klinikbezogenen Typisierung

Durch die Typisierung ausgewählter Isolate mittels rep-PCR sollte die Möglichkeit einer Transmission überprüft werden. Die Ergebnisse der entsprechenden Versuche sind in Abschnitt 3.1.3, sowie Tab. 20 grafisch und in schriftlicher Form dargestellt.

Anschließend erfolgte eine Analyse und retrospektive Aufarbeitung der beobachteten Cluster.

Vor der Diskussion der unter Abschnitt 3.1.3.2 und 3.1.3.3 dargestellten Ergebnisse müssen einige generelle Transmissionswege im Krankenhaus, sowie im Speziellen Schwierigkeiten bei der Analyse dieser Cluster, erläutert werden.

Es gilt zu beachten, dass nur Erstisolate aus dem Jahr 2013 analysiert wurden, sodass immer die Möglichkeit besteht, dass die ursprüngliche Quelle der VRE ein unbekannter dritter Patient sein könnte. Zudem wird die Analyse der Cluster durch mögliches Vernachlässigen der Händehygiene z. B. im Rahmen eines Notfalls (auf der Intensivstation), wodurch eine größere Verteilung des entsprechenden Bakteriums erfolgt haben könnte, erschwert. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass Enterokokken als sehr umweltresistente Keime auch längere Zeit in der Umgebung bzw. auf Gegenständen persistieren können (Fisher und Phillips, 2009; Klare et al., 2012b). Besondere Bedeutung kommt hierbei einer eventuellen Mehrbelastung des pflegerischen bzw. ärztlichen Personals der entsprechenden Station zu, im Speziellen unter Berücksichtigung mög-

licher Situationen, bei denen durch Krankheitsfälle, Urlaubszeiten, Wochenenden, Feiertagen (Weihnachten) oder eine Kombination aus mehreren dieser Faktoren eine Reduktion des verfügbaren Personals stattgefunden haben könnte. Laut einer Arbeit von Kaier et al. konnte ein direkter Effekt von Bettbelegungsraten und dem Personalschlüssel auf die Rate an nosokomialen Infektionen nachgewiesen werden (Kaier et al., 2012).

Außerdem handelt es sich bei Intensivpatienten oftmals auch um chronisch kranke Patienten, welche bereits mehrere Krankenhausaufenthalte in den unterschiedlichsten Abteilungen absolviert haben, sodass immer die Schwierigkeit des genauen Nachweises besteht, wann und wo ein Patient ein bestimmtes in diesem Fall resistentes Isolat erworben hat.

Auch fehlende Eingangsscreenings auf der Intensivstation können im Einzelfall die Analyse der Cluster erschweren. Dementsprechend kann die Möglichkeit bestehen, dass der endgültige Nachweis einer Transmission mit Sicherheit kaum zu erbringen ist und eine Analyse immer die Umstände, sowie weitere Patienten beachten muss.

Für Cluster 1 könnte eine Erklärung ein kontaminiertes, zentrales Versorgungsgebiet sein, zumal IMC II und III dieselbe Fäkalienspüle benutzen und Enterokokken Wochen bis Monate auf Oberflächen persistieren können. Durch die Berücksichtigung von Nr. 93 wird der Verdacht auf eine Übertragung noch verstärkt.

Zur Erklärung des zweiten Clusters ist folgende Möglichkeit denkbar: durch Personen z. B. Personal könnte es zu einer Übertragung von Nr. 102 auf Nr. 100 auf Nr. 103 sein. Eine mögliche Verbindung dieses Clusters zu Nr. 53 könnte eine unbekannte weitere Person oder eine kontaminierte Oberfläche sein.

Eine Möglichkeit zur Erklärung von Cluster Nr. 3 könnte eine unbekannte dritte Person sein, welche für die Übertragung auf Nr. 133 und von Nr. 133 auf 136 verantwortlich sein könnte, sowie die Möglichkeit der Probenentnahme durch dieselbe Person ohne ausreichende hygienische Maßnahmen zwischen den Patienten bzw. mit kontaminierten Händen. Ein Indiz hierfür ist das neg. Vorscreening von Nr. 133, wodurch es wahrscheinlich ist, dass Nr. 133 den VRE auf der Intensivstation erworben haben könnte. Unter Berücksichtigung von Nr. 66 wäre auch eine Transmission durch Persistenz des Erregers auf Oberflächen eine Möglichkeit.

Auch im vierten Cluster erscheint eine Übertragung bei allen 4 Isolaten möglich. Hierbei ist es am wahrscheinlichsten, dass die Transmission von Nr. 150 auf die übrigen erfol-

gte. Ein möglicher Grund hierfür könnte die mangelnde Einhaltung von Hygienemaßnahmen sein.

In Cluster 5 lässt sich ebenfalls eine Übertragung durch das Analyseergebnis nicht restlos ausschließen. Dies gilt im Besonderen für Nr. 172, 175, und 179, sowie für Nr. 174 und 170, zwischen denen ein zeitlicher Zusammenhang (alle Patienten lagen im Dezember 2013 zur selben Zeit auf der Intensivstation), jedoch kein direkter räumlicher Zusammenhang (ITC 009 - 011 gegenüber IMCIII B09 - 10) besteht. Eine direkte Verbindung zwischen Nr. 182 und den restlichen Isolaten des Clusters lässt sich nicht direkt nachweisen. Eine mögliche Verbindung wäre abermals ein unbekannter dritter Patient oder kontaminierte Gegenstände.

Eine Erklärung für Cluster Nr. 6 wäre z. B. ebenfalls eine Persistenz des Erregers auf kontaminierten von beiden benutzten Gegenständen, besonders in Kombination mit mangelnder Händehygiene oder alternativ eine unbekannte dritte Person, welche sich im entsprechenden Zeitraum auf der Intensivstation aufgehalten hat und sich z. B. durch Verlegung räumlich benachbart zu beiden Patienten befunden haben könnte.

Zur Erklärung des quartalsübergreifenden Clusters (Nr. 86 und Nr. 138) wäre folgender Weg denkbar: von Nr. 86 über einen unbekanntem dritten Patienten oder eine kontaminierte Oberflächen auf Nr. 138.

Neben den erwähnten speziellen Umständen bzw. Faktoren zur Erklärung eines Clusters könnten auch in jedem der einzelnen Fälle einige der oben erwähnten generellen Faktoren allein oder in Kombination mit situationsabhängigen weiteren Faktoren zu einer Transmission eines Erregers geführt haben. Wie bereits formuliert, ist durch die retrospektive Analyse ein genauer Nachweis des Transmissionsweges kaum zu erbringen.

Die quartalsweise und quartalsübergreifende Analyse der Cluster auf die Möglichkeit von Transmissionen zeigt, dass diese in keinem Fall vollständig ausgeschlossen werden konnte. Hierbei sei angemerkt, dass die Frage der Transmissionen möglicherweise auch mit Hilfe eines whole genome sequencing entgültig geklärt werden könnte, weil diese Methode eine noch feinere Darstellung von Unterschieden erlaubt, die mit Hilfe der rep-PCR nicht erreicht wird. Für Enterokokken wurde dieses Verfahren bereits im Rahmen einiger Studien angewendet (Howden et al., 2013; Sciencedirect, 2015; Zischka et al.,

2015). Als Limitationen dieses Verfahrens sind die Kosten pro Probe, sowie die Geschwindigkeit und die Verfügbarkeit zu nennen (Human Genomics, 2015).

Dennoch besteht weiterhin theoretisch die Möglichkeit, dass es sich bei den analysierten Isolaten um endemische im Patienteneinzugsgebiet des KMV vorkommende Stämme handeln könnte (Cluster aus endemisch zirkulierenden Stämmen mit hoher Homologie ohne Einfluss von Transmissionen).

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden, unter besonderer Berücksichtigung der Herkunftsorte der Isolate, weitere Typisierungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.1.3.4 und 3.1.3.5 dargestellt. Sie zeigen einerseits, dass sich Homologien $\geq 98\%$ zwischen den Isolaten verschiedener Kliniken nicht finden lassen, andererseits jedoch, dass es durchaus Cluster innerhalb der entsprechenden Kliniken gibt.

Somit handelt es sich um klinikabhängige Cluster mit Hinweisen auf Übertragungen.

Folglich muss die These von möglicherweise endemischen vorkommenden Isolaten (RKI, 2013) vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kritisch hinterfragt werden.

4.1.2.2 Präventive Maßnahmen zur Verhinderung von Transmissionen

In Zeiten einer weltweit, genau wie auf bundeslandebene steigenden VRE-Prävalenz sind präventive Maßnahmen zur Verhinderung von Transmissionen entscheidend (siehe Abschnitt 4.1.1). Ihre Bedeutung wird durch steigende VRE, MRSA und ESBL Ko-Kolonisationen und Ko-Infektionen unterstrichen (Meyer et al., 2011).

Laut Mutters et al. sind mittlerweile Risikofaktoren für eine VRE-Kolonisation identifiziert worden. Dies sind neben der Verwendung von Antibiotika bei der Therapie als wichtigstem Risikofaktor, besonders vorherige Krankenhausaufenthalte, Durchfall, Immunsuppression, Intubation bzw. invasive Beatmung, sowie Hämodialyse (Mutters et al., 2013).

Dennoch gibt es verschiedene Faktoren und Maßnahmen, welche die Transmission erschweren bzw. verhindern können. Die Anwendung dieser Maßnahmen sollte dabei situationsabhängig erfolgen. Außerdem sollte die Anwendung von Hygienemaßnahmen immer im Hinblick auf die jeweilige krankenhausspezifische VRE-Rate erfolgen (Tacconelli et al., 2004; Mutters et al., 2013).

