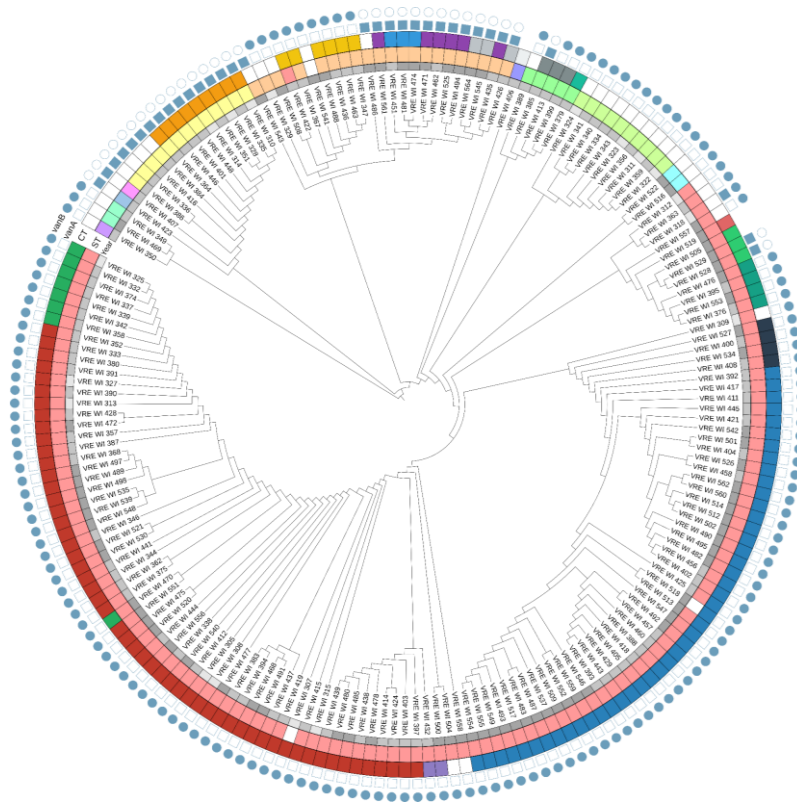


**Komparative Analyse Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium*-Isolate
aus Deutschland mit besonderem Fokus auf das Rhein-Main-Gebiet**



Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kurjak, Tom

aus Frankfurt am Main

Gießen (2024)

**Komparative Analyse Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium*-Isolate
aus Deutschland mit besonderem Fokus auf das Rhein-Main-Gebiet**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kurjak, Tom

aus Frankfurt am Main

Gießen (2024)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Medizinische Mikrobiologie

Gutachter: PD Dr. Can Imirzalioglu

Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation: 22.01.2025

Gewidmet den Menschen,
die durch multiresistente Krankenhauskeime ihr Leben verloren haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Enterokokken	1
1.2	Antibiotikaresistenzen und <i>van Gene</i>	1
1.3	Methoden zur genombasierten Surveillance	2
1.4	Aktuelle molekulare Epidemiologie von VREfm in Deutschland	5
1.5	Ziele der Arbeit.....	6
2	Material	7
2.1	Klinische Proben und Patientendaten.....	7
2.2	Geräte	8
2.3	Verbrauchsmaterialien und Kits	9
2.4	Chemikalien und Reagenzien.....	9
2.5	Herstellung der Nährmedien	10
2.6	Bioinformatische Software.....	10
3	Methoden	11
3.1	Kultivierung der Isolate	11
3.2	Isolierung und Quantifizierung der DNA	11
3.3	Ganzgenom (WGS-)Sequenzierung	12
3.4	Workflow zur Verarbeitung der Ganzgenomsequenzdaten und genombasierten Analyse	12
3.4.1	Merging, Qualitätskontrolle und Assemblierung	13
3.4.2	Molekulare allelbasierte Typisierung der Isolate	14

3.4.3	Arbeitsschritte zur Bestimmung der <i>van</i> Gene, Antibiotika-Resistenzgene und Virulenzfaktoren der VREfm-Isolate.....	16
3.4.4	Gewinnung von weiteren Ganzgenomsequenzdaten anderer relevanter Publikationen zur komparativen genombasierten Analyse	16
3.4.5	Vorgehensweise zur phylogenetischen allelbasierten Analyse	17
3.4.6	Statistische Auswertung	18
4	Ergebnisse	19
4.1	Ganzgenombasierte Ergebnisse dieser lokalen Analyse.....	19
4.1.1	Übersicht der Ergebnisse der Ganzgenomsequenzierung/-analyse	19
4.1.2	Sequenztypen (ST) der VREfm Isolate aus 2005 bis 2007 nach MLST.....	20
4.1.3	Complexotypen (CT) der VREfm Isolate aus 2005 bis 2007 nach cgMLST	22
4.1.4	Vancomycin-Resistenz-Gene.....	25
4.1.5	Antibiotika-Resistenzgene.....	28
4.1.6	Wichtige <i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren.....	30
4.1.7	Phylogenetische Analyse der 187 VREfm Isolate aus 2005 bis 2007	31
4.2	Ganzgenombasierte Ergebnisse relevanter Studien für die Analyse.....	44
4.2.1	Genotypisierung der 198 VREfm Isolate von Mellmann et al. (2016).....	44
4.2.2	Genotypisierung der 772 VREfm Isolate von Liese et al. (2019).....	48
4.2.3	Genotypisierung der 42 VREfm Isolate von Eichel et al. (2020)	51
4.2.4	Genotypisierung der 111 VREfm Isolate von Neumann et al. (2020).....	54
4.2.5	Genotypisierung der 97 VREfm Isolate von Eisenberger et al. (2020)	58
4.2.6	Genotypisierung der 94 VREfm Isolate von Falgenhauer et al. (2019)	61
4.2.7	Genotypisierung der 55 VREfm Isolate von Falgenhauer et al. (2021)	64
4.2.8	Genotypisierung der 636 VREfm Isolate von Xanthopoulou et al. (2020)	66

4.3	Komparative genombasierte Analyse der VREfm Isolate dieser Arbeit gegenüber genetischen Fingerabdrücken von VREfm Isolaten aus dem Rhein-Main Gebiet und anderen Studien aus Deutschland.....	70
4.3.1	Komparative Analyse der 187 VREfm Isolate dieser Arbeit gegenüber verfügbaren genetischen Fingerabdrücken von VREfm Isolaten aus dem Rhein-Main-Gebiet der Jahre 2016 bis 2018	71
4.3.2	Vergleich des Vorkommens der in dieser Arbeit aufgetretenen Sequenztypen (ST) mit anderen Studien aus Deutschland	74
4.3.3	Vergleich des Vorkommens der in dieser Arbeit aufgetretenen Complexotypen (CT) mit anderen Studien aus Deutschland	77
4.3.4	Phylogenetischer allelbasierter Vergleich aller genotypisierten VREfm Isolate, die in dieser Arbeit als auch in Studien aus Deutschland auftraten	79
4.3.5	Vergleich der <i>van</i> Gene dieser Arbeit mit Studien aus Deutschland	89
5	Diskussion	92
5.1	Aufgetretene und erwartete VREfm Sequenztypen	92
5.2	Einordnung des dominierenden Auftretens des ST192 dieser Arbeit in die Populationsstruktur von VREfm in Deutschland	92
5.3	Vergleich der <i>van</i> Gene des ST192 und Einordnung der Dominanz von <i>vanB</i> in dieser Arbeit	93
5.4	Einordnung des Auftretens des ST202 dieser Arbeit in die Populationsstruktur von VREfm in Deutschland	96
5.5	Dynamische Populationsstruktur von VREfm in Deutschland	96
5.6	Limitationen	97
5.7	Ausblick.....	98
6	Zusammenfassung.....	100
7	Abstract.....	102
8	Abkürzungsverzeichnis.....	104

9	Abbildungsverzeichnis.....	105
10	Tabellenverzeichnis.....	113
11	Literaturverzeichnis.....	116
12	Anhang	122
13	Publikationsverzeichnis	135
14	Ehrenwörtliche Erklärung	137
15	Danksagung	138
16	Lebenslauf.....	140

1 Einleitung

1.1 Enterokokken

Bakterien der Gattung Enterokokken wurden erstmals 1899 durch Thiercelin beschrieben¹ und als Teil des tierischen wie menschlichen gastrointestinalen Mikrobioms lange Zeit für medizinisch unbedeutend gehalten.² Enterokokken sind Gram-positive, Katalase und Oxidase negative, fakultativ anaerobe und fakultativ pathogene, kugelförmige und nicht sporenbildende Kettenkokken der Familie Enterococcaceae.¹

Von mittlerweile über 35 bekannten Spezies³ sind die für den Menschen medizinisch bedeutsamen hierbei *E. faecium* sowie *E. faecalis*. Zu Infektionen durch Enterokokken gehören klinisch relevante Endokarditiden, Sepsen, Harnwegsinfekte und fremdkörperassoziierten Infektionen.⁴ Dies betrifft insbesondere Patientinnen und Patienten, die Risikogruppen angehören, wie Immunsupprimierte, Multimorbide, Transplantierte und Intensivpatienten.

1.2 Antibiotikaresistenzen und *van Gene*

Enterokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegen Antibiotika der Wirkstoffgruppen Cephalosporine, Aminoglykoside, Lincosamide, Polymyxine und einige semisynthetische Penicilline wie Oxacillin und das Monobactam Aztreonam.

Hinzu können erworbene Resistenzen kommen. Beschrieben wurden diesbezüglich bisher Resistenzen gegen Ampicillin, Fluorchinolone, Carbapeneme und Glykopeptide.³

Die zunehmende Resistenz gegen wirksame Antibiotika der Glykopeptid Gruppe, wie Vancomycin und Teicoplanin, war namensgebend für Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Die zunehmende Resistenz gegen Antibiotika dieser Gruppe stellt jedoch eine besondere therapeutische Herausforderung dar, da diese die weiteren therapeutischen Optionen stark limitieren⁵. Letzte Alternativen stellen dann Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin dar.⁵

1990 wurde von ersten Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) Fällen in Deutschland berichtet.⁶ Seitdem ist eine Zunahme des Anteils von VRE an nosokomialen Infektionen und damit einhergehenden schweren Enterokokken assoziierten Infektionen zu verzeichnen,⁷ sodass VRE nach §23 Abs. 4. des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) zu den zu beobachtenden Erregern von nosokomialen Infektionen gehören. Die Zunahme der nosokomialen VRE Infektionen ist dabei vornehmlich auf resistente *E. faecium* (VREfm) zurückzuführen und wird durch das klinisch gehäufte Auftreten einiger Strangvarianten mit Antibiotikaresistenzen begleitet.⁶

Hinsichtlich der Resistenzsituation gibt es jedoch Unterschiede zwischen den Spezies *E. faecium* und *E. faecalis*. Die Zahl der natürlichen Antibiotika-Resistenzen ist bei *E. faecium* höher als bei *E. faecalis*.⁵