Konsequente Händedesinfektion, Oberflächendesinfektion von patientennahen Flächen, Toilettendesinfektion (Durchführung evtl. durch den Patient selbst), Waschraum- und Badezimmerdesinfektion sind neben der Benutzung von dem Patienten zugeordneten

Pflegeequipment nur einige der Maßnahmen, welche VRE-Kolonisationen von anderen Patienten erschweren können (Mutters et al., 2013). Hier gilt die Händedesinfektion als besonders wichtig, da die meisten Übertragungen durch kontaminierte Hände verursacht werden (Von Baum et al., 2006; Vonberg et al., 2007).

Eine zusätzliche konsequente Benutzung von Handschuhen bzw. Schutzkitteln seitens des Pflegepersonals, sowie der Ärzte, kann beim Kontakt mit dem Patienten bzw. potentiell infektiösem Patientenmaterial für zusätzliche Sicherheit sorgen (Von Baum et al., 2006; Mutters und Frank, 2013; Mutters et al., 2013).

Im Speziellen kann die Verwendung von Schutzkitteln auch zur erfolgreichen Verhinderung der Kontamination der entsprechenden Bereichskleidung beitragen und dementsprechend insbesondere bei VRE-Ausbrüchen angewandt werden (Boyce et al., 1994; Vonberg et al., 2007). Zudem verbessert dies die Compliance gegenüber anderen Hygienemaßnahmen (Slaughter et al., 1996; Vonberg et al., 2007).

Einzelzimmer für betroffene Patienten mit eigener Toilette werden empfohlen (Byers et al., 2001; Vonberg et al., 2007) und können zugleich die Compliance für andere Hygienemaßnahmen erhöhen (Jochimsen et al., 1999; Vonberg et al., 2007). Allerdings ist hierbei zum einen der ökonomische Effekt auf das Krankenhaus laut Mutters et al. (Mutters et al., 2013) und zum anderen der negative psychische Effekt (Mackenzie und Edwards, 1997; Jones, 2010; Mozzillo et al., 2010; Mutters et al., 2013) durch Stigmatisierung wie er in Fällen von MRSA positiven Patienten beschrieben worden ist, zu berücksichtigen. Arbeiten zur Untersuchung dieses psychischen Effekts bei VRE-positiven Patienten sind noch nicht erschienen, dennoch sollte die Isolation des Patienten im Einzelzimmer zum Schutz anderer Patienten immer gut überlegt und dem Patienten verständlich vermittelt werden. Auf einer Intensivstation mit fast ausschließlich Einzelzimmern wie am KMV kommt dieser Überlegung eine geringere Bedeutung zu als auf Normalstation.

Zum Schutz nicht besiedelter Patienten ist die Durchführung einer Oberflächendesinfektion empfehlenswert, um die Transmissionswahrscheinlichkeit besonders bei gleichzeitiger Versorgung eines VRE-positiven Patienten in diesem Zimmer zu verringern (Bonten et al., 1996; Martínez et al., 2003; Hayden et al., 2006; Von Baum et al., 2006; Vonberg et al., 2007).

Im Rahmen eines plötzlichen Anstiegs der Anzahl von VRE-Nachweisen sollte eine Intensivierung der oben genannten Maßnahmen, eine Analyse von Verbreitungswegen des Erregers, sowie eine Konservierung der entsprechenden Isolate für mögliche weitere Analysen erfolgen. Zusätzlich erscheint ein konsequentes Screening aller Patienten der entsprechenden Station zur Aufdeckung unbekannter Träger als sinnvoll (Vonberg et al., 2007), denn es sind oft noch weitere VRE-Nachweise zu erwarten (Boyce et al., 1994; Vonberg et al., 2007).

Ob ein generelles Screening von Patienten durchgeführt wird, sollte in jeder Einrichtung individuell entschieden werden. Für das KMV erscheinen Screeningmaßnahmen in Risikobereichen (Intensivstation) bei einer VRE-Prävalenz von 23,5 % als sinnvoll und sollten weiterhin konsequent durchgeführt werden. Ein Vorteil eines regelmäßigen Screenings inklusive Aufnahmescreening liegt in der definitiven Möglichkeit der Unterscheidung zwischen mitgebrachter und erworbener Kolonisation und der schnelleren Erkennung von Ausbrüchen (siehe Diskussion 4.1.2.1). Laut einer Arbeit von Gastmeier et al. ist das Verhältnis von Patienten, die auf der Intensivstation einen VRE erwarben, im Vergleich zu den Patienten, welche bereits bei Aufnahme kolonisiert waren, fast gleich (Gastmeier et al., 2014). Diese Annahme könnte nach den Ergebnissen dieser Arbeit auch für das KMV gelten. Besonders in Gebieten mit hoher VRE-Prävalenz könnte ein Screening sinnvoll sein (Mutters et al., 2013). Als limitierender Faktor von Screeningmaßnahmen sind hierbei die Kosten, sowie die verfügbaren Methoden zu nennen. Dennoch gibt es auch Kliniken, welche kein generelles VRE-Screening durchführen und trotzdem keinen Anstieg der VRE-Häufigkeit in Blutkulturen beobachtet haben (Mutters et al., 2013).

4.2 Linezolid-resistente Enterokokken am KMV

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Häufigkeit und der Resistenzmechanismus Linezolid-resistenter Enterokokken am KMV untersucht (siehe Abschnitt 3.2).

Momentan sind zwei häufige Mechanismen beschrieben, durch welche Enterokokken Linezolidresistenz erlangen können (siehe Abschnitt 1.2.4; Liu et al., 2013; Patel et al., 2013; Sánchez-Díaz et al., 2014).

Die G2576T Mutation in einem oder mehreren der insgesamt sechs Allele ist dabei der häufigste Mechanismus. Neben ihr sind noch weitere Mutationen in der DNS für die

Domäne V der 23S RNA im Zusammenhang mit Linezolidresistenz beschrieben worden (Diaz et al., 2012; Long und Vester, 2012).

Die These, ob ein mutiertes Allel zum Erwerb einer Linezolidresistenz ausreicht, ist umstritten. Laut Marshall et al. reicht bereits die Mutation eines Allels aus, des Weiteren vermittelt eine Zunahme des Anteils der mutierten Allele eine höhere MHK (Marshall et al., 2002; Sánchez-Díaz et al., 2014). Andere Arbeiten vermuten, dass mehrere Allele mutiert sein müssen, um Linezolidresistenz zu vermitteln (Bourdon et al., 2011a; Patel et al., 2013). Bezugnehmend auf die benötigte Anzahl mutierter Allele sollte hierbei angemerkt werden, dass insbesondere unter dem starken Selektionsdruck einer entsprechenden Therapie mit Linezolid theoretisch ein mutiertes Allel bereits ausreichend sein könnte.

Aktuelle Arbeiten beschreiben zudem noch Mutationen der ribosomalen Proteine L3, L4, L22 in Verbindung mit Linezolidresistenz bzw. mit einer verminderten Linezolidempfindlichkeit (Diaz et al., 2012; Long und Vester, 2012; Patel et al., 2013; Mendes et al., 2014). Eine Übertragbarkeit dieser Resistenzmechanismen konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden (Diaz et al., 2012).

Weitere Möglichkeiten der Vermittlung von Linezolidresistenz sind noch nicht im Detail bekannt, dennoch beschreiben einige Arbeiten Linezolid-resistente *cfr*-negative Enterokokken bzw. Staphylokokken, welche keine Mutationen in der DNS für die Domäne V der 23S RNA oder für die ribosomalen Proteine L3, L4, L22 aufweisen (Quiles-Melero et al., 2013; Wang et al., 2014).

Hierdurch wird deutlich, dass es noch weitere Mechanismen geben muss.

Die durchgeführten Experimente wiesen bei allen Isolaten Mutationen der DNS für die Domäne V der 23S RNA, sowie Abwesenheit des *cfr*-Gens nach (siehe Abschnitt 3.2.2). Eine quantitative Analyse, wie viele der sechs Allele des Isolates mutiert waren, erfolgte nicht. Jedoch kann durch die hohen Linezolid-MHKs (siehe Abschnitt 3.2.1) vermutet werden, dass wahrscheinlich mehrere Allele mutiert sind oder die entsprechenden Isolate noch weitere momentan noch unbekannte Resistenzmechanismen neben der G2576T-Mutation aufweisen, welche eine hohe Linezolidresistenz bewirken.

Das RKI berichtete im Jahr 2013 über steigende Einsendezahlen Linezolid-resistenter Enterokokken und stellte die Vermutung eines möglichen Zusammenhangs mit dem steigenden klinischen Einsatz von Linezolid auf (RKI, 2013).

Auch am KMV konnte man im Vergleich 2007 und 2013 eine Zunahme Linezolid-resistenter Enterokokken in Urinkulturen nachweisen. Obwohl der prozentuale Anteil weiter unter 1 % liegt, hat sich die Anzahl mehr als verdreifacht. In Blutkulturen kam es bei gleichbleibender Anzahl zu einer Reduktion des prozentualen Anteils durch den vermehrten Nachweis von sensiblen Isolaten. Beide Entwicklungen (siehe Tab. 23) müssen vor dem Hintergrund eines steigenden diagnostischen Aufwands am KMV gesehen werden, mit einer Zunahme der untersuchten Blutkulturflaschen um 113,16 % (siehe Abschnitt 4.1.2) und der analysierten Urinproben um 49,9 % (Vergleich von 2007 und 2013). Somit befindet sich die Entwicklung am KMV im Einklang mit dem oben genannten Trend.

Tab. 23: Anzahl von Enterokokken bzw. von Linezolid-resistenten Enterokokken in Blut- und Urinkulturen im Vergleich des Jahres 2007 mit dem Jahr 2013.

	Blutkultur				Urinkultur			
	2007		2013		2007		2013	
	Anzahl	Davon resistent	Anzahl	Davon resistent	Anzahl	Davon resistent	Anzahl	Davon resistent
<i>E. faecium</i>	16	0 (0 %)	89	1 (1,1 %)	244	2 (0,8 %)	208	7 (3,4 %)
<i>E. faecalis</i>	16	1 (6,2 %)	41	0 (0 %)	35	0 (0 %)	396	0 (0 %)
Gesamt	32	1 (3,1 %)	130	1 (0,6 %)	279	2 (0,007 %)	604	7 (0,012 %)

Die Vermutung des RKI lässt sich anhand der Linezolidverbrauchszahlen am KMV bestätigen, da der Linezolidverbrauch nach Auskunft der Apotheke des Klinikums im Zeitraum 2010-2013 um 100 % zugenommen hat. Im Vergleich 2013 mit dem Vorjahr ließ sich dabei eine Zunahme um 34,9 % beobachten. Somit lässt sich eine Korrelation vermuten.

Unterstrichen wird diese Annahme dadurch, dass Arbeiten im Bezug auf die Induktion der Linezolidresistenz ein relativ homogenes Bild beschreiben und daneben das bereits eine kurze Linezolidexposition schon als ausreichend für die Entwicklung einer Linezolidresistenz mittels G2576T-Mutation erscheint (Afşar et al., 2012; Ntokou et al., 2012; Sánchez-Díaz et al., 2014). In einem Fall reichte eine 9 tägige Behandlung mit

Linezolid (Sánchez-Díaz et al., 2014), in einem anderen eine 3 tägige aus (Afşar et al., 2012).

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten unterstützen die oben diskutierten Thesen, besonders da alle untersuchten Isolate, die vermutlich durch Linezolidgabe und den resultierenden hohen Selektionsdruck entstandene Mutation in der DNS für die Domäne V der 23S RNA aufwiesen und bei keinem Isolat das *cfr*-Gen nachgewiesen werden konnte.

Es war leider nicht möglich zu überprüfen, ob und wenn ja, wie lange die entsprechenden Patienten Linezolid erhalten haben. Dennoch könnte der steigende Linezolidverbrauch am KMV nach Auskunft der Apotheke des Klinikums ein indirekter Hinweis auf eine vermehrte Gabe von Linezolid sein.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass einige der Linezolid-resistenten Isolate Vancomycin-sensibel sind. Ein möglicher Erklärungsversuch für diese Resistenzkonstellation ergibt sich durch die Kontraindikationen des Vancomycin (Niereninsuffizienz). Es ist hierbei allgemein bekannt, dass in Zeiten einer alternden Gesellschaft mit folglich physiologisch reduzierter Nierenfunktion und somit einer Kontraindikation für den Vancomycineinsatz, Linezolid als bevorzugtes Mittel, speziell in Kliniken mit chronisch schwerstkranken Patienten als Patientenspektrum (Kardiologie, Onkologie, Hämatologie, Anästhesiologie, Transplantationsmedizin) im direkten Vergleich unter den Reserveantibiotika angesehen werden könnte.

Dieses Patientenspektrum spiegelt sich besonders in der Verteilung der Linezolid-resistenten Enterokokken am KMV wieder (siehe Abschnitt 3.2.1).

Jedoch gilt diese spezielle Indikation für den Linezolideinsatz nicht für alle Patienten. Oft wird Linezolid auch zur Therapie einer VRE-Infektion eingesetzt, sodass eine Eindämmung der VRE-Häufigkeit vermutlich zu einer Reduktion des Linezolidverbrauchs in diesem Zusammenhang und somit zur Vermeidung der Entstehung von Linezolid-resistenzen bei Enterokokken führen könnte. Umgekehrt stellt sich die Frage, ob durch eine hohe VRE-Prävalenz bzw. vermehrten Einsatz von Vancomycin eine vermehrte Gabe von Linezolid die logische Konsequenz ist.

Des Weiteren muss auch die Gefahr der Transmission dieser resistenten Bakterien, insbesondere im Hinblick auf die Entstehung von resistenten endemisch auftretenden

Enterokokkenstämmen außerhalb des Krankenhauses in der Bevölkerung in Betracht gezogen werden.

Folglich muss durch die oben genannten Zeiten bis zur Resistenzentwicklung, den steigenden Einsatz von Linezolid, sowie die langen Überlebenszeiten von Enterokokken in der Umwelt (Klare et al., 2012b) die Frage nach der zukünftigen Entwicklung der Häufigkeit Linezolid-resistenter Enterokokken, besonders im Hinblick auf evtl. nötige Veränderungen oder Intensivierungen von Hygienemaßnahmen, um eventuelle Übertragungen zu verhindern, gestellt werden.

4.2.1 Molekulare Typisierung Linezolid-resistenter Enterokokken

Um der Frage nachzugehen, ob es Homologien zwischen den einzelnen Linezolid-resistenten Isolaten gibt und es somit zu Transmissionen zwischen Patienten gekommen sein könnte, erfolgte die molekulare Typisierung dieser Enterokokken in einem weiteren Teil der Arbeit.

Besonders vor dem Hintergrund der Ergebnisse in Abschnitt 3.1.3.3 und dem Aufkommen von ersten Berichten über ein gehäuftes Auftreten Linezolid-resistenter Enterokokkenisolate in einzelnen Krankenhäusern (Ntokou et al., 2012; RKI, 2013; Hegstad et al., 2014) besitzt diese Frage ein besonderes Gewicht. Eine Publikation untersuchte bereits das Auftreten von Linezolid-resistenten Enterokokken mit identischem genetischem Fingerabdruck in einem norwegischen Krankenhaus (Hegstad et al., 2014). Durch die in Abschnitt 3.2.1 dargestellte Verteilung der Isolate auf bestimmte Kliniken mit teilweise mehreren Isolaten pro Klinik musste dies als möglich erachtet werden, besonders nach Analyse des Resistenzmechanismus der einzelnen Isolate mittels PCR (G2576T), welcher als nicht übertragbar gilt (Diaz et al., 2012).

Die Ergebnisse der molekularen Typisierung mittels Diversilab sind in Abschnitt 3.2.3 dargestellt und legen die Vermutung nahe, dass Transmissionen Linezolid-resistenter Enterokokken zwischen Patienten nicht stattgefunden haben.

Dennoch kommt der Frage nach Transmissionen, unter Berücksichtigung der langen Überlebenszeiten von Enterokokken in der Umwelt, besonders auch auf unbelebten Oberflächen (Klare et al., 2012b; Wendt et al., 1998) und laut einem Experiment von Noskin et al. bzw. Wade et al. mit Überlebenszeiten von bis zu 30 min auf den Händen freiwilliger Probanden (Wade et al., 1991; Noskin et al., 1995), eine wichtige Bedeutung

zu. Im Besonderen unter Beachtung der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten von Linezolid-resistenten und evtl. noch zusätzliche Vancomycin-resistenten Enterokokken (siehe Abschnitt 1.2.3, 1.2.4, Tab. 1; Klare et al., 2012b).

Dementsprechend sind bei Vorliegen eines resistenten Isolats, genau wie bei Vorliegen von VRE Hygienemaßnahmen, als eine sehr sinnvolle Möglichkeit zur Verhinderung von Transmissionen Linezolid-resistenter Enterokokken anzusehen (siehe Abschnitt 4.1.3.2). Ein anderer Ansatz zur Vermeidung Linezolid-resistenter Enterokokken wäre der sorgsame Einsatz von Linezolid nur in ausgewählten Fällen unter konsequenter Berücksichtigung der Möglichkeit des schnellen Resistenzerwerbs unter entsprechender Therapie (RKI, 2010).

5. Zusammenfassung

Die Frage nach der molekularen Epidemiologie von multiresistenten Erregern gewinnt in der heutigen Zeit zunehmend für alle beteiligten Seiten an Bedeutung, weil die klinik-eigene Resistenzlage bei der Erstellung der Antibiotikarichtlinien Berücksichtigung finden sollte. Durch die Zunahme dieser resistenten Erreger und Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren, rücken Methoden zur schnellen Diagnostik und Verhinderung von Transmissionen mittels Hygienemaßnahmen in den Fokus.

Im Jahr 2013 wurde an einem nordrhein-westfälischen Klinikum der Maximalversorgung mit 1224 Betten das Vorkommen von VRE und Linezolid-resistenten Enterokokken unter besonderer Berücksichtigung des Resistenzmechanismus und des Genotyps untersucht, sowie eine Genotypisierung bestimmter Isolate aus bestimmten Bereichen bzw. aller Linezolid-resistenten Isolate durchgeführt. Ziel war es, die zeitliche Entwicklung, die Verteilung und das Verhältnis der einzelnen Genotypen in unterschiedlichen Kliniken zueinander, sowie im Verhältnis zur Gesamtheit der Isolate zu untersuchen und daneben durch molekulare Typisierung bestimmter Isolate die Epidemiologie bzw. die Möglichkeit von Transmissionen innerhalb einzelner Stationen (Intensivstation) und zwischen verschiedenen Kliniken unter Zuhilfenahme des Krankenhausinformationssystems zu analysieren.

Bei allen gesammelten und untersuchten VRE-Isolaten handelte es sich um Erstisolate der jeweiligen Patienten, welche mit Hilfe einer Multiplex-PCR auf das Vorliegen des *vanA*- und *vanB*-Gens untersucht wurden.