Erschwerend kommt ein größerer Anteil erworbener Glykopeptid Resistenzen bei *E. faecium* (>26,1 %) ⁸ hinzu, sodass die Surveillance der für VRE klinisch bedeutsamsten übertragbaren Resistenzgene bzw. *van* Gene wie *vanA*, Vancomycin Resistenz mit Teicoplanin Kreuzresistenz und *vanB*, reine Vancomycin-Resistenz, eine besondere Bedeutung zu Teil wird.^{3,9}

Im Hinblick auf die *van* Gene als unterscheidendes genotypisches Merkmal der Vancomycin-resistenten Enterokokken sind die 8 Gene *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN* bekannt, wovon lediglich *vanA* und *vanB* eine klinische Rolle spielen, wie bereits angeführt.¹⁰ Glycopeptid-Antibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin entfalten ihren hemmenden Wirkmechanismus an einer Stufe der bakteriellen Zellwand-Peptidoglykan-Synthese.¹¹ Hierbei kommt es zur Hemmung der Transglykosylierungsreaktion, die zur Quervernetzung von Mureinvorstufen notwendig ist, dadurch wird die Zellwand instabil und es kommt zur Lyse des Bakterium.¹² Die angeführten *van* Resistenzgene kodieren nun verschiedene Ligasen, welche die Peptidoglykan-Zielstruktur so verändern, dass Vancomycin bzw. Teicoplanin an diese nicht mehr binden können. Der Unterschied liegt hier auf molekularer Ebene: D-Lactat-D-Alanin wird modifiziert zu D-Alanin-D-Alanin. ¹⁰

Seit Ende der 2000er Jahre veränderte sich die Verteilung der Glykopeptid Resistenztypen bzw. *van* Gen Verhältnisse (*vanA:vanB*) jedoch von 4:1 hin zu 1:4 deutlich, deren Ursache weiterhin unklar und am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken des RKI Gegenstand aktueller molekulargenetischer Untersuchungen ist.^{6,13}

1.3 Methoden zur genombasierten Surveillance

Um die Zunahme, epidemiologische Veränderungen, Transmissionswege, und Ausbruchsdynamiken von VREfm überwachen, aufdecken, verstehen und vergleichen zu können, bedarf es hochauflösender genombasierter molekulargenetischer Analysetools.¹⁴

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) stellt als DNA-Fragment-Analyse-Methode seit den 1990er Jahren den Goldstandard zur molekularen Typisierung von bakteriellen Erregern dar. Im Rahmen dieser Methoden wird hochmolekulare DNA nach Verdau mit Restriktionsenzymen unter periodischen elektrischen Wechselfeldern in einem Agarosegel aufgetrennt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgt die Färbung zur Visualisierung der DNA-Banden und Analyse der DNA-Bandenmuster zur Detektion von möglichen genetischen Gemeinsamkeiten oder Unterschieden.¹⁵

Sie ist zwar eine kostengünstige, etablierte und innerhalb eines Labors gut reproduzierbare Methode, zeigt jedoch Schwächen hinsichtlich des Durchführungsaufwands und der Vergleichbarkeit zwischen den Institutionen.¹⁶

Die 1998 erstmals vorgeschlagene Multilocus sequence typing Methode (MLST) verbesserte die Vergleichbarkeit der molekularen Typisierung von Bakterien zwischen den Laboren und Institutionen.¹⁷ Grundlage der klassischen MLST-Schemata sind 7 Haushaltsgene, bei der für jeden Gen-Lokus eine Allelnummer indexiert wird. Die Zahlenkombination liefert dann ein Allel-Profil und folglich einen standardisierten Sequenztyp.¹⁷

Aufgrund der geringen Auflösung und Diskriminierung von MLST-Typisierungen, was insbesondere bei lokalen Ausbruchsgeschehen ein Problem darstellt, werden jedoch durch Fortschritte in der Ganzgenomsequenzierung immer häufiger Kerngenom-MLST-Analysen (cgMLST) durchgeführt und daraus Complextypen (CT) generiert. Im Falle von *Enterococcus faecium* werden so z.B. über 1423 Gene des Kerngenoms für die molekulargenetische Typisierung und den genom- bzw. allelbasierten Vergleich berücksichtigt.¹³

Die angeführten erweiterten Möglichkeiten der letzten Jahre in der Ganzgenomsequenzierung (engl. Whole-Genome Sequencing, [WGS]) fußen maßgeblich auf Fortschritte in der Next-Generation Sequencing (NGS) Technologie, die es ermöglicht das gesamte Genom eines Organismus schnell und kosteneffizient zu sequenzieren.¹⁸ Es existieren eine Vielzahl von kommerziellen NGS-Plattformen, die unterschiedliche Methoden zur Sequenzierung der DNA nutzen.¹⁹

All diesen Methoden gemein ist jedoch, dass sie im Gegensatz zu Vorläufermethoden nach Sanger²⁰, Sequenzierungs-Methode der ersten Generation aus den 1970er Jahren zur Detektion der Abfolge von einzelnen kurzen DNA-Molekülen, die Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten parallel durchführen können.^{19,21}

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete NGS-Plattform der Firma Illumina Inc. basiert auf dem proprietären Sequencing by Synthesis (SBS) Verfahren. Abbildung 1 illustriert den Ablauf der Sequenzierung der gesamten Basenabfolge eines Genoms auf Basis der NGS-Plattform von Illumina Inc.

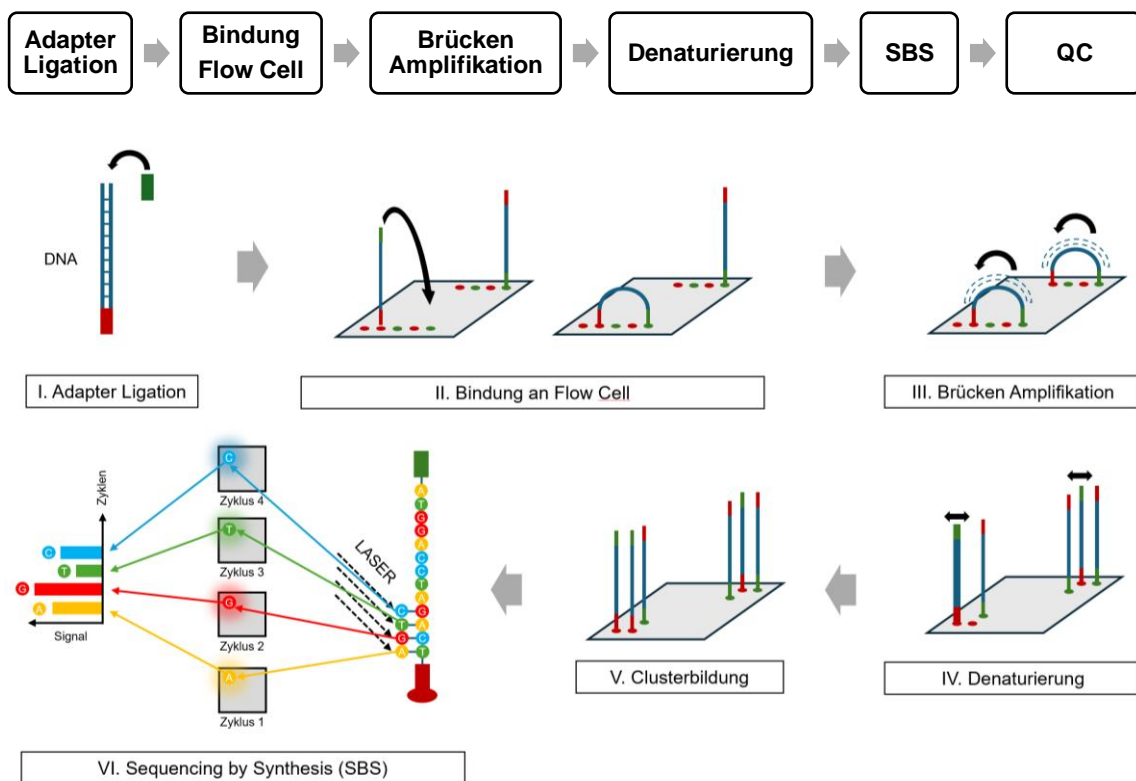


Abbildung 1: Schema zur DNA-Sequenzierung auf Basis der NGS-Plattform der Firma Illumina Inc.

In einem ersten Schritt (Abbildung 1, I) werden an beide Enden der DNA-Fragmente Primer-komplementäre Adapter ligiert. Daraufhin werden die ligierten Fragmente an einer Flow Cell gebunden (Abbildung 1, II), auf deren Oberfläche sich zu den Adaptern der DNA-Fragmente komplementäre Primer befinden. Das andere Ende der ligierten DNA-Fragmente bindet ebenso an einen freien komplementären Primer auf der Flow Cell, sodass durch die beidseitige Bindung der Adapter an den beiden Enden der DNA-Fragmente sich brückenartige Gebilde formen (Abbildung 1, II).

Es erfolgt anschließend (Abbildung 1, III) auf der Flow Cell bei Durchlaufen von Erhitzungs- und Abkühlungsphasen unter Inkubation die Amplifikation bzw. Brücken-PCR eines komplementären Stranges durch Polymerasen und zugehörige Reagenzien. Die so synthetisierten DNA-Doppelstrang Moleküle werden durch Denaturierung (Abbildung 1, IV) in komplementäre Vorwärts- und Rückwärts-Stränge getrennt.

Durch die repetitive Amplifikation auf der Flow Cell entstehen diskrete Bereiche mit identischer Basenabfolge, sogenannte sequenzgleiche Cluster (Abbildung 1, V).

Im Anschluss (Abbildung 1, VI) werden jedem Cluster Polymerase und markierte fluoreszierende Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zugeführt.

Die dNTPs sind chemisch derart inaktiviert, dass immer nur eine Base pro Zyklus hinzugefügt wird. Das hat zur Folge, dass für jeden Baseneinbau ein sich anschließender lasergestützter Bildgebungsschritt zur Detektion spezifischer Emissionsmuster für die Identifizierung des eingebauten Nukleotids in jedem Cluster intermittierend folgen kann. Ist der Laser gestützte Leseprozess abgeschlossen, das fluoreszierende Nukleotid des Clusters identifiziert und die Daten gespeichert, wird die fluoreszierende Gruppe wieder entfernt und der nächste folgende dNTP-Zyklus gestartet, bis das Fragment komplett synthetisiert ist. Die Abläufe in Schritt VI der Abbildung 1 werden unter dem Begriff Sequencing by Synthesis (SBS) subsummiert und zeichnen die NGS-Plattform der Firma Illumina Inc. aus, da sukzessive die Sequenzierung während der Synthese abläuft. Am Ende der Sequenzierung wird dann die Sequenz jedes Clusters berechnet und einer Qualitätskontrolle unterzogen, um qualitativ minderwertige Lesevorgänge zu eliminieren (Abbildung 1, VI).

1.4 Aktuelle molekulare Epidemiologie von VREfm in Deutschland

Seit 2014 ist in der Mitte Deutschlands, darunter die Bundesländer NRW, Hessen, Thüringen und Sachsen, ein im bundesweiten Vergleich überdurchschnittlicher kontinuierlicher Anstieg an VREfm zu verzeichnen. Der regionale Anstieg dieser VREfm-Prävalenz führte daher zur Einführung des Begriffs „VRE-Gürtel“ bzw. „VRE-belt“.⁷

Die Geschwindigkeit der Zunahme der VREfm-Prävalenz im VRE-Gürtel lässt daher vermuten, dass ein besonders erfolgreicher Klon sich durchgesetzt haben muss.