Dadurch konnten erstmals für das KMV Genotyp-abhängige Verteilungshäufigkeiten für Enterokokken ermittelt werden.

Es zeigte sich, dass es an bestimmten Kliniken zu mehr VRE-Erstnachweisen gekommen ist und dass die Isolate dieser Kliniken (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Medizinische Kliniken und Polikliniken I und II) sehr häufig von der entsprechenden Intensivstation stammten.

Die zur Untersuchung von möglichen Transmissionen durchgeführte molekulare Typisierung wies mehrere Cluster nach, bei welchen Transmissionen in der retrospektiv durchgeführten Analyse nicht restlos ausgeschlossen werden konnten. Die im Hinblick auf endemisch vorkommende Stämme durchgeführte Typisierung von Isolaten einer

weiteren räumlich getrennten Klinik (Medizinische Klinik und Poliklinik III) lieferte einen Hinweis dafür, dass es sich bei diesen Clustern sehr wahrscheinlich um klinikabhängige Cluster handeln könnte.

Die in einem weiteren Teil der Arbeit durchgeführte Analyse Linezolid-resistenter Enterokokken im Hinblick auf die Höhe der MHK, die Verteilung und den Resistenzmechanismus führte erstmals zu lokalen Informationen im Hinblick auf diese gegen das erst vor kurzer Zeit erschienene Reserveantibiotikum resistenten Isolate. Es zeigte sich, dass es vermutlich bei allen Isolaten unter Therapie zu einer Resistenzentwicklung gekommen ist. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der molekularen Typisierung noch verstärkt.

Das intensive Monitoring der VRE-Rate mittels Screening in besonderen Risikobereichen, die Multiplex-PCR im Hinblick auf die direkte, zuverlässige und schnelle genetische Testung des Genotypen und evtl. die molekulare Typisierung können somit als gute Kombination empfohlen werden, um Hygienemängel bzw. Verbesserungsmöglichkeiten im Hygienemanagement in bestimmten Bereichen zeitnah aufzudecken. In Kombination mit einem konsequent durchgeführten Eingangsscreening, sowie entsprechenden Hygienemaßnahmen könnten die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten, sowie diskutierten Empfehlungen zu einer Reduktion der VRE-Rate bzw. Transmissionswahrscheinlichkeit führen.

6. Anhang

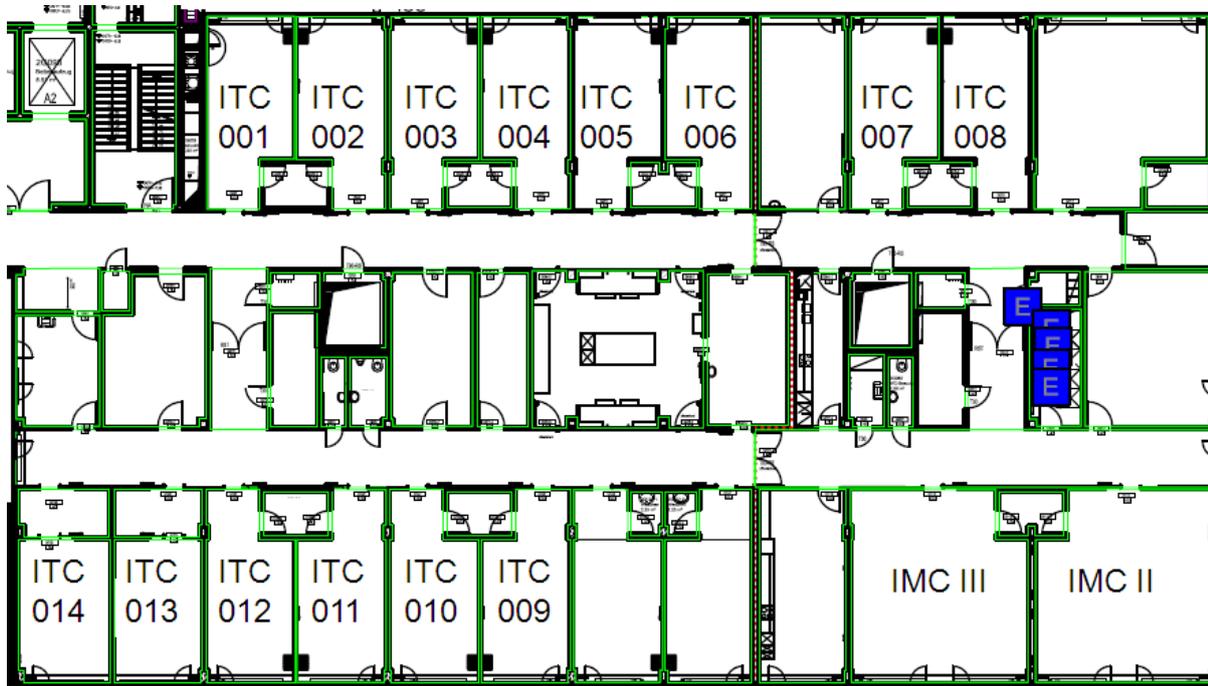


Abb. 13: Plan der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II. Bei ITC 001 – 014 handelt es sich um Einbettzimmer. IMC II und III sind Vierbettzimmer (IMC II: B05 - B08 bzw. IMC III: B09 - 12).

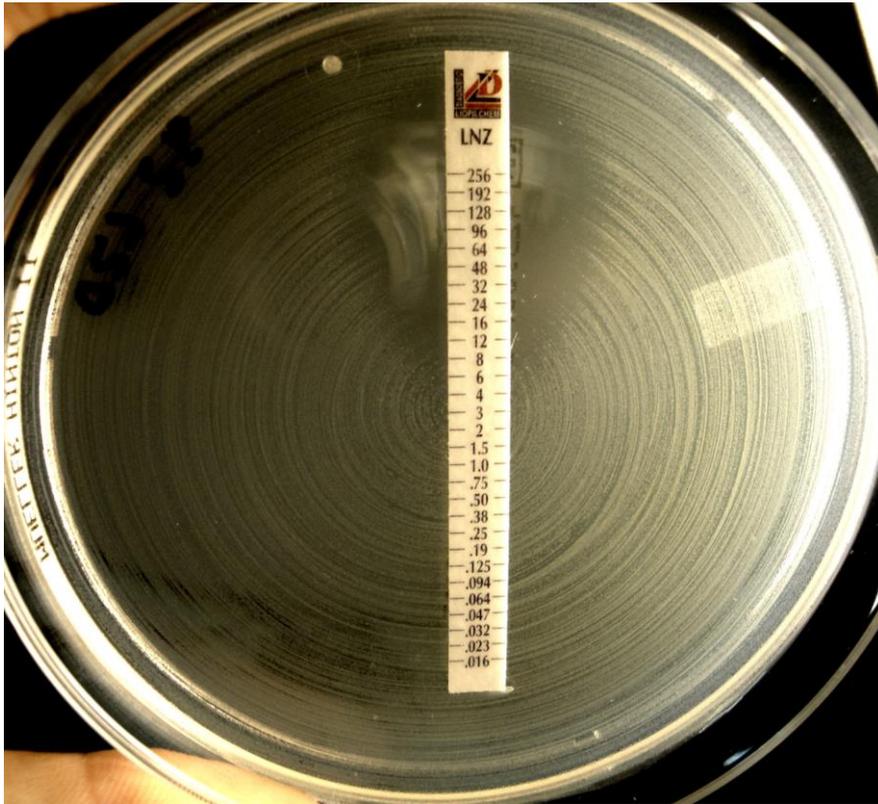


Abb. 14: E-Test eines Linezolid-resistenten Enterokokkenisolats.

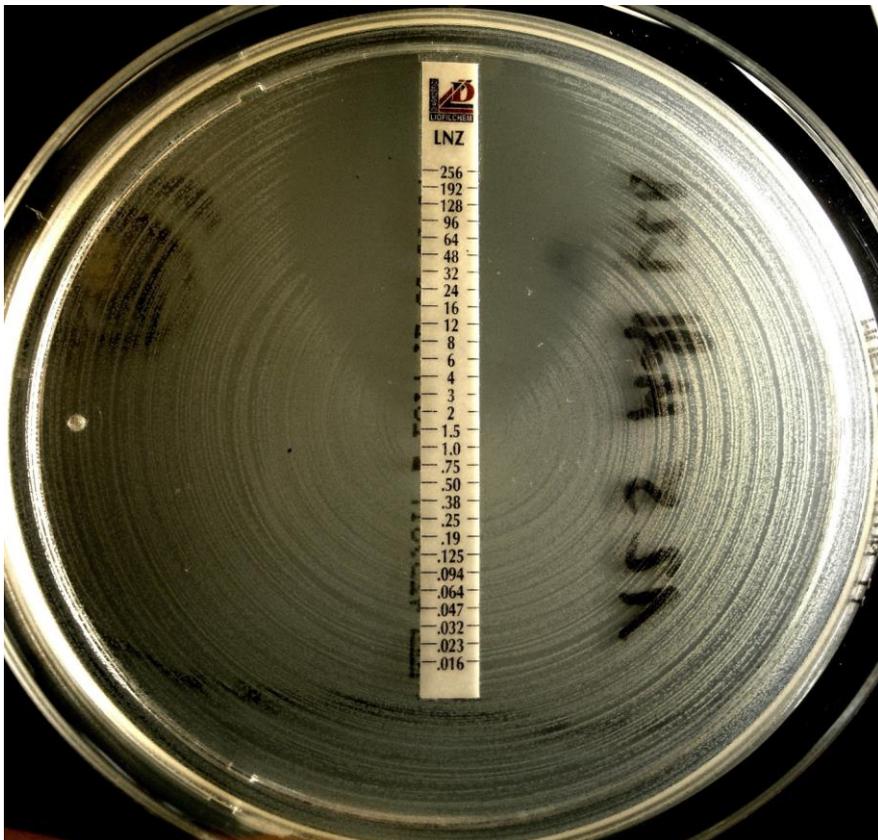


Abb. 15: E-Test eines Linezolid-sensiblen Enterokokkenisolats.