Seit 2018 wurden deshalb Studien begonnen, um diesen VREfm-Klon mittels WGS zu identifizieren, genetische Fingerabdrücke zu erstellen und diese zu vergleichen. Ergebnis der Untersuchung von Isolaten aus 17 Kliniken im Rhein-Main-Gebiet aus den Jahren 2017 und 2018 durch Falgenhauer et al.²² war, dass ein ST117/CT71 Klon mit *vanB* Resistenzgen im Rhein-Main-Gebiet prädominiert.

Aber auch bundesweit blieb 2019 und 2020 der ST117 Typ sowie die Isolate des ST117/CT71-*vanB* Typs, wie in den Jahren zuvor, mit einem Anteil von 66 % (ST117) und 44 % (ST117/CT71-*vanB*) der häufigste Sequenztyp unter den Einsendungen an das NRZ für Staphylokokken und Enterokokken.¹³

Im Jahr 2019 veröffentlichten Liese et al. die Ergebnisse einer groß angelegten Ganzgenom-Sequenzierungs-Analyse zur Typisierung eines VREfm Ausbruchs an einem Universitätsklinikum in Süd-West-Deutschland. Die Isolate der Untersuchung reichten vom Jahr 2016 bis in das Jahr 2010 zurück. Der Anstieg von VREfm konnte hauptsächlich auf den Sequenztyp ST117 zurückgeführt werden.²³

Aus Berlin berichtete 2020 Weber et al. im Rahmen einer retrospektiven Analyse von Isolaten aus den Jahren 2008 bis 2018 über die Verdreifachung des Anteils an ST117 bei einem Anteil von 40 % des Typs ST117/CT71, wobei die Gesamt-Prävalenz von VREfm an der Charité lediglich um 0,2 % anstieg, was die Dominanz des ST117/CT71 nicht erklärte.²⁴

Die Ergebnisse einer der umfassendsten bundesweiten Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie von VREfm wurden 2020 durch Xanthopoulou et al. publiziert. Dabei wurden an 6 Universitätskliniken VREfm-Isolate der Jahre 2014 bis 2018 analysiert. ST117 war hierbei mit einem Anteil von 56,7 % an 5 von 6 Kliniken der dominante VREfm-Typ mit steigender Prävalenz über den Beobachtungszeitraum. Weitere cgMLST Untersuchungen zur Analyse einer standortübergreifenden Verbreitung ergaben die Existenz eines Clusters eng verwandter Isolate, wovon ST117/CT71 den größten Anteil mit 88,5 % hatte.²⁵

2020 meldeten Neumann et al. die Prädominanz des ST117 VREfm-Stamms in Proben der Jahre 2014 und 2015 aus Süddeutschland, statt des CT71 typisierte man den Stamm jedoch auf CT469.²⁶ Im selben Jahr berichteten Eichel et al. ebenso von der Dominanz des ST117/CT469 in WGS-Analysen von Isolaten des Jahres 2016 aus Heidelberg.²⁷

Weiterhin berichtete 2020 Eisenberger et al. aus Bayern vom Auftreten dreier endemischer klonaler VREfm Linien im Rahmen einer Untersuchung von Isolaten der Jahre 2018 und 2019 aus 8 bayerischen Kliniken. Dies waren der lokal prädominante ST80/CT1065, erneut der bundesweit in Erscheinung getretene ST117/CT71 und der ST78/CT894.²⁸

2021 berichtete Falgenhauer et al. dann erneut aus der Rhein-Main-Metropolregion von einer Verschiebung der Populationsstruktur von VREfm mit dem prädominanten Klon ST117/CT71, dazu wurden Isolate der Jahre 2016 bis 2018 aus einer neurologischen Klinik mit Patienten Einzug aus dem gesamten Rhein-Main-Gebiet analysiert.²⁹

1.5 Ziele der Arbeit

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit existierten nach Recherche noch keine umfassenderen Untersuchungen und veröffentlichten WGS-Daten zur Populationsstruktur von VREfm-Typen im Rhein-Main-Gebiet von vor 2016. Es stellte sich daher die Frage, welche VREfm-Typen vor 2016 im Rhein-Main-Gebiet aufgetreten sind und ob der im Rhein-Main-Gebiet dominierende VREfm-Typ ST117/CT71-*vanB* vor 2016 bereits vorzufinden war. Ziel dieser Arbeit war daher zunächst die Generierung genetischer Fingerabdrücke von VREfm-Isolaten aus den Jahren vor 2016.

Dazu wurden Isolate der Jahre 2005 bis 2007 aus einer der größten hessischen Kliniken der Maximalversorgung im Rhein-Main-Gebiet sequenziert. Anhand der dadurch gewonnenen Ganzgenomsequenzdaten sollte eine molekulare Typisierung der 2005 bis 2007 akquirierten Isolate erfolgen.

Auf Basis der molekularen Typisierung sollte zunächst eine allelbasierte komparative Analyse, mit den von Falgenhauer et al. aus 2019²² und 2021²⁹ publizierten genetischen Fingerabdrücken im Rhein-Main-Gebiet durchgeführt werden. Im Anschluss wurde diese komparative Analyse auf alle aus Deutschland verfügbaren relevanten WGS-Fingerabdrücke von VREfm ausgeweitet, um die Verbreitung und Entwicklung der Verwandtschaftsbeziehungen von VREfm molekulargenetisch und epidemiologisch besser zu verstehen.

2 Material

2.1 Klinische Proben und Patientendaten

237 Isolate von VRE-Verdachtsfällen wurden in den Jahren 2005 bis 2007 an einem der 5 größten hessischen Kliniken der Maximalversorgung im Rhein-Main-Gebiet, im Rahmen von angeforderten Routineuntersuchungen bzw. Routine-Screening-Maßnahmen gewonnen, auf 1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Vancomycin angelegt und in Store-Cryoröhrchen bei -80°C im Ultratiefkühlgerät am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eingelagert. Es handelte sich hierbei um Erreger, die nach §23 des Infektionsschutzgesetzes spezifische Resistenzen aufwiesen und für wissenschaftliche Analysen asserviert wurden.

Für jede laufende Isolate-Nummer lagen die anonymisiert und routinemäßig im Rahmen der Krankenversorgung erhobenen Patienten-Basisdaten vor: Datum der Isolation des VREfm Isolats, Labornummer, Stationsnummer. Zusätzliche Daten wurden nicht erhoben.

Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen konnte nach ausführlicher Diskussion und Begutachtung keine wissenschaftlichen oder formalen Kritikpunkte bzw. Einwände gegen die Durchführung dieser Arbeit feststellen (Aktenzeichen AZ 24/22).

2.2 Geräte

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Labor-/Datenverarbeitungs-Geräte sowie Hersteller.

Gerät	Hersteller
Dell Optiplex 5000 Workstation	Dell Technologies, Inc.
Dell Precision Tower 3620	Dell Technologies, Inc.
Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.
Heratherm™ Mikrobiologischer Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc.
IKA Schüttler KS 4000 i control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Kombi-Großraum-Mikrowellengerät R-939(IN)-A	Sharp Electronics GmbH
Liebherr Unterbau-Gefrierschrank/Kühlschrank	Liebherr AG
Magnetrührer AREX Digital Heating Magnetic Stirrer	VELP Scientifica Srl
Mechanische Pipetten research plus	Eppendorf SE
MSC-Advantage™ Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Fisher Scientific Inc.
NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Inc.
OLS Aqua Pro Shaking Water Bath	Grant Instruments
TSX 60086V Ultratiefkühlgerät	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortex-Genie™ 2 vortex mixer	Scientific Industries, Inc.
Waage Traveler TA3001	OHAUS Europe GmbH

2.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial sowie Hersteller.

Material	Hersteller
Erlenmeyerkolben DURAN® 500 ml, 1000 ml	DWK Life Sciences GmbH
Impfeschlinge 10µl blau steril	SARSTEDT AG & Co. KG
Labor-Gewindeflasche DURAN® 100 ml, 500 ml	DWK Life Sciences GmbH
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina, Inc.
NextSeq 500/550 High-Output v2.5 Kit (300 cycles)	Illumina, Inc.
Petrischalen 92x16mm mit Nocken	SARSTEDT AG & Co. KG
PureLink® Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Reagiergefäß, PP, 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Röhrchen, PP, 12 ml, runder Boden, steril	Greiner Bio-One GmbH
Röhrchen, PP, 50 ml, konischer Boden, steril	Greiner Bio-One GmbH
ROTI®Store-Cryoröhrchen	Carl Roth GmbH + Co. KG

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien sowie Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aqua ad injectabilia 50 ml, Injektionsflasche	B. Braun SE
Bacto™ Brain Heart Infusion	Becton, Dickinson and Company
Ethanol absolute 100 %	VWR International S.A.S.
Lysozym	Carl Roth GmbH
Vancomycin-HCl-Lösung (100 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in DMSO)	Merck KGaA

2.5 Herstellung der Nährmedien

Zur Herstellung der Brain-Heart-Infusion (BHI) Nährmedien für die Kultivierung der Isolate wurde dehydriertes Bacto™ Brain Heart Infusion von Becton, Dickinson and Company verwendet.

Zunächst wurden nach Herstellervorgabe ($37 \frac{\text{g}}{\text{l}}$) 12,95 g des BHI-Pulvers in 350 ml vollentsalzten Wasser (VE-Wasser) unter Verwendung eines Magnetrührers in einer 500 mL DURAN® Gewindeflasche suspendiert und bei 100 °C für 1 min gekocht.

Für die Nährmedien zum Gießen von Agar-Agar-Platten wurden nach Herstellervorgabe ($15 \frac{\text{g}}{\text{l}}$) 5,25 g Agar-Agar (Kobe I) in die 350 ml BHI-Ansätze hinzugegeben. Dieser Schritt entfiel bei den Flüssignährmedien.

Die Nährmedien wurden daraufhin im Kühlraum über Nacht eingelagert und am nächsten Morgen der Zentral-Autoklavierung zugeführt.

Vor dem Gießen der Platten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II wurden die autoklavierten flüssigen BHI-Agar-Agar Nährmedien in einem Mikrowellengerät für 5 min hitzebehandelt, bis sie vollständig verflüssigt waren. Danach wurden sie in einem auf 55 °C temperierten Wasserbad auf Arbeitstemperatur abgekühlt.

Nach dem Gießen der Platten wurden diese in Originalverpackung und unter Angabe des Herstellungsdatums versiegelt und im Kühlraum bis zum Ausstreichen der Isolate gelagert.

2.6 Bioinformatische Software

Zur mikrobiellen genombasierten Datenverarbeitung, Analyse und Typisierung der VREfm Genom-Sequenzdaten kamen die ASA^{3P} Pipeline³⁰ und die Ridom SeqSphere+ Software in der Version 8.4.1 (2022) der Ridom GmbH³¹ zum Einsatz.

Weiterhin wurde zur graphischen Aufarbeitung der genetischen Beziehungen das Vektorgrafikprogramm Inkscape³² verwendet, ITOL³³ zum Annotieren der genom-basierten Stammbäume und Microsoft Excel 2019 zur Datenanalyse und für die statistische Auswertung die Software BiAS. in der Version 11 (2022)³⁴.

3 Methoden

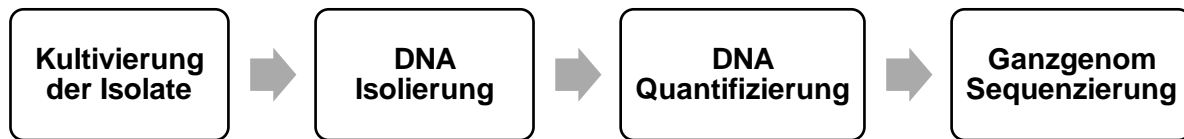


Abbildung 2: Workflow zur Generierung genomischer Fingerabdrücke

3.1 Kultivierung der Isolate

In Abbildung 2 ist der gesamte Workflow dieser Arbeit zur Generierung genomischer Fingerabdrücke zu sehen. Insgesamt wurden 237 Isolate aus Store-Cryoröhrchen zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar-Agar-Platten mit $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Vancomycin ausgestrichen und darauffolgend bei 37°C für 24h inkubiert. Von 237 Isolaten konnten 233 erfolgreich kultiviert werden.

Die 4 Isolate ohne Wachstum unter diesen Bedingungen wurden in BHI-Medium ohne Vancomycin über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert und anschließend in BHI-Medium mit $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Vancomycin überimpft und für 24 h inkubiert, wonach alle 4 Isolate Wachstum zeigten. Anschließend wurden zur DNA-Isolierung alle 237 Übernachtkulturen in 3 ml BHI-Medium mit $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Vancomycin beimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C für 24 h inkubiert.

3.2 Isolierung und Quantifizierung der DNA

Die Arbeitsschritte zur Isolierung und Extraktion der genomischen DNA aus den 237 Übernachtkulturen erfolgte mit Hilfe des PureLink® Genomic DNA Mini Kits, nach Protokoll bzw. Vorgabe des Herstellers Fisher Scientific für Gram-positive Bakterien in der Reihenfolge Vorbereitung, DNA-Bindung, Waschen und Elution, jedoch mit Wasser, siehe Abbildung 3 .

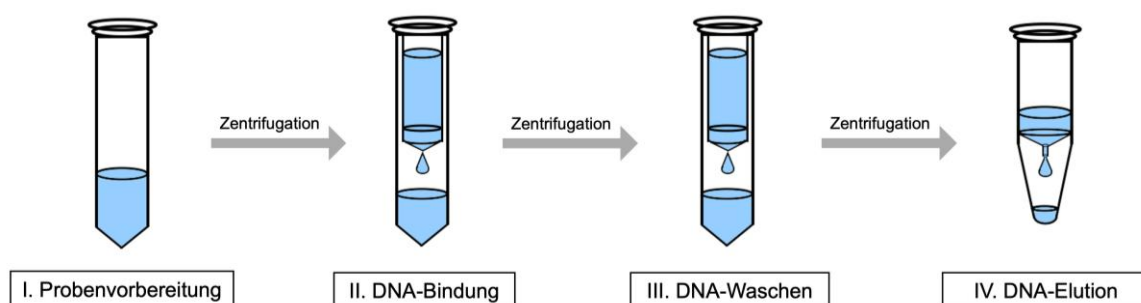


Abbildung 3: Übersicht der Arbeitsschritte zur DNA-Aufreinigung nach der PureLink® Spin Column Mini Kit basierten Methode (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc., 2007).

Zur Vorbereitung der Lysate wurden je 1,4 ml der Übernachtskultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 3 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Zell-Pellets wurden daraufhin in 180 µL frisch präpariertem Lysozym-Digestionpuffer (25 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 1 % Triton X-100) mit einer Lysozym-Konzentration von 20 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ resuspendiert, gevortext und bei 37 °C für 30 min im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe und Vortex von 20 µL Proteinase K und 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Puffer, wurden die Lysate bei 55 °C im Heizblock für 30 min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 200 µL 100 % Ethanol hinzugefügt und gevortext.

Im Anschluss erfolgte die Bindung der DNA. Dazu wurden je 640 µL der Lösung in PureLink® Spin Columns pipettiert und bei 10.000 x g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Zum Waschen der DNA wurden die Säulen mit je 500 µL PureLink® Wash Buffer 1 versetzt mit 100 % Ethanol auf die PureLink® Spin Columns pipettiert und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Daraufhin wurden je 500 µL PureLink® Wash Buffer 2 auf die PureLink® Spin Columns pipettiert und bei 20.000 x g für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Für die Elution der DNA wurden die PureLink® Spin Columns in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße platziert und je 100 µL steriles Braun Aqua auf den Filter der Säulen pipettiert. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur, wurde bei 20.000 x g zentrifugiert und die PureLink® Spin Columns verworfen.

Zuletzt wurde die isolierte DNA mittels NanoDrop™ Fluoreszenzspektrometer quantifiziert und der Absorptions-Quotient 260 nm / 280 nm bestimmt, um etwaige Proteinverunreinigungen auszuschließen. Die aufgereinigte genomische DNA der 237 VRE-Isolate wurden dann bei -20 °C im Gefrierschrank bis zur Sequenzierung eingefroren.

3.3 Ganzgenom (WGS-)Sequenzierung

Die Library Präparation für die Ganzgenom Sequenzierung wurde mit Hilfe des Nextera XT Library Preparation Kit durchgeführt und die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina NextSeq 500 System mit Highoutput Kit (300 cycles).

3.4 Workflow zur Verarbeitung der Ganzgenomsequenzdaten und genombasierten Analyse

In Abbildung 4 ist der gesamte Workflow zur genombasierten Datenanalyse dargestellt. Die Ganzgenomsequenzierung lieferte genetische Rohdateien im komprimierten FASTQ-Format, die zunächst zusammengeführt werden mussten (Merging).

Im Anschluss erfolgten Qualitätskontrolle und die Assemblierung der genetischen Information zu sogenannten Contigs, letztlich dann die Typisierung mittels MLST und cgMLST sowie die Bestimmung von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzgenen.



Abbildung 4: Workflow zur genom-basierten Analyse und Verarbeitung der Ganzgenomsequenzdaten

3.4.1 Merging, Qualitätskontrolle und Assemblierung

Die Ganzgenomsequenzierung auf einem Illumina NextSeq 500 System liefert 8 FASTQ-Dateien pro Isolat, die die komprimierte rohe genetische Information enthielten.

In der Anzahl 8 FASTQ-Dateien pro Isolat, da für jedes Isolat und jede Lane, darunter wird ein spezifischer Sequenzierungsbereich auf der Durchflusszelle (flow-cell) verstanden, ein R1-Read und ein R2-Read in FASTQ-Dateien erstellt wurde. Die FASTQ-Dateien setzen sich folglich zusammen aus der Leserichtung entlang des Vorwärts-DNA-Strangs (R1) in 5´-3´Richtung und der umgekehrten Leserichtung entlang des Reverse-DNA-Strangs (R2), ebenso in 5´-3´Richtung, siehe hierzu Abbildung 5. Dies wird als paired-end reads bezeichnet.

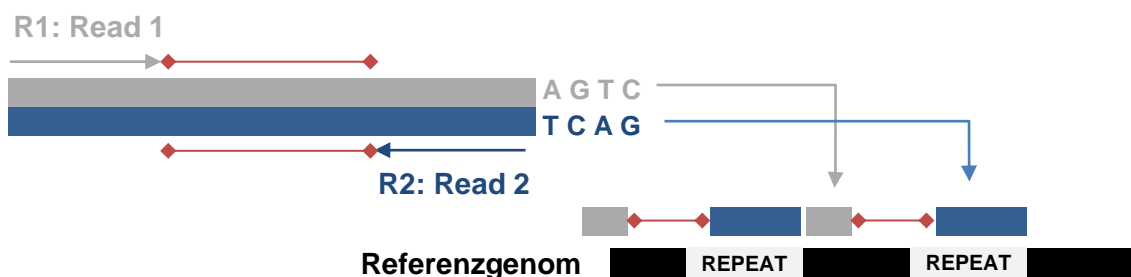


Abbildung 5: Paired-End Sequenzierung (linke Hälfte) in Vorwärts- und Rückwärts- Leserichtung entlang des DNA-Strangs und Alignment (rechte Hälfte) zur Zusammenführung sich wiederholender Regionen bei bekanntem R1-R2-Abstand.

Da die hier verwendete Durchflusszelle der Illumina NextSeq mit 4 Lanes arbeitete, lieferte diese 4 FASTQ Dateien pro Leserichtung, bei 2 wie zuvor beschriebenen Leserichtung (R1, R2) also 4 x 2 FASTQ Dateien. Die insgesamt 8 FASTQ Dateien pro Isolat mussten daher zunächst aus den 4 FASTQ Dateien pro Leserichtung zusammengeführt werden (Merging), schematisch dargestellt in Abbildung 6.

Das Merging erfolgte mit Hilfe des Skripts `merge_lanes.sh` nach Telatin.³⁵

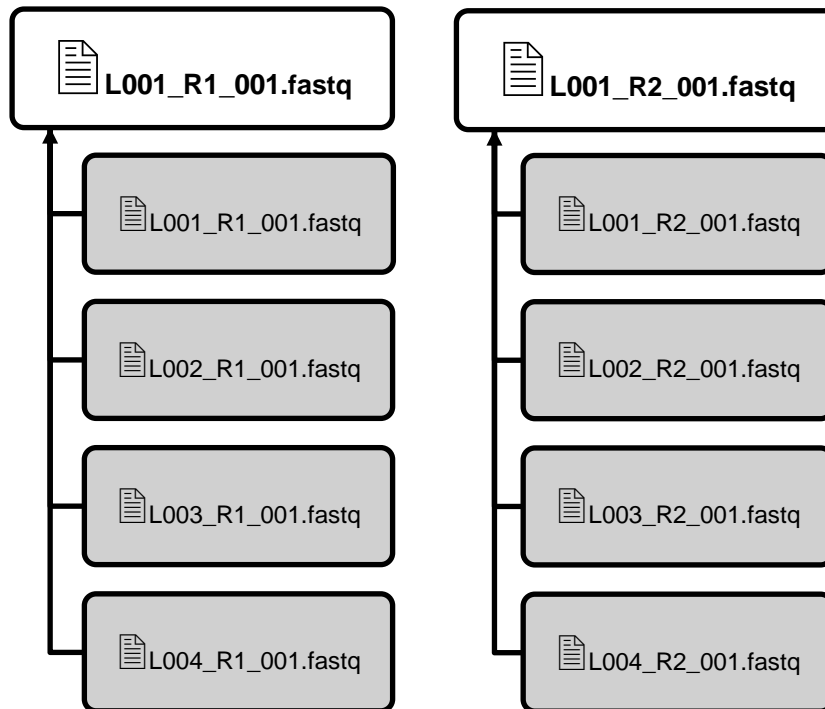


Abbildung 6: Merging-Schema zur Zusammenführung der 8 FASTQ-Dateien pro Isolat mit 4 FASTQ-Dateien pro Leserichtung (R1 und R2) zur weiteren Datenanalyse.