Tab. 24: Im Rahmen der Dissertation untersuchte Enterokokkenisolate. Angegeben ist die Nummer, die Resistenz gegen Vancomycin (Genotyp) bzw. Linezolid, sowie die Enterokokkenart. Isolate, die zum Kontrollkollektiv der VanA/VanB-Multiplex-PCR gehören (siehe Abschnitt 3.1.2.1) sind mit einem K markiert.

Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art	Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art
1	VanB		<i>E. faecium</i>	38	VanA		<i>E. faecium</i>
2	VanB		<i>E. faecium</i>	39 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
3	VanB	X	<i>E. faecium</i>	40	VanA		<i>E. faecium</i>
4	VanA		<i>E. faecium</i>	41	VanB		<i>E. faecium</i>
5	VanA		<i>E. faecium</i>	42	VanB		<i>E. faecium</i>
6	VanB		<i>E. faecium</i>	43	VanA		<i>E. faecium</i>
7	VanB		<i>E. faecium</i>	44	VanB		<i>E. faecium</i>
8	VanB		<i>E. faecium</i>	45	VanB		<i>E. faecium</i>
9	VanA		<i>E. faecium</i>	46	VanB		<i>E. faecium</i>
10 K	VSE		<i>E. faecium</i>	47	VanB		<i>E. faecium</i>
11	VanB		<i>E. faecium</i>	48	VanB		<i>E. faecium</i>
12	VanB	X	<i>E. faecium</i>	49	VanA		<i>E. faecium</i>
13	VanB		<i>E. faecium</i>	50	VanB		<i>E. faecium</i>
14	VanB		<i>E. faecium</i>	51	VanA		<i>E. faecium</i>
15	VanA		<i>E. faecium</i>	52	VanA		<i>E. faecium</i>
16	VanB		<i>E. faecium</i>	53	VanA		<i>E. faecium</i>
17	VanB		<i>E. faecium</i>	54	VanA		<i>E. faecium</i>
18	VanB		<i>E. faecium</i>	55	VanA		<i>E. faecium</i>
19 K	VSE		<i>E. faecium</i>	56	VanB		<i>E. faecium</i>
20	VanB		<i>E. faecium</i>	57	VanA		<i>E. faecium</i>
21	VanA		<i>E. faecium</i>	58	VanA		<i>E. faecium</i>
22	VanA		<i>E. faecium</i>	59	VanA		<i>E. faecium</i>
23	VanA		<i>E. faecium</i>	60	VanA		<i>E. faecium</i>
24	VanA		<i>E. faecium</i>	61	VanA		<i>E. faecium</i>
25	VanB		<i>E. faecium</i>	62	VanA		<i>E. faecium</i>
26	VanB		<i>E. faecium</i>	63	VanA		<i>E. faecium</i>
27	VanB		<i>E. faecium</i>	64	VanB		<i>E. faecium</i>
28	VanB		<i>E. faecium</i>	65	VanA		<i>E. faecium</i>
29	VanB		<i>E. faecium</i>	66	VanA	X	<i>E. faecium</i>
30 K	VSE		<i>E. faecium</i>	67	VanB		<i>E. faecium</i>
31	VanB		<i>E. faecium</i>	68	VanB		<i>E. faecium</i>
32 K	VSE		<i>E. faecalis</i>	69	VanB		<i>E. faecium</i>
33	VanB		<i>E. faecium</i>	70	VanB		<i>E. faecium</i>
34	VanB		<i>E. faecium</i>	71	VanB		<i>E. faecium</i>
35	VanB		<i>E. faecium</i>	72	VanA		<i>E. faecium</i>
36	VanA		<i>E. faecium</i>	73	VanA		<i>E. faecium</i>
37	VanB		<i>E. faecium</i>	74	VanB		<i>E. faecium</i>

Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art	Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art
75	VanB	X	<i>E. faecium</i>	117	VanA		<i>E. faecium</i>
76	VanB		<i>E. faecium</i>	118	VanB		<i>E. faecium</i>
77	VanB		<i>E. faecium</i>	119	VanB		<i>E. faecium</i>
78	VanA		<i>E. faecium</i>	120	VanB		<i>E. faecium</i>
79	VanA		<i>E. faecium</i>	121	VanB		<i>E. faecium</i>
80	VanB		<i>E. faecium</i>	122	VanB		<i>E. faecium</i>
81	VanB		<i>E. faecium</i>	123	VanB		<i>E. faecium</i>
82	VanB		<i>E. faecium</i>	124	VanB		<i>E. faecium</i>
83	VanB		<i>E. faecium</i>	125	VanA		<i>E. faecium</i>
84	VanB		<i>E. faecium</i>	126	VanB		<i>E. faecium</i>
85	VanA		<i>E. faecium</i>	127	VanA		<i>E. faecium</i>
86	VanB		<i>E. faecium</i>	128	VanB		<i>E. faecium</i>
87	VanA		<i>E. faecium</i>	129	VanA		<i>E. faecium</i>
88	VanA		<i>E. faecium</i>	130	VanA		<i>E. faecium</i>
89	VanB		<i>E. faecium</i>	131	VanB		<i>E. faecium</i>
90	VanA		<i>E. faecium</i>	132	VanB		<i>E. faecium</i>
91	VanB		<i>E. faecium</i>	133	VanA		<i>E. faecium</i>
92	VanB		<i>E. faecium</i>	134	VanB		<i>E. faecium</i>
93	VanB		<i>E. faecium</i>	135	VanB		<i>E. faecium</i>
94	VanB		<i>E. faecium</i>	136	VanA		<i>E. faecium</i>
95	VanB		<i>E. faecium</i>	137	VanA		<i>E. faecium</i>
96	VanB		<i>E. faecium</i>	138	VanB		<i>E. faecium</i>
97	VanB		<i>E. faecium</i>	139	VanB		<i>E. faecium</i>
98	VanB		<i>E. faecium</i>	140	VanB		<i>E. faecium</i>
99	VanB		<i>E. faecium</i>	141	VanB		<i>E. faecium</i>
100	VanA		<i>E. faecium</i>	142	VanB		<i>E. faecium</i>
101	VanB		<i>E. faecium</i>	143	VanB		<i>E. faecium</i>
102	VanA		<i>E. faecium</i>	144	VanA		<i>E. faecium</i>
103	VanA		<i>E. faecium</i>	145	VanA		<i>E. faecium</i>
104	VanB		<i>E. faecium</i>	146	VanA		<i>E. faecium</i>
105	VanB		<i>E. faecalis</i>	147	VanA		<i>E. faecium</i>
106	VanB		<i>E. faecium</i>	148	VanB		<i>E. faecium</i>
107	VanB		<i>E. faecium</i>	149	VanA		<i>E. faecium</i>
108	K VSE		<i>E. faecalis</i>	150	VanB		<i>E. faecium</i>
109	VanB		<i>E. faecium</i>	151	VanB		<i>E. faecium</i>
110	VanA		<i>E. faecium</i>	152	VanB		<i>E. faecium</i>
111	VanA		<i>E. faecium</i>	153	VanA		<i>E. faecium</i>
112	VanB		<i>E. faecium</i>	154	VanB		<i>E. faecium</i>
113	VanB		<i>E. faecium</i>	155	VanA		<i>E. faecium</i>
114	VanA		<i>E. faecium</i>	156	VanA		<i>E. faecium</i>
115	VanB		<i>E. faecium</i>	157	VanA		<i>E. faecium</i>
116	VanB		<i>E. faecium</i>	158	VanA		<i>E. faecium</i>

Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art	Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art
159	VanB		<i>E. faecium</i>	201	VanB	X	<i>E. faecium</i>
160	VanB		<i>E. faecium</i>	202	VanA	X	<i>E. faecium</i>
161	VanB		<i>E. faecium</i>	203	VanA	X	<i>E. faecium</i>
162	VSE	X	<i>E. faecium</i>	204	VanA	X	<i>E. faecium</i>
163	VanB		<i>E. faecium</i>	205	VanB	X	<i>E. faecium</i>
164	VanB		<i>E. faecium</i>	206	VanA	X	<i>E. faecium</i>
165	VanA		<i>E. faecium</i>	207	VSE	X	<i>E. faecium</i>
166	VanA		<i>E. faecium</i>	208 K	VSE		<i>E. faecium</i>
167	VanB		<i>E. faecium</i>	209 K	VSE		<i>E. faecium</i>
168	VanA		<i>E. faecium</i>	210 K	VSE		<i>E. faecium</i>
169	VanA		<i>E. faecium</i>	211 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
170	VanB		<i>E. faecium</i>	212 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
171	VanA		<i>E. faecium</i>	213 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
172	VanB		<i>E. faecium</i>	214 K	VSE		<i>E. faecium</i>
173	VanA		<i>E. faecium</i>	215 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
174	VanB		<i>E. faecium</i>	216 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
175	VanB		<i>E. faecium</i>	217 K	VSE		<i>E. faecium</i>
176	VanA		<i>E. faecium</i>	218 K	VSE		<i>E. faecium</i>
177	VanA		<i>E. faecium</i>	219 K	VSE		<i>E. faecium</i>
178	VanA		<i>E. faecium</i>	220 K	VSE		<i>E. faecium</i>
179	VanB		<i>E. faecium</i>	221 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
180	VanB		<i>E. faecium</i>	222 K	VSE		<i>E. faecium</i>
181	VanB		<i>E. faecium</i>	223 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
182	VanB		<i>E. faecium</i>	224 K	VSE		<i>E. faecium</i>
183	VanA		<i>E. faecium</i>	225 K	VSE		<i>E. faecium</i>
184	VanA		<i>E. faecium</i>	226 K	VSE		<i>E. faecium</i>
185	VanB		<i>E. faecium</i>	227 K	VSE		<i>E. faecium</i>
186	VanA		<i>E. faecium</i>	228 K	VSE		<i>E. faecium</i>
187	VanA		<i>E. faecium</i>	229 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
188	VanB		<i>E. faecium</i>	230 K	VSE		<i>E. faecium</i>
189	VanA		<i>E. faecium</i>	231 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
190	VanA		<i>E. faecium</i>	232 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
191	VanB		<i>E. faecium</i>	233 K	VSE		<i>E. faecium</i>
192	VanB		<i>E. faecium</i>	234 K	VSE		<i>E. faecium</i>
193	VanB		<i>E. faecium</i>	235 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
194	VanB		<i>E. faecium</i>	236 K	VSE		<i>E. faecium</i>
195	VanB		<i>E. faecium</i>	237 K	VSE		<i>E. faecium</i>
196	VanA		<i>E. faecium</i>	238 K	VSE		<i>E. faecalis</i>
197	VanB		<i>E. faecium</i>	239 K	VSE		<i>E. faecium</i>
198	VanB		<i>E. faecium</i>	240 K	VSE		<i>E. faecium</i>
199	VSE	X	<i>E. faecium</i>	241 K	VSE		<i>E. faecium</i>
200	VSE	X	<i>E. faecalis</i>	242 K	VSE		<i>E. faecium</i>

Nr.	Vancomycin	Linezolid	Enterokokken -art
243	K	VSE	<i>E. faecium</i>
244	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
245	K	VSE	<i>E. faecium</i>
246	K	VSE	<i>E. faecium</i>
247	K	VSE	<i>E. faecium</i>
248	K	VSE	<i>E. faecium</i>
249	K	VSE	<i>E. avium</i>
250	K	VSE	<i>E. faecium</i>
251	K	VSE	<i>E. faecium</i>
252	K	VSE	<i>E. faecium</i>
253	K	VSE	<i>E. faecium</i>
254	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
255	K	VSE	<i>E. faecium</i>
256	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
257	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
258	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
259	K	VSE	<i>E. faecium</i>
260	K	VSE	<i>E. faecium</i>
261	K	VSE	<i>E. faecium</i>
262	K	VSE	<i>E. faecalis</i>
263	K	VSE	<i>E. faecium</i>
264	K	VSE	<i>E. faecium</i>
265	K	VSE	<i>E. faecium</i>
266	K	VSE	<i>E. faecium</i>

Tab. 25: Zusätzliche Daten für die quartalsübergreifende Clusteranalyse. Aufgelistet sind die Clusternummer, die Patientennummer, Vorscreenings, das Datum der Entnahme der positiven Probe, der Aufenthaltszeitraum im KMV (Aufenthalt davon auf der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II) und die Zimmernummer auf der Intensivstation von fraglichen Isolate mit einer Homologie $\geq 98\%$ (siehe Abb. 8A, sowie Abschnitt 3.1.3.2 und 3.1.3.3) als Ergänzung zu Tab. 20. Die angegebene Clusternummer bezieht sich auf Abb. 8A. In Fett markiert ist das Zimmer, in dem die positive Probe entnommen wurde. pos.=positiv, neg.=negativ.

Clusternr.	Patientenr.	Vorscreening	Datum der pos. Probe	Aufenthalt im KMV (davon Aufenthalt auf der Intensivstation)	Zimmernummer auf der Intensivstation (Zeitraum)
3	53	Kein Vorbefund	04.02.13	18.01.-06.02.13 (22.01.-06.02.13)	IMC II B05 (22.01.-24.01.13) ITC 006 (24.01.-06.02.13)
4	66	Kein Vorbefund	01.02.13	23.01.-08.03.13 (23.-27.01.13; 28.01.-15.02.13; 19.-28.02.13; 05.- 08.03.13)	IMC III B12 (23.-27.01.13) IMC II B08 (28.01.-07.02.13) ITC 004 (07.-08.02.13) IMC II B08 (08.-15.02.13) ITC 012 (19.-28.02.13) ITC 003 (05.-08.03.13)
5	138	Kein Vorbefund	01.12.13	Voraufenthalt im KMV:10.-23.10.13 (10.-15.10.13); 01.-09.12.13 (01.- 03.12.13)	ITC 008 (1.-15.10.13) IMC II B10 (01.-03.12.13)
	86	29.04.13 neg. für VRE	13.05.13	17.04.-19.07.13 (17.04.-12.07.13)	IMC II B07 (17.-19.04.13) IMC III B11 (19.04.-13.05.13) ITC 012 (13.05.-12.07.13)
6	93	Kein Vorbefund	24.06.13	10.06.-18.08.13 (14.06.-15.08.13)	IMC II B05 (14.06.13) IMC III B12 (14.-30.06.13) ITC 010 (30.06.-05.07.13) ITC 001 (05.07.-15.08.13)

6.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Natürliche und erworbene Resistenzen der Gattung Enterococcus.....	9
Tab. 2: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Geräte.....	19
Tab. 3: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien).....	20
Tab. 4: Zur Erstellung der Arbeit im Labor verwendete Reagenzien und Materialien.	21
Tab. 5: Versuchsansätze der DreamTaq- und Phusion-PCR.....	24
Tab. 6: Temperatur und Zeiten der einzelnen PCRs.....	24
Tab. 7: Mengen und Konzentrationen der verwendeten Reagenzien der VanA/VanB-PCR.....	26
Tab. 8: Zur Erstellung der Arbeit verwendete Primer und Sonden.....	27
Tab. 9: Im Rahmen der Agarose-Gelelektrophorese benutzte Puffer, Lösungen und Molekulargewichtsmarker.....	28
Tab. 10: Übersicht der Plasmidkonstruktion des Vektors pGL3-Basic.	29
Tab. 11: Reaktionsansatz des Restriktionsverdau.	30
Tab. 12: Reaktionsansatz der Dephosphorylierung des Vektors.	31
Tab. 13: Reaktionsansatz der Ligation.....	31
Tab. 14: Verwendete Kontrollansätze der Klonierung.....	32
Tab. 15: Benutzte Primer und erwartete Fragmentgröße.....	33
Tab. 16: Vierfeldertafel I.....	40
Tab. 17: Vierfeldertafel II.....	41
Tab. 18: Verteilung der VRE-Erstisolate der Stichprobe pro Monat pro Klinik.	45
Tab. 19: Homologie der einzelnen Stämme innerhalb eines Clusters zueinander	49
Tab. 20: Daten für die Clusteranalyse.....	51
Tab. 21: Linezolid-resistente Enterokokken.....	56
Tab. 22: Vergleich der Enterokokken- und VRE-Nachweise am KMV in Blutkulturen der Jahre 2007 und 2013.....	63
Tab. 23: Anzahl von Enterokokken bzw. von Linezolid-resistenten Enterkokken in Blut- und Urinkulturen im Vergleich des Jahres 2007 mit dem Jahr 2013.	78
Tab. 24: Im Rahmen der Dissertation untersuchte Enterokokkenisolate.....	86
Tab. 25: Zusätzliche Daten für die quartalsübergreifende Clusteranalyse..	90

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: VRE-Erstisolat Verteilung am KMV 2013.....	36
Abb. 2: Verteilung und Vergleich der VRE-Nachweise gegenüber den VRE- Erstnachweisen der Stichprobe pro Monat des Jahres 2013.....	37
Abb. 3: Einsatzmöglichkeiten der VanA/VanB-PCR und aktueller Ablauf in der Diagnostik bei Verdacht auf VRE.....	38
Abb. 4: Beispiellauf der VanA/VanB-Multiplex-PCR mit Kontrollplasmiden, Kontrolllysaten und H ₂ O als Negativkontrolle.	41
Abb. 5: Verteilung der Genotypen in den vom IMMIP versorgten Kliniken.....	42
Abb. 6: VRE Genotypenverteilung der Isolate der Stichprobe an den 5 häufigsten Nachweisorten.	43
Abb. 7: Verteilung der VRE-Erstisolate der Stichprobe pro Monat des Jahres 2013.....	44
Abb. 8: Ergebnis der molekularen Typisierung ausgewählter VRE-Erstisolate.	47
Abb. 9: Quartalsweise Analyse der molekularen Typisierung der VRE-Erstisolate der Intensivstationen der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II.....	48
Abb. 10: Ergebnis der molekularen Typisierung der VRE-Erstisolate der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I, II (nur Intensivstation) und III (mit Stern markiert).	54
Abb. 11: Verteilung Linezolid-resistenter Enterokokken der Stichprobe am KMV.....	57
Abb. 12: Ergebnis der molekularen Typisierung der untersuchten Linezolid-resistenten Enterokokken des KMV.	58
Abb. 13: Plan der Intensivstation der Medizinischen Kliniken und Polikliniken I und II... ..	84
Abb. 14: E-Test eines Linezolid-resistenten Enterokokkenisolats.....	85
Abb. 15: E-Test eines Linezolid-sensiblen Enterokokkenisolats.	85