Bei 237 Isolaten ergab dies in dieser Arbeit eine Gesamtzahl von 1896 FASTQ-Dateien (8 x 237) mit einer Gesamtdatenmenge von 82 Gb. Im Anschluss wurden die 237x2 (R1, R2) FASTQ Dateien der ASA^{3P}³⁰ Pipeline zugeführt und zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Die Pipeline lieferte Qualitätsberichte über alle sequenzierten Reads, darunter werden kurze DNA-Abschnitte verstanden, die durch Sequenzierung gewonnen wurden. Die ungeeignete Reads wurden für die nachfolgenden Analyseschritte herausgefiltert.

Die Qualität der sequenzierten Reads wurde über das in ASA^{3P} inkludierte Qualitätskontroll-Tool FastQC³⁶ gemessen. Eine Überprüfung auf mögliche Kontaminationen erfolgt dann durch das ebenso inkludierte Tool FastQ Screen.³⁷

Reads, die auf einer Illumina-Plattform sequenziert wurden, wie im Rahmen dieser Arbeit, wurden dann mit Trimmomatic³⁸ beschnitten. Reads, die die Qualitätskontrolle bestanden, wurden durch den ebenso in der Pipeline inkludierten Assembler SPAdes³⁹ assembliert.

3.4.2 Molekulare allelbasierte Typisierung der Isolate

Zur molekularen allelbasierten Typisierung mittels MLST wurde das für *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) erstmals 2002 von Homan et al. vorgeschlagene Typisierungsschema⁴⁰ verwendet und mittels ASA^{3P}³⁰ der Sequenztyp (ST) bestimmt.

Es inkludiert die 7 Haushaltsgene bzw. Loci *gdh*, *purK*, *pstS*, *aptA*, *gyd*, *adk*, *ddl*. Da die MLST Typisierung anhand von 7 Haushaltsgenen nur über ein eingeschränktes Auflösungsvermögen zur lokalen allelbasierten Analyse verfügt, wurde das von de Been 2015 publizierte Kerngenom MLST-Schema (cgMLST) ergänzend herangezogen, welches 1423 Loci inkludiert und ein ähnlich hohes Auflösungsvermögen verfügt wie ein SNP gestützter phylogenetischer Vergleich.⁴¹

Die Generierung der Complextypen (CT) nach cgMLST Schema für *Enterococcus faecium* erfolgte mittels der Ridom Seqsphere+ Software.³¹

Abbildung 7 visualisiert die grundlegende Vorgehensweise der Ridom Seqsphere+³¹ Software im Sinne einer bioinformatischen Verarbeitungs-Abgleich-Pipeline zur zielgenauen Suche (Target Scan) nach Zielgenen (Targets), welche in den jeweiligen Spezies spezifischen cgMLST Schemata definiert sind. Letztlich erfolgte die Genotypisierung bzw. Generierung eines für jeden Isolats charakteristischen Allel-Profiles (Target-Allel-Calling) nach Abgleich mit dem cgMLST-Nomenklatur-Server (<https://cgmlst.org/>).

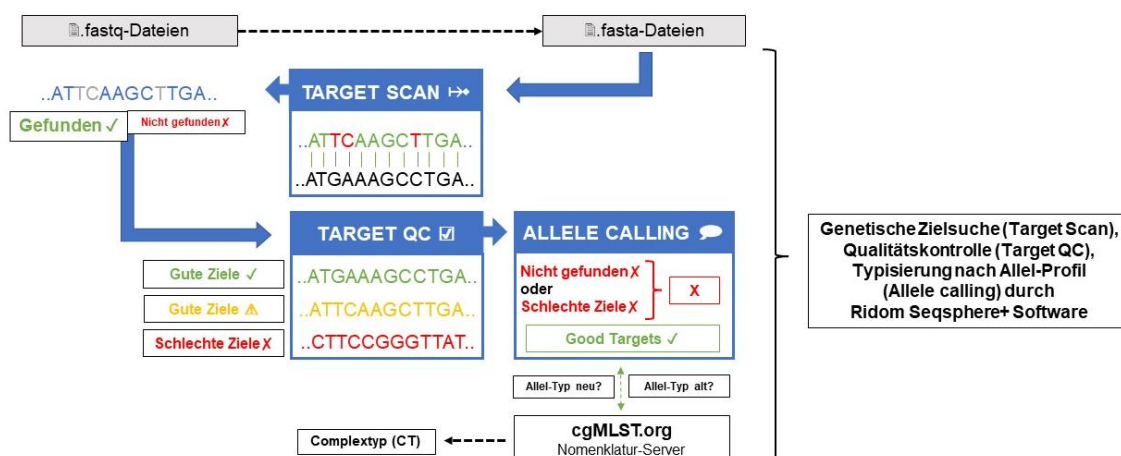


Abbildung 7: Allgemeine Vorgehensweise bzw. Pipeline der Seqsphere+ Software (Ridom GmbH, 2022, erstellt und bearbeitet nach URL: https://www.ridom.de/u/General_Procedure.html)³¹

Dieser Server kontrolliert die allelbasierte Nomenklatur der Kerngenom Schemata und überprüft, ob für ein übermitteltes Allel Profil bereits ein Complextyp (CT) und damit eine Untergruppe genetisch eng verwandter Isolate besteht oder ein neuer zur eindeutigen Identifizierung zugeordnet werden muss.

Die vorangestellte Assemblierung der genetischen Rohinformation erfolgte wie in Abbildung 7 dargestellt für die Isolate dieser Arbeit durch den in der ASA^{3P}³⁰ Pipeline inkludierten Assembler SPAdes³⁹, um die Rechenlast auf mehrere Computer-Systeme aufzuteilen und um einen schnellen Analyse-Vor-Report hinsichtlich der Typisierung und Taxonomie der Isolate durch ASA^{3P}³⁰ zu erhalten.

Die graphische Aufarbeitung in Form einer phylogenetischen Darstellung aller typisierten Isolate erfolgte mittels eines Neighbor-Joining-Trees nach Saitou⁴².

Diese Neighbor-Joining-Trees wurden als .nwk-Dateien (Newick-Tree-Format) aus Ridom Seqsphere+³¹ exportiert und konnten dann in ITOL³³ Version 6.6 graphisch verarbeitet. Mittels ITOL³³ wurden die Merkmale *van* Gen und Probenjahr der Isolate der Darstellung zum Stammbaum hinzugefügt und mit Inkscape³² graphisch aufbereitet.

3.4.3 Arbeitsschritte zur Bestimmung der *van* Gene, Antibiotika-Resistenzgene und Virulenzfaktoren der VREfm-Isolate

Die Bestimmung der *van* Gene und die Untersuchung auf weitere Antibiotika-Resistenzgene und Mutationen für *E. faecium* der Isolate dieser Arbeit, wurde mittels Ridom Seqsphere+³¹ und des darin enthaltenen Taskmoduls NCBI AMRFinderPlus⁴³ durchgeführt. Die Analyse der 4 wichtigsten *E. faecium* bezogenen Virulenzfaktoren *acm*, *scm*, *ecbA*, *sgrA* erfolgte mittels der in Ridom Seqsphere+³¹ integrierten Virulenz-Datenbank VFDB⁴⁴. Hierzu wurde der VFDB-Task in Ridom Seqsphere+³¹ für *E. faecium* verwendet. Die Ergebnisse beider Analysen wurden mittels Microsoft Excel 2019 in einer Heatmap und Balken- sowie Liniendiagrammen graphisch aufbereitet.

3.4.4 Gewinnung von weiteren Ganzgenomsequenzdaten anderer relevanter Publikationen zur komparativen genombasierten Analyse

Zur Durchführung einer komparativen genombasierten Analyse mussten Ganzgenom Sequenzdaten der für diese Analyse relevanten Publikationen, siehe Tabelle 4, bezogen werden. Dazu wurden die Accession Numbers in den über PubMed⁴⁵ recherchierten Publikationen übernommen und mittels des Tools SRA-Explorer⁴⁶ heruntergeladen, dies waren insgesamt über 600 GB.

Im Anschluss wurden die genetischen Rohdaten der ASA³P-Pipeline³⁰ zugeführt und ebenso mittels SPAdes³⁹ assembliert sowie nach MLST⁴⁰ und cgMLST⁴¹ in Ridom Seqsphere+³¹ typisiert und nach den Arbeitsschritten aus Kapitel 3.4.3 der lokalen Analyse gleichermaßen prozessiert.

Lediglich die vorhandenen WGS-Daten zu 13 VREfm Isolaten der im Einleitungsteil beschriebenen Untersuchung von Weber et al.²⁴ enthielten nur den ST117/CT71 und wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Alle anderen prozessierten WGS-Daten der relevanten 8 Publikationen aus Tabelle 4 wurden der komparativen genombasierten Analyse zugeführt.

Isolate mit einem cgMLST-Good-Targets-Score <90 % wurden von der Analyse ausgeschlossen, da die Ganzgenomsequenzdaten den Qualitätskriterien zur Typisierung nicht entsprachen. Daher unterscheidet sich die angegebene Anzahl der Isolate aus Tabelle 4 dieses Kapitel von jener Anzahl aus Kapitel 4.3 Tabelle 13.

Tabelle 4: Übersicht der Ganzgenom-Sequenzdaten für VREfm in Deutschland aus relevanten Veröffentlichungen, die zur komparativen genom-basierten Analyse herangezogen wurden.

Autoren (publ. Jahr)	Ort	Jahr (Proben)	Anzahl (Isolate)	Accession (Number)	Referenz
Mellmann et al. (2016)	Münster	2013-2015	198	PRJEB8084	47
Liese et al. (2019)	Baden- Württemberg	2010-2016	773	PRJEB30772	23
Falgenhauer et al. (2019)	Hessen Rhein-Main	2017-2018	95	PRJEB29744	22
Xanthopoulou et al. (2020)	Deutschland	2014-2018	247	PRJEB28593	25
Neumann et al. (2020)	Süd- Deutschland	2014-2015	111	PRJNA524489	26
Eisenberger et al. (2020)	Bayern	2018-2019	99	PRJEB34664	28
Eichel et al. (2020)	Baden- Württemberg	2016	73	PRJNA604888	27
Falgenhauer et al. (2021)	Hessen Rhein-Main	2016-2018	55	PRJNA631114	29

3.4.5 Vorgehensweise zur phylogenetischen allelbasierten Analyse

Nach der Typisierung mittels MLST⁴⁰ und cgMLST⁴¹ wurden zunächst für alle Isolate dieser Arbeit und im Anschluss für andere Studien in Ridom Seqsphere+³¹ Vergleichstabellen (comparison tables) erstellt, welche die Spalten Isolate ID zur Identifikation, Study zur Zuordnung der Studie, Sequenztyp (ST), Complexotyp (CT) und 7 Loci für MLST⁴⁰ bzw. 1423 Loci für cgMLST⁴¹ der *E. faecium* Typisierungs Schemata inkludierten. Die Kolorierung der einzelnen Isolate erfolgte für die lokale Rhein-Main bezogene phylogenetische Analyse der Isolate dieser Arbeit und der von Falgenhauer et al.^{22,29} nach Sequenztyp (ST) und für die deutschlandweite komparative Analyse nach Studie. Auf Basis dieser einzelnen Vergleichstabellen wurde dann für den deutschlandweiten Vergleich in Microsoft Excel eine Gesamt-Vergleichstabelle erstellt, um zu ermitteln, welche Sequenz- bzw. Complexotypen dieser Arbeit auch in anderen Studien vorzufinden waren.

Aus dieser komparativen Analyse heraus, hinsichtlich des Auftretens von Sequenz- bzw. Complexotypen in dieser und anderen Studien, wurden dann in Microsoft Excel Heatmaps, visuelle Darstellungen bei denen Datenwerte in einer Matrix koloriert werden, generiert und auf Basis dieser Heatmaps konnten dann in der Ridom Seqsphere+ Software³¹ minimum spanning trees (MST) zur komparativen phylogenetischen Analyse gezeichnet werden.

Zur Berechnung der Cluster in minimum spanning trees (MST) wurde zunächst ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen in Anlehnung an die Arbeiten von Falgenhauer et al.^{22,29} und eine minimale Anzahl an Isolaten zur Bildung eines Clusters von 2 definiert. Dieser Schwellenwert wurde dann auf die Standardeinstellung von 20 cgMLST Allelen erhöht und die Veränderungen verglichen.

Die so erzeugten minimum spanning trees (MST) dienten zur Visualisierung von Allel basierten Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Isolaten nach vorheriger genombasierter Typisierung, die mittels des Vektorgrafikprogramms Inkscape³² graphisch aufbereitet wurden.

3.4.6 Statistische Auswertung

Das Vorkommen, Auftreten und die Entwicklung der kategorialen bzw. nominalen Merkmale Sequenz-/Complexotyp (ST/CT), *van* Gene, Antibiotika-Resistenzgene und Virulenzfaktoren der Isolate als Merkmalsträger wurden mittels absoluter und relativer Häufigkeiten deskriptiv statistisch in dieser Arbeit beschrieben.

Darüber hinaus wurde der Einfluss des zusätzlichen Merkmals Probenjahr der Isolate auf das Auftreten der jeweiligen häufigsten und am stärksten ansteigenden Sequenz-/Complexotypen, im Sinne abhängiger dichotomer Merkmale, mittels einer logistischen Regression abgeschätzt. Die Berechnung erfolgte mittels der Software BiAS³⁴ bei einem konfigurierten Signifikanzniveau von $\leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Ganzgenombasierte Ergebnisse dieser lokalen Analyse

4.1.1 Übersicht der Ergebnisse der Ganzgenomsequenzierung/-analyse

Alle 237 Isolate aus den Jahren 2005 bis 2007 konnten sequenziert werden. Von diesen 237 Ganzgenomsequenzdaten konnten 234 erfolgreich assembliert werden. Die Assemblierung der Isolate VRE WI 326, 348, 523 schlug fehl. Von diesen 234 Isolaten wurden alle der allelbasierten Typisierung zugeführt.

Dies erfolgte zum einen mittels ASA^{3P}³⁰ für das MLST⁴⁰ zur Bestimmung der Sequenztypen (ST) und zum anderen mittels Ridom Seqsphere+³¹ für das cgMLST⁴¹ zur Bestimmung der Complextypen (CT). Von 234 Isolaten erreichten 187 Isolate einen cgMLST-Good-Targets-Score von $\geq 90\%$ und konnten weiter analysiert werden, 47 Isolate erreichten keinen Score von $\geq 90\%$ und wurden von der weiteren Analyse daher ausgeschlossen, siehe Abbildung 8.

Unter den 47 Isolaten mit einem Targets-Score von $< 90\%$ waren 14 Isolate mit einer Genomgröße von < 50 kbp, die übrigen 33 Isolate bzw. deren FASTQ Dateien wurden mittels des Type (Strain) Genome Server (TYGS)⁴⁸ zur Ermittlung der Spezies untersucht. Die Isolate konnten den Spezies *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus thailandicus*, *Enterococcus malodoratus* und *Enterococcus faecalis* zugeordnet werden.

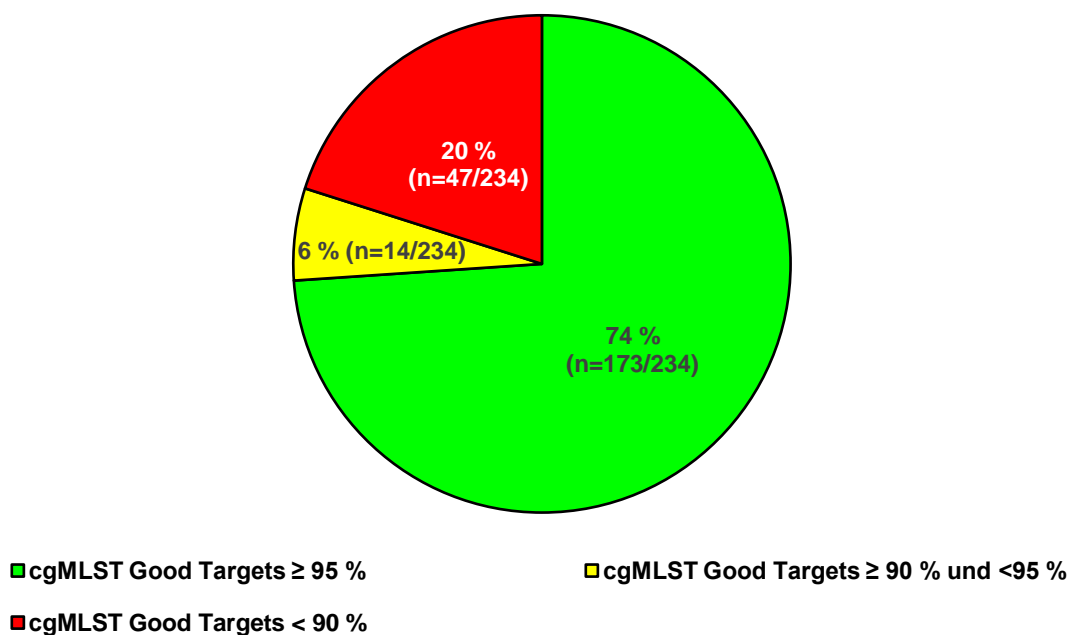


Abbildung 8: Anteile der cgMLST Good Targets ($\geq 95\%$ grün, $\geq 90\%$ und $< 95\%$ gelb, $< 90\%$ rot)

4.1.2 Sequenztypen (ST) der VREfm Isolate aus 2005 bis 2007 nach MLST

Insgesamt konnten für 184 von 187 Isolaten bereits bekannte Sequenztypen (ST) mittels MLST-Schemas für *E. faecium* nach Homann 2002⁴⁰ bestimmt werden, siehe Abbildung 9 und Abbildung 10.

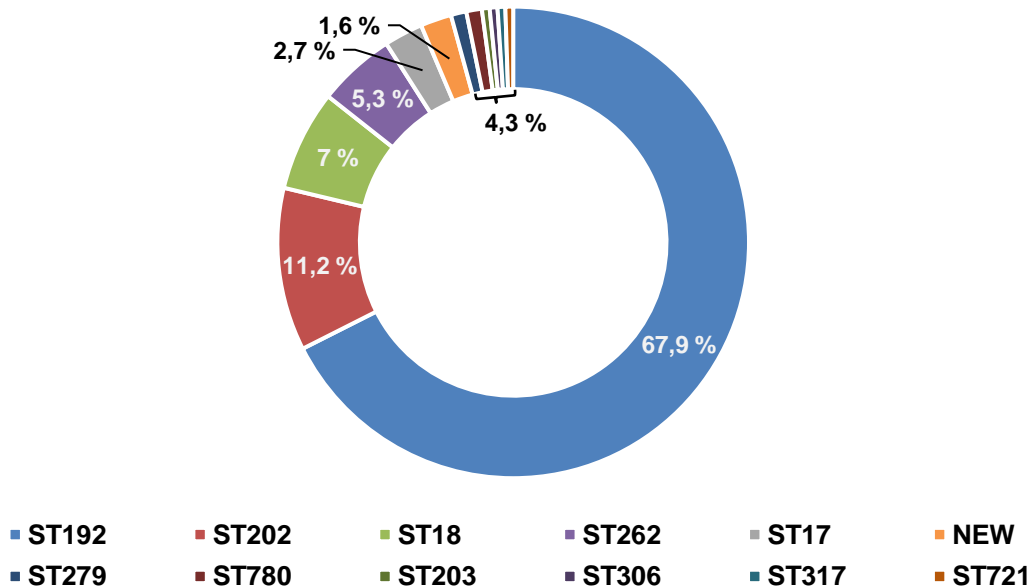


Abbildung 9: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=187) in Prozent von 2005 bis 2007.

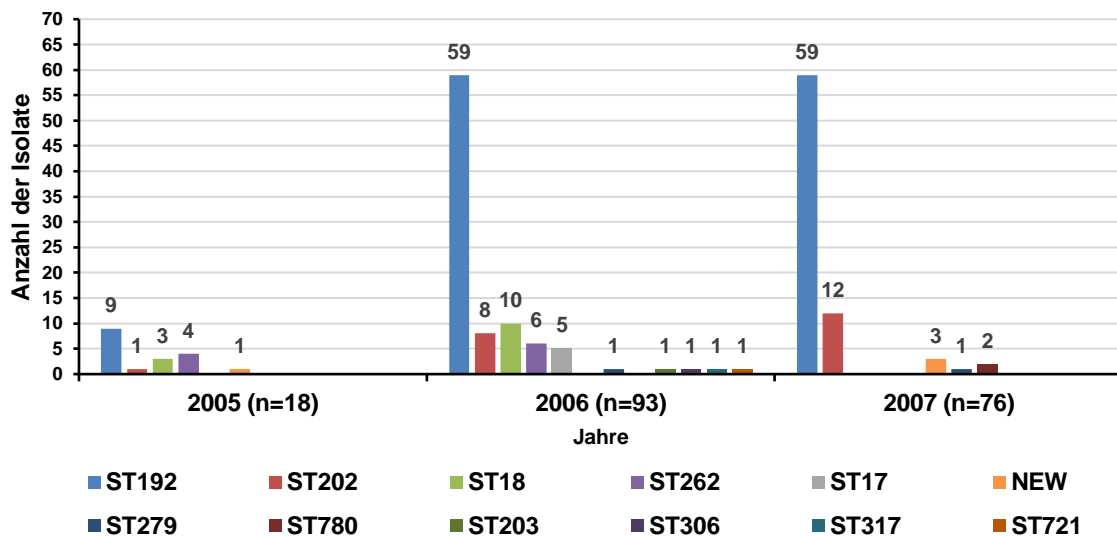


Abbildung 10: Übersicht der absoluten Anzahl der ST (Sequenztypen, n=187) in den Jahren 2005 bis 2007.