7. Literaturverzeichnis

- Afşar I, Barış I, Sener AG, Köksal V, Demirci M. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium*: the first G2576T mutation in Turkey. *Mikrobiyoloji Bül* 2012; 46: 516–518
- Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 266–278
- Basioukas P, Vezakis A, Zarkotou O, Fragulidis G, Themeli-Digalaki K, Rizos S, Polydorou A. Isolated microorganisms in plastic biliary stents placed for benign and malignant diseases. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* 2014; 27: 399–403
- Von Baum H, Dettenkofer M, Fahr A, Heeg P, Wendt C. Konsensusempfehlung Baden-Württemberg: Umgang mit Patienten mit Glykopeptid-resistenten Enterokokken (GRE) / Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). *Hyg Med* 2006; 31: 30-32
- Bhorade SM, Christenson J, Pohlman AS, Arnow PM, Hall JB. The incidence of and clinical variables associated with vancomycin-resistant enterococcal colonization in mechanically ventilated patients. *CHEST J* 1999; 115: 1085–1091
- Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, Rice T. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1996; 348: 1615–1619
- Bourdon N, Bérenger R, Lepoultier R, Mouet A, Lesteven C, Borgey F, Fines-Guyon M, Leclercq R, Cattoir V. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs by the Cepheid Xpert vanA/vanB assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 291–293
- Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, Cattoir V. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother* 2011a; 66: 713–721
- Bourdon N, Lemire A, Fines-Guyon M, Auzou M, Périchon B, Courvalin P, Cattoir V, Leclercq R. Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Methods* 2011b; 84: 74–80
- Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo R, Fortna S, Medeiros A. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1148–1153
- Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Germanson TP, Gold HS, Durbin LJ, Simonton B, Farr B. A Hospital Epidemic of Vancomycin-Resistant *Enterococcus*: Risk Factors and Control. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 140–147
- Cercenado E. *Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica* 2011; 29: 59–65

- Chuang YC, Wang JT, Chen ML, Chen YC. Comparison of an Automated Repetitive-Sequence-Based PCR Microbial Typing System with Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2897–2901
- Clemett D, Markham A. Linezolid. *Drugs* 2000; 59: 815–827
- Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42: S25–34
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5857–5860
- DiazGranados CA, Zimmer SM, Mitchel K, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 327–333
- Diaz L, Kiratisin P, Mendes RE, Panesso D, Singh KV, Arias CA. Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Linezolid Due to *cfr* in a Human Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3917–3922
- Eich G, Krähenbrühl S. Neue Methoden in Diagnostik und Therapie: Linezolid. *Forum Med Suisse* 2002; 1: 53–56
- EUCAST, 2014: Breakpoint table v 4.0.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf (Zugriffsdatum: 09.10.2014)
- Fines M, Leclercq R. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 797–802
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009; 155: 1749–1757
- Flamm RK, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. LEADER Surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 54–61
- Gastmeier P, Schroder C, Behnke M, Meyer E, Geffers C. Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1660–1664
- Grabsch EA, Ghaly-Derias S, Gao W, Howden BP. Comparative Study of Selective Chromogenic (chromID VRE) and Bile Esculin Agars for Isolation and Identification of vanB-Containing Vancomycin-Resistant Enterococci from Feces and Rectal Swabs. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4034–4036
- Griffith RS. Vancomycin use—an historical review. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14: 1–5

- Hawley HB, Gump DW. Vancomycin therapy of bacterial meningitis. *Am J Dis Child* 1973; 126: 261–264
- Hayden MK, Bonten MJM, Blom DW, Lyle EA, van de Vijver DAMC, Weinstein RA. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2006; 42: 1552–1560
- Hegstad K, Longva JÅ, Hide R, Aasnæs B, Lunde TM, Simonsen GS. Cluster of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* ST117 in Norwegian hospitals *Scand J Infect Dis* 2014; 46: 712–715
- Hilmi D, Parcina M, Bode K, Ostrop J, Schuett S, Heeg K, Ziebuhr W, Sommerburg O, Beckerdjian-Ding I. Functional variation reflects intra-strain diversity of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the host–pathogen interaction. *Int J Med Microbiol* 2013; 303: 61–69
- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, van Embden JDA, Willems RJL. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1963–1971
- Hong HJ, Hutchings MI, Buttner MJ. Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. In: Utsumi R, Hrsg. *Bact Signal Transduct Netw Drug Targets*. New York: Springer, 2008: 200-213
- Howden BP, Holt KE, Lam MMC, Seemann T, Ballard S, Coombs GW, Tong SYC, Grayson ML, Johnson PDR, Stinear TP. Genomic Insights to Control the Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *mBio* 2013; 4: e00412–e00413
- Human Genomics, 2015: Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. <http://www.humgenomics.com/content/9/1/19> (Zugriffsdatum: 14.11.2015)
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465–2466
- IfSG, 2015: § 2 Begriffsbestimmungen. http://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/___2.html (Zugriffsdatum: 10.03.2015)
- Jochimsen EM, Fish L, Manning K, Young S, Singer DA, Baker R, Jarvis WR. Control of Vancomycin-Resistant Enterococci at a Community Hospital: Efficacy of Patient and Staff Cohorting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 106–109
- Jones D. How to reduce the negative psychological impact of MRSA isolation on patients. *Nurs Times* 2010; 106: 14–16
- Kaier K, Mutters NT, Frank U. Bed occupancy rates and hospital-acquired infections—should beds be kept empty? Bed occupancy rates and hospital-acquired infections. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 941–945

- Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 Insertion Sequences are Involved in the Mobility of the Multiresistance Gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 483–487
- Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of Florfenicol Resistance Genes *fexA* and *cfr* among Chloramphenicol-Resistant *Staphylococcus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1156–1163
- Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503: Drug resistance by methylation of A2503 in 23S rRNA. *Mol Microbiol* 2005; 57: 1064–1073
- Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest® vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012a; 74: 171–176
- Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2012b; 55:1387–1400
- Kolar M, Vagnerova I, Latal T, Urbanek K, Typovska H, Hubacek J, Papajik T, Raida L, Faber E. The occurrence of vancomycin-resistant enterococci in hematological patients in relation to antibiotic use. *New Microbiol* 2002; 25: 205–212
- Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 10–15
- Levine DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 5–12
- Linden PK, Pasculle AW, Manez R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, Kusne S. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1996; 22: 663–670
- Liss BJ, Vehreschild JJ, Cornely OA, Hallek M, Fätkenheuer G, Wisplinghoff H, Seifert H, Vehreschild MJGT. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 2012; 40: 613–619
- Liu Y, Wang Y, Schwarz S, Li Y, Shen Z, Zhang Q, Wu C, Shen J. Transferable Multiresistance Plasmids Carrying *cfr* in *Enterococcus* spp. from Swine and Farm Environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 42–48
- Lodise TP, McKinnon PS, Tam VH, Rybak MJ. Clinical outcomes for patients with bacteremia caused by vancomycin-resistant enterococcus in a level 1 trauma center. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 922–929
- Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The *Cfr* rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicol, Lincosamides,

Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2500–2505

- Long KS, Vester B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 603–612
- Mackenzie D, Edwards A. MRSA: the psychological effects. *Nurs Stand R Coll Nurs G B* 1997; 12: 49–53
- Malathum K, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 211–215
- Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3334–3336
- Martínez JA, Ruthazer R, Hansjosten K, Barefoot L, Snyderman DR. Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1905–1912
- Marvaud JC, Mory F, Lambert T. *Clostridium clostridioforme* and *Atopobium minutum* Clinical Isolates with VanB-Type Resistance in France *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3436–3468
- Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat* 2014; 17: 1–12
- Meyer E, Ziegler R, Mattner F, Schwab F, Gastmeier P, Martin M. Increase of patients co-colonised or co-infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Infection* 2011; 39: 501–506
- Miranda AG, Singh KV, Murray BE. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2752–2757
- Mozzillo KL, Ortiz N, Miller LG. Patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: twenty-first century lepers. *J Hosp Infect* 2010; 75: 132–134
- Mutters NT, Frank U. Sources of systematic errors in the epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Infection* 2013; 41: 305–310
- Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant *Enterococci* in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110: 725
- Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am* 1995; 16: 577–581

- Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I, Dimitroulia E, Labrou M, Vasdeki A, Makris D, Zakyntinos E, Tsakris A, Pournaras S. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1819–1823
- Olivier CN, Blake RK, Steed LL, Salgado CD. Risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bloodstream infection among patients colonized with VRE. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 404–409
- Paganelli FL, Willems RJ, Leavis HL. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends Microbiol* 2012; 20: 40–49
- Pangallo D, Drahovska H, Harichova J, Karellova E, Chovanova K, Aradska J, Ferianc P, Turna J, Timko J. Evaluation of different PCR-based approaches for the identification and typing of environmental enterococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 93: 193–203
- Patel SN, Memari N, Shahinas D, Toye B, Jamieson FB, Farrell DJ. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* isolated in Ontario, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77: 350–353
- Pelz RK, Lipsett PA, Swoboda SM, Diener-West M, Powe NR, Brower RG, Perl TM, Hammond JM, Hendrix CW. Vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant enterococcal infections in the ICU: attributable costs and outcomes. *Intensive Care Med* 2002; 28: 692–697
- Pounder JI, Shutt CK, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of repetitive sequence-based polymerase chain reaction using the DiversiLab System for strain typing of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 183–187
- Promega, 2008: pGL3 Luciferase Reporter Vectors Protocol.
<https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgl3%20luciferase%20reporter%20vectors%20protocol.pdf> (Zugriffsdatum: 30.08.2013)
- Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. Resistance to Linezolid: Characterization of Mutations in rRNA and Comparison of Their Occurrences in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2154–2156
- Quiles-Melero I, Gomez-Gil R, Romero-Gomez MP, Sanchez-Diaz AM, de Pablos M, Garcia-Rodriguez J, Gutierrez A, Mingorance J. Mechanisms of Linezolid Resistance among Staphylococci in a Tertiary Hospital. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 998–1001
- Rerknimitr R, Fogel EL, Kalayci C, Esber E, Lehman GA, Sherman S. Microbiology of bile in patients with cholangitis or cholestasis with and without plastic biliary endoprosthesis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 885–889

- Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 1989; 8: 943–950
- RKI, 2010: Epidemiologisches Bulletin Nr. 44 2010.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/44_13.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 09.10.2014)
- RKI, 2011: Definitionen nosokomialer Infektionen (CDC-Definitionen).
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Nosokomiale_Infektionen/n/nosok_infekt_pdf2.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 12.10.2014)
- RKI, 2013: Epidemiologisches Bulletin Nr. 33 2013.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/33_13.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 08.10.2014)
- Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T, Grucz RG. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate and-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1062–1066
- Saadat S, Solhjoo K, Norooz-Nejad MJ, Kazemi A. VanA and VanB Positive Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Among Clinical Isolates in Shiraz, South of Iran. *Oman Med J* 2014; 29: 335–339
- Salgado CD, Farr BM. Outcomes Associated With Vancomycin-Resistant Enterococci: A Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 690–698
- Sánchez-Díaz AM, Cuartero C, Lozano S, Rodríguez JD, Alonso JM, Quiles-Melero I, López J, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Emergence and Long-Lasting Persistence of Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* ST117 in an Oncohematologic Patient After a Nine-Day Course of Linezolid. *Microb Drug Resist* 2014; 20: 17–21
- Schneider J, Hapfelmeier A, Fremd J, Schenk P, Obermeier A, Burgkart R, Forkl S, Feihl S, Wantia N, Neu B, Bajbouj M, von Delius S, Schmid RM, Algül H, Weber A. Biliary Endoprosthesis: A Prospective Analysis of Bacterial Colonization and Risk Factors for Sludge Formation. *PLoS ONE* 2014; 9: 1-10
- Schulte B, Heininger A, Autenrieth IB, Wolz C. Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 1131-1133
- Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a Plasmid-Borne Chloramphenicol-Florfenicol Resistance Gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2530–2533
- Sciencedirect, 2015: Emergence of daptomycin non-susceptibility in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during daptomycin therapy.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422115300084>
 (Zugriffsdatum: 14.11.2015)

- Sheng WH, Wang JT, Lu DCT, Chie WC, Chen YC, Chang SC. Comparative impact of hospital-acquired infections on medical costs, length of hospital stay and outcome between community hospitals and medical centres. *J Hosp Infect* 2005; 59: 205–214
- Sherer CR, Sprague BM, Campos JM, Nambiar S, Temple R, Short B, Singh N. Characterizing vancomycin-resistant enterococci in neonatal intensive care. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1470–1472
- Singh N, Leger M, Campbell J, Short B, Campos JM. Control of Vancomycin-Resistant Enterococci in the Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 646–649
- Slaughter S, Hayden MK, Nathan C, Hu TC, Rice T, Van Voorhis J, Matushek M, Franklin C, Weinstein RA. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Ann Intern Med* 1996; 125: 448–456
- Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Manahan J, Thompson RL, Rosenblatt JE, Cockerill FR. Comparison of the Roche LightCycler vanA/vanB Detection Assay and Culture for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci from Perianal Swabs. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2636–2643
- Soderblom T, Aspevall O, Erntell M, Hedin G, Heimer D, Hokeberg I, Kidd-Ljunggren K, Melhus A, Olsson-Liljequist B, Sjogren I, Smedjegård J, Struwe J, Sylvan S, Tegmark-Wisell K, Thore M. Alarming spread of vancomycin resistant enterococci in Sweden since 2007. *Euro Surveill* 2010; 15: 19620-19626
- Sörgel F, Landersdorfer C, Bulitta J. Zur Pharmakokinetik von Linezolid und Telithromycin: Zwei neue Antibiotika mit besonderen Eigenschaften. *Pharm Unserer Zeit* 2004; 33: 28–36
- Stahlmann R, Locke H. Glykopeptidantibiotika. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Urban & Fischer, 2009: 815-817
- Stamper PD, Cai M, Lema C, Eskey K, Carroll KC. Comparison of the BD GeneOhm VanR Assay to Culture for Identification of Vancomycin-Resistant Enterococci in Rectal and Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3360–3365
- Stosor V, Peterson LR, Postelnick M, Noskin GA. Enterococcus faecium bacteremia: does vancomycin resistance make a difference? *Arch Intern Med* 1998; 158: 522–527
- Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3251–3255
- Tacconelli E, Karchmer AW, Yokoe D, MC D'Agata E. Preventing the influx of vancomycin-resistant enterococci into health care institutions, by use of a simple validated prediction rule. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 964–970

- Theilacker C, Jonas D, Huebner J, Bertz H, Kern WV. Outcomes of Invasive Infection due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during a Recent Outbreak. *Infection* 2009; 37: 540–543
- Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid: Linezolid resistance through ribosome modification. *Mol Microbiol* 2007; 64: 1506–1514
- Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a Novel Typing Scheme To Study the Genetic Relatedness and Epidemiology of *Enterococcus faecium* Isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4503–4511
- Uttley AHC, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, Morrison D, Gilfillan AJ, Fitch LE, Heptonstall J. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect* 1989; 103:173–181
- Vonberg RP, Chaberny IF, Kola A, Mattner F, Borgmann S, Dettenkofer M, Jonas D, Fahr AM, Klare I, Werner G, Weist K, Wendt C, Gastmeier P. Prävention und Kontrolle der Ausbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken: Ergebnisse eines Workshops der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. *Anaesthesist* 2007; 56: 151–157
- Wade JJ, Desai N, Casewell MW. Hygienic hand disinfection for the removal of epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and gentamicin-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* 1991; 18: 211–218
- Wang L, He Y, Xia Y, Wang H, Liang S. Investigation of mechanism and molecular epidemiology of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* in China. *Infect Genet Evol* 2014; 26: 14–19
- Wardal E, Markowska K, Żabicka D, Wróblewska M, Giemza M, Mik E, Połowniak-Pracka H, Woźniak A, Hryniewicz W, Sadowy E. Molecular Analysis of VanA Outbreak of *Enterococcus faecium* in Two Warsaw Hospitals: The Importance of Mobile Genetic Elements. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 1–12
- Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, Young JW, Kiehn TE, Zuccotti G. Colonization, Bloodstream Infection, and Mortality Caused by Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 615–621
- Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Rüdén H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3734–3736
- Werner G. Current trends of emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci. In: Pana M, Hrsg. *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium*. Rijeka: InTech 2012a: 303-354
- Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken – Epidemiologie, Diagnostik, Typisierung, Trends. *Krankenhaushygiene Up2date* 2012b; 07: 291–304

- Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008a; 13: Pii19046
- Werner G, Klare I, Hübner J, Kern WV, Harmsen WS. Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemother J*. 2008b; 17: 183–193
- Werner G, Serr A, Schütt S, Schneider C, Klare I, Witte W, Wendt C. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 512–521
- Willems RJ, Top J, Van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bontou MJ. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 821–828
- Young HL, Ballard SA, Roffey P, Grayson ML. Direct detection of vanB2 using the Roche LightCycler vanA/B detection assay to indicate vancomycin-resistant enterococcal carriage - sensitive but not specific. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 809–810
- Zhu X, Zheng B, Wang S, Willems RJL, Xue F, Cao X, Li Y, Bo S, Liu J. Molecular characterisation of outbreak-related strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from an intensive care unit in Beijing, China. *J Hosp Infect* 2009; 72: 147–154
- Zischka M, Künne CT, Blom J, Wobser D, Sakiñç T, Schmidt-Hohagen K, Dabrowski PW, Nitsche A, Hübner J, Hain T, Chakraborty T, Linke B, Goesmann A, Voget S, Daniel R, Schomburg D, Hauck R, Hafez HM, Tielen P, Jahn D, Solheim M, Sadowy E, Larson J, Jensen LB, Ruiz-Garbajosa P, Quiñones Pérez D, Mikalsen T, Bender J, Steglich M, Nübel U, Witte W, Werner G. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics* 2015; 16: 1-20

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding für die Möglichkeit, mich im Rahmen meiner Dissertation mit einem so aktuellen und interessanten Thema befassen zu dürfen. Ihr Vertrauen, ihr Interesse, ihre wegweisenden Kommentare, ihre Geduld und ihre sehr gute Betreuung waren mir eine besondere Motivation, für die ich über alle Maßen dankbar bin.

Herrn Dr. med. Ernst Molitor, Herrn Prof. Dr. med. Steffen Engelhart und Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum danke ich für die spontane und unkomplizierte Bereitschaft, mich im Rahmen meiner Arbeit fachlich zu betreuen und für ihre wertvollen Hinweise und Hilfestellungen.

Des Weiteren möchte ich zudem allen Mitgliedern der AG Ding am IMMIP für die freundliche Aufnahme, gute Einarbeitung und ständige Hilfsbereitschaft in kritischen Fragen danken.

Zusätzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Diagnostik des IMMIP für ihre fachliche und materielle Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Guido Werner und Frau Dr. Birgit Strommenger vom RKI in Wernigerode für die schnelle Bereitstellung eines Kontrollisolats.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie für den Rückhalt, die Hilfe und das Verständnis während aller Phasen meiner Dissertation.