Über alle Jahre hinweg dominierte der ST192 (67,9 %), mit großem Abstand folgend und ebenso in allen Jahren auftretend der ST202 (11,2 %), in den Jahren 2005 und 2006 der ST18 (7 %) sowie der ST262 (5,3 %) und im Jahr 2006 der ST17 (2,7 %).

In geringerer Anzahl und vereinzelt traten weiterhin die Typen ST279, ST780, ST203, ST306, ST317 und ST721 auf.

Für 3 Isolate konnte kein bereits bekannter MLST-Typ identifiziert werden, diese wurden in der Darstellung unter NEW kategorisiert und der cgMLST Typisierung zur weiteren Charakterisierung unterzogen, siehe Kapitel 4.1.3.

Die Entwicklung des prozentualen Anteils der Sequenztypen in den Jahren 2005 bis 2007 ist in Abbildung 11 dargestellt und zeigte den größten Anstieg für den ST192.

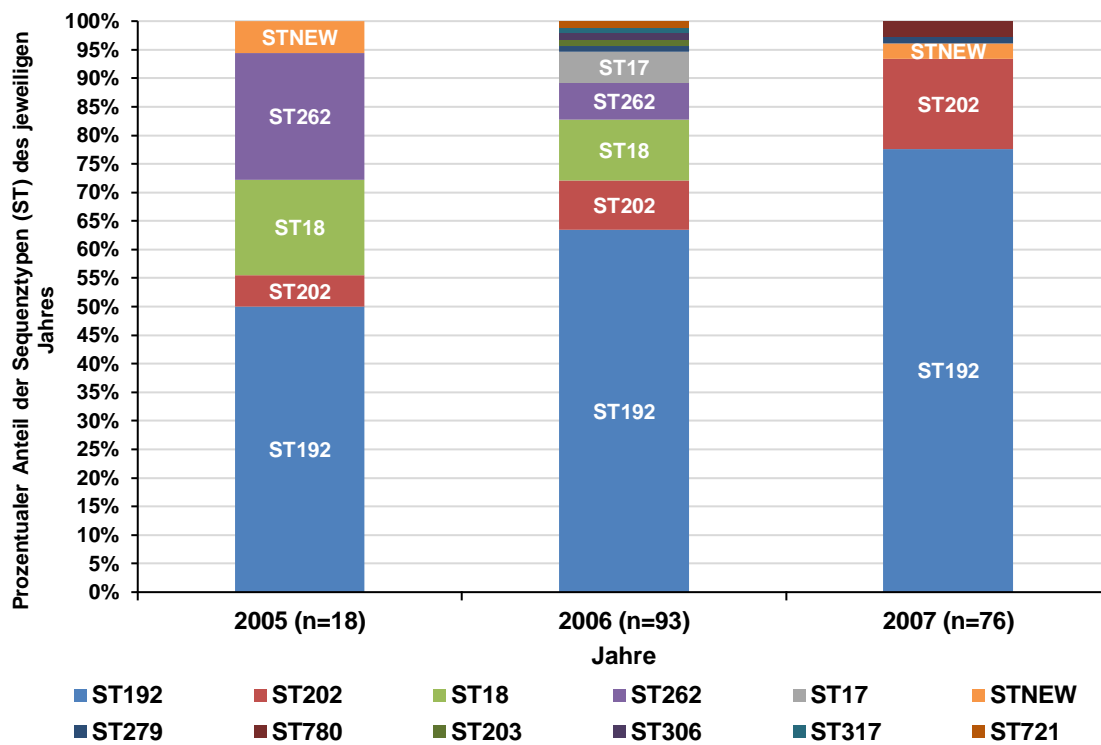


Abbildung 11: Entwicklung des Anteils der Sequenztypen (ST) in Prozent in den Jahren 2005, 2006, 2007.

Im Jahr 2005 stieg der Anteil von 50 % über 63,4 % im Jahr 2006 auf 77,6 % im Jahr 2007 ($p=0,011$).

Direkt nach dem ST192 verzeichnete der ST202 den zweitgrößten Anstieg von 5,6 % im Jahr 2005 über 8,6 % im Jahr 2006 und bis auf 15,8 % im Jahr 2007.

Dem ST192 folgte im Jahr 2005 der ST262 mit 22,2 %, der 2006 auf einen Anteil von 6,5 % fiel und 2007 verschwand.

An dritter Stelle im Jahr 2005 folgte der ST18 mit 16,7 %, dessen Anteil sich im Jahr 2006 auf 10,8 % verringerte und 2007 ebenso verschwand.

4.1.3 Complextypen (CT) der VREfm Isolate aus 2005 bis 2007 nach cgMLST

Zur weiteren Sub-Differenzierung der Sequenztypen in Complextypen (CT), wurde mittels cgMLST Schema für *E. faecium* nach de Been,⁴¹ unter Berücksichtigung von 1423 Genen, für 154 von 187 Isolaten ein bereits bekannter Complextyp (CT) bestimmt, siehe Abbildung 12.

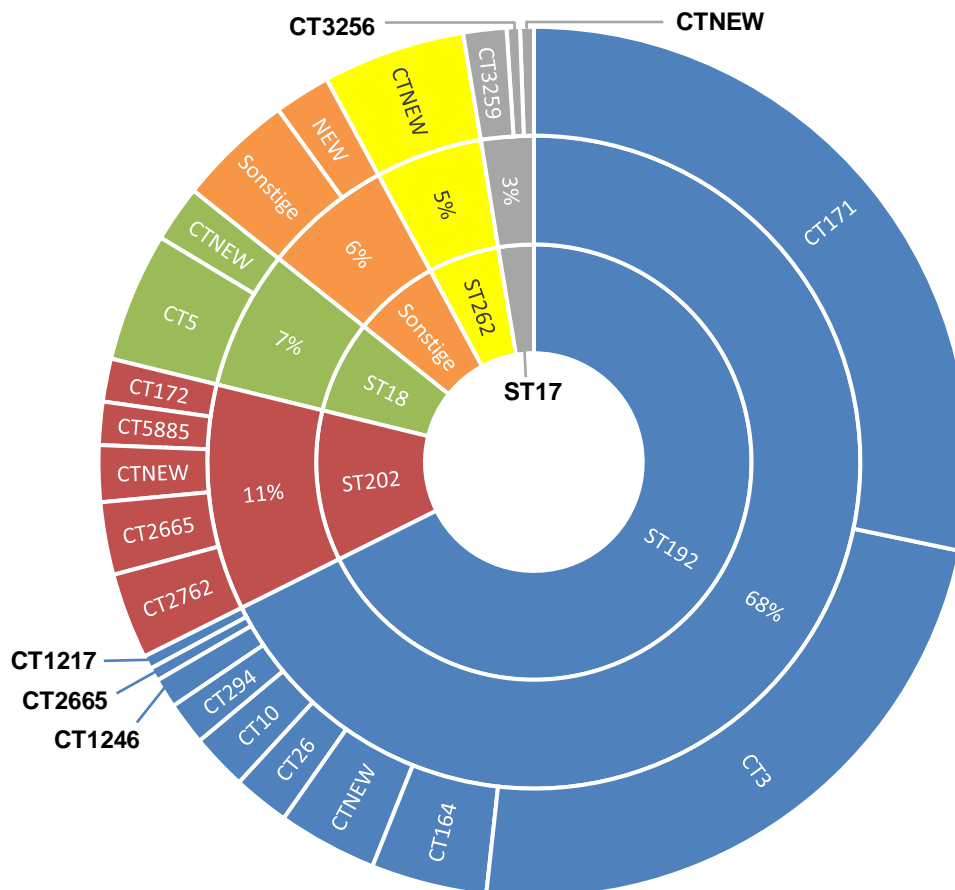


Abbildung 12: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) und zugehörigen Complextypen (CT) der Isolate (n=187) in Prozent von 2005 bis 2007.

Über alle Jahre dominierte der ST192/CT171 (28,3 %) wie in Abbildung 13 zu sehen.

Diesem folgten die Complextypen ST192/CT3 (23,5 %) und mit größerem Abstand und unter <5 %: ST18/CT5 (4,8 %), ST192/CT164 (4,3 %), ST202/CT2762 (3,2 %), ST202/CT2665 (2,7 %), ST192/CT10 und ST192/CT26 (je 2,1 %), ST17/CT3259, ST202/CT172, ST202/CT5885 und ST192/CT294 (je 1,6 %) sowie ST192/CT1246 (1,1 %).

Vereinzelt (jeweils 0,5 %) konnten Isolate als STNEW/CT171, ST17/CT3256, ST192/CT2665, ST203/CT1194, ST192/CT1217, STNEW/CT2665, STNEW/CT3 typisiert werden.

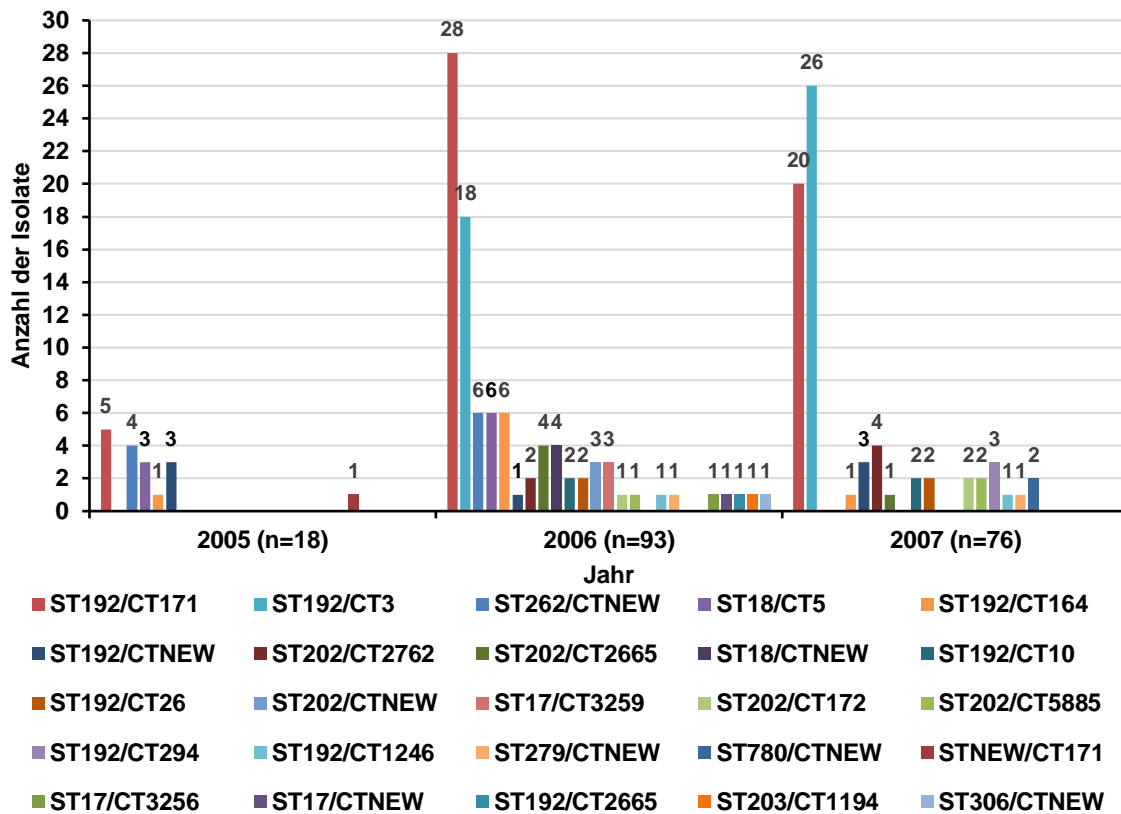


Abbildung 13: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=187) in den Jahren 2005 bis 2007. Legende sortiert nach Häufigkeit.

Für die 3 Isolate ohne identifizierbaren ST, konnten jedoch mittels cgMLST Typisierung CTs bestimmt werden. Darunter (jeweils 0,5 %) die Typen STNEW/CT171, STNEW/CT2665 sowie STNEW/CT3.

Für 33 Isolate konnte kein bereits bekannter cgMLST-Typ identifiziert werden, welche in der Darstellung unter CTNEW kategorisiert wurden.

Dies waren in absteigender Reihenfolge die Complexypen ST262/CTNEW (5,3 %), ST192/CTNEW (3,7 %), ST18/CTNEW (2,1 %), ST202/CTNEW (2,1 %), ST279/CTNEW (1,1 %), ST780/CTNEW (1,1 %) und (jeweils 0,5 %) ST17/CTNEW, ST306/CTNEW, ST317/CTNEW, ST721/CTNEW.

Die Entwicklung des prozentualen Anteils der ST/CT-Kombinationen in den Jahren 2005 bis 2007 ist in Abbildung 14 dargestellt und zeigte für den ST192/CT3 den größten Anstieg. Der Anteil stieg von 0 % im Jahr 2005 auf 19,4 % im Jahr 2006 und auf 34,2 % im Jahr 2007 ($p=0,001$).

Der ST192/CT171 stieg zunächst von 27,8 % im Jahr 2005 auf 30,1 % im Jahr 2006, um dann auf 26,3 % im Jahr 2007 zu fallen.

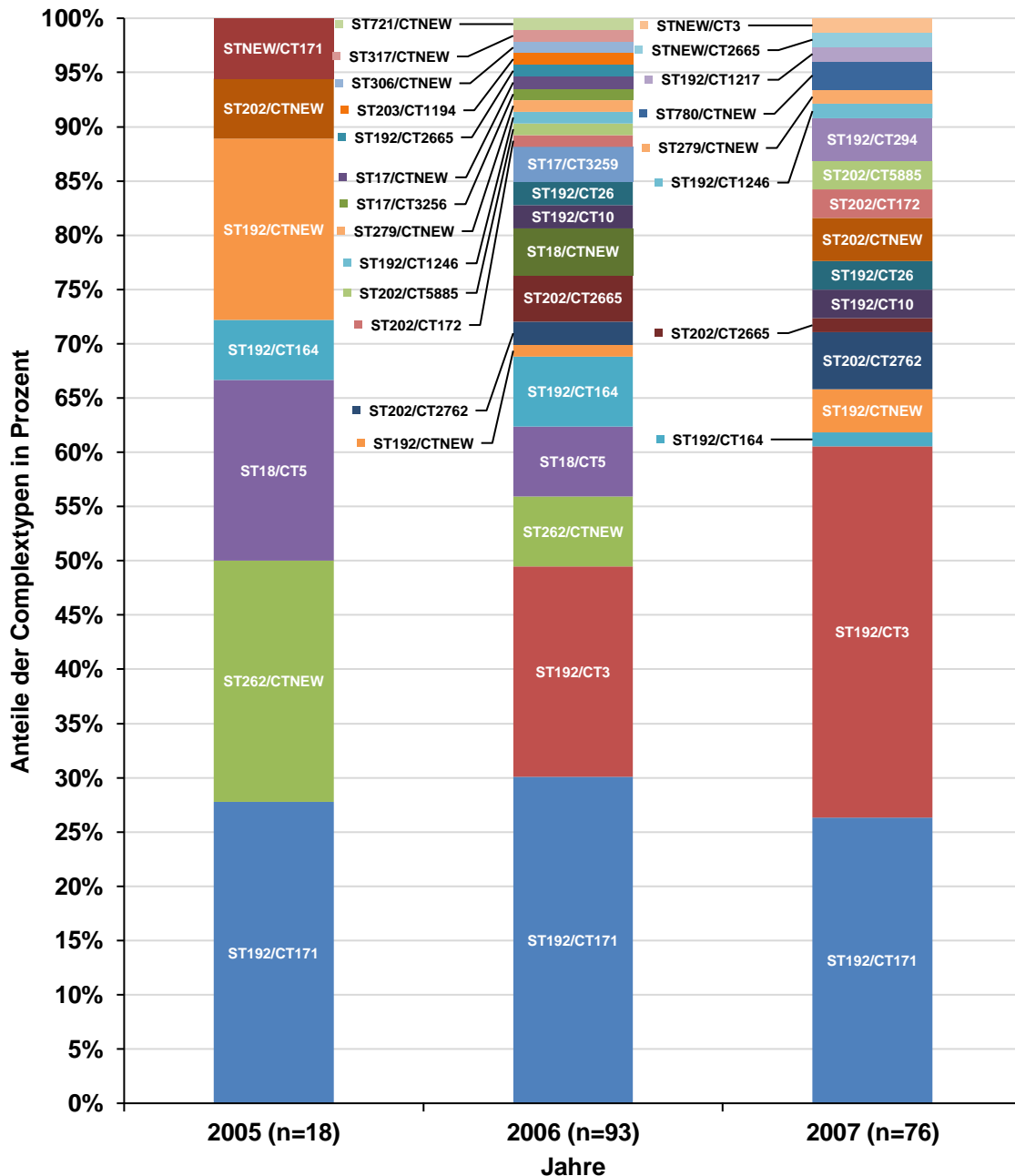


Abbildung 14: Übersicht der Sequenz-/Complexypen (ST/CT) der Isolate (n=187) in den Jahren 2005, 2006, 2007 bestimmt mittels cgMLST-Schemas für *E. faecium* nach 1423 Kerngenen, siehe de Been 2015.⁴¹

Andere dem ST192 zuzuordnende Complexotypen (CT) wie der ST192/CT10 traten erst in den Jahren 2006 mit 2,2 % und 2007 mit 2,6 % auf und stiegen dabei leicht im Anteil. Weitere Complexotypen (CT) wie der ST192/CT164 sanken von 5,6 % Anteil im Jahr 2005 auf 1,3 % im Jahr 2007. Andere Sequenztypen mit geringerer Dynamik wie der ST18/CT5 fielen von 2005 mit 16,7 % auf 6,5 % in 2006 und verschwanden im Jahr 2007. Der Anteil des im Jahr 2005 nicht aufgetretenen ST202/CT2762 stieg von 2,2 % in 2006 auf 5,3 % in 2007, wohingegen der Anteil des ST202/CT2665 von 4,3 % in 2006 auf 1,3 % in 2007 fiel.

4.1.4 Vancomycin-Resistenz-Gene

Die *van* Gene konnten in 184 von 187 Isolaten bestimmt werden, siehe Abbildung 15. Für 3 Isolate schlug die Bestimmung fehl, diese zeigten jedoch im Labor Wachstum auf Vancomycin Nährmedien.

Das Verhältnis der *vanA* zu *vanB* Gene blieb mit 1:5 über die Jahre 2005 bis 2007 annähernd konstant. 2005 lag der *vanA* Anteil bei 17,4 % (n=3/18), der *vanB* Anteil bei 77,8 %. Zusätzlich trat einmalig eine *vanA+vanB* Kombination mit 5,6 % auf.

2006 lag der *vanA* Anteil bei 18,7 %, der *vanB* Anteil bei 81,3 %. Im Jahr 2007 lag der *vanA* Anteil bei 16 %, der *vanB* Anteil bei 84 %.

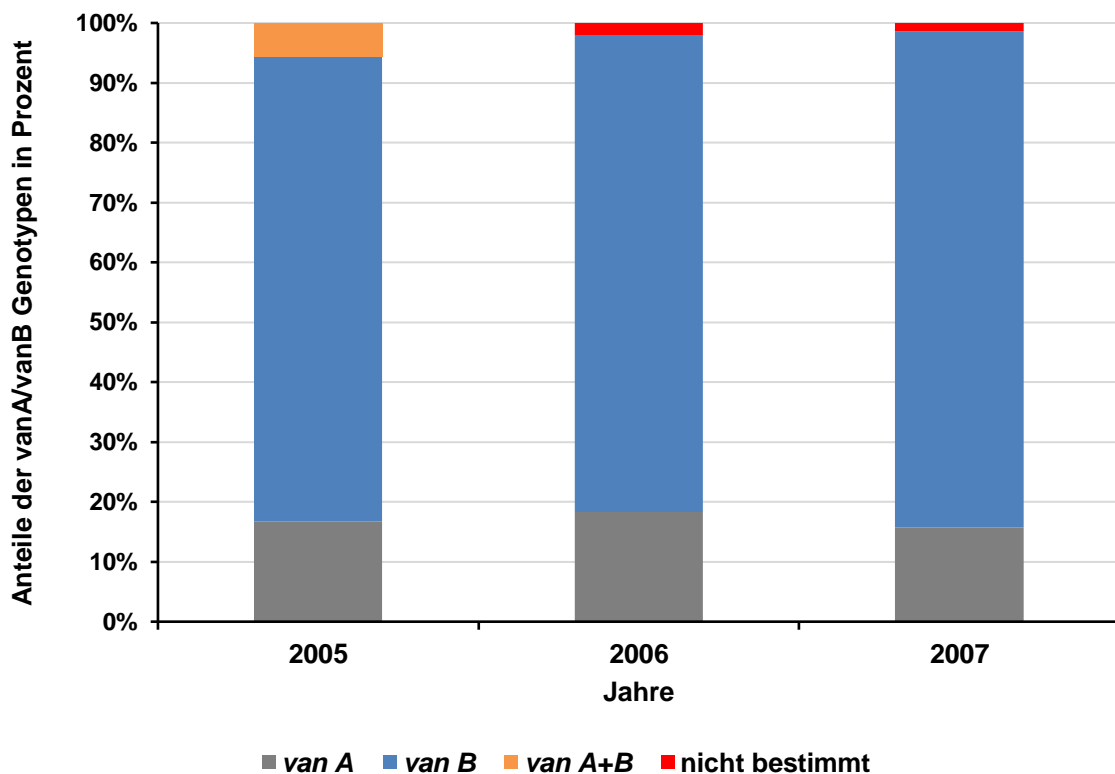


Abbildung 15: Verhältnisse der *vanA/vanB* VREfm Gene über die Jahre 2005 bis 2007.

Die Anteile der Sequenztypen (ST) bzw. Complexotypen (CT) an den jeweiligen *vanA/vanB* VREfm Genotypen, ist in Abbildung 16 in einem Sunburst-Diagramm hinterlegt.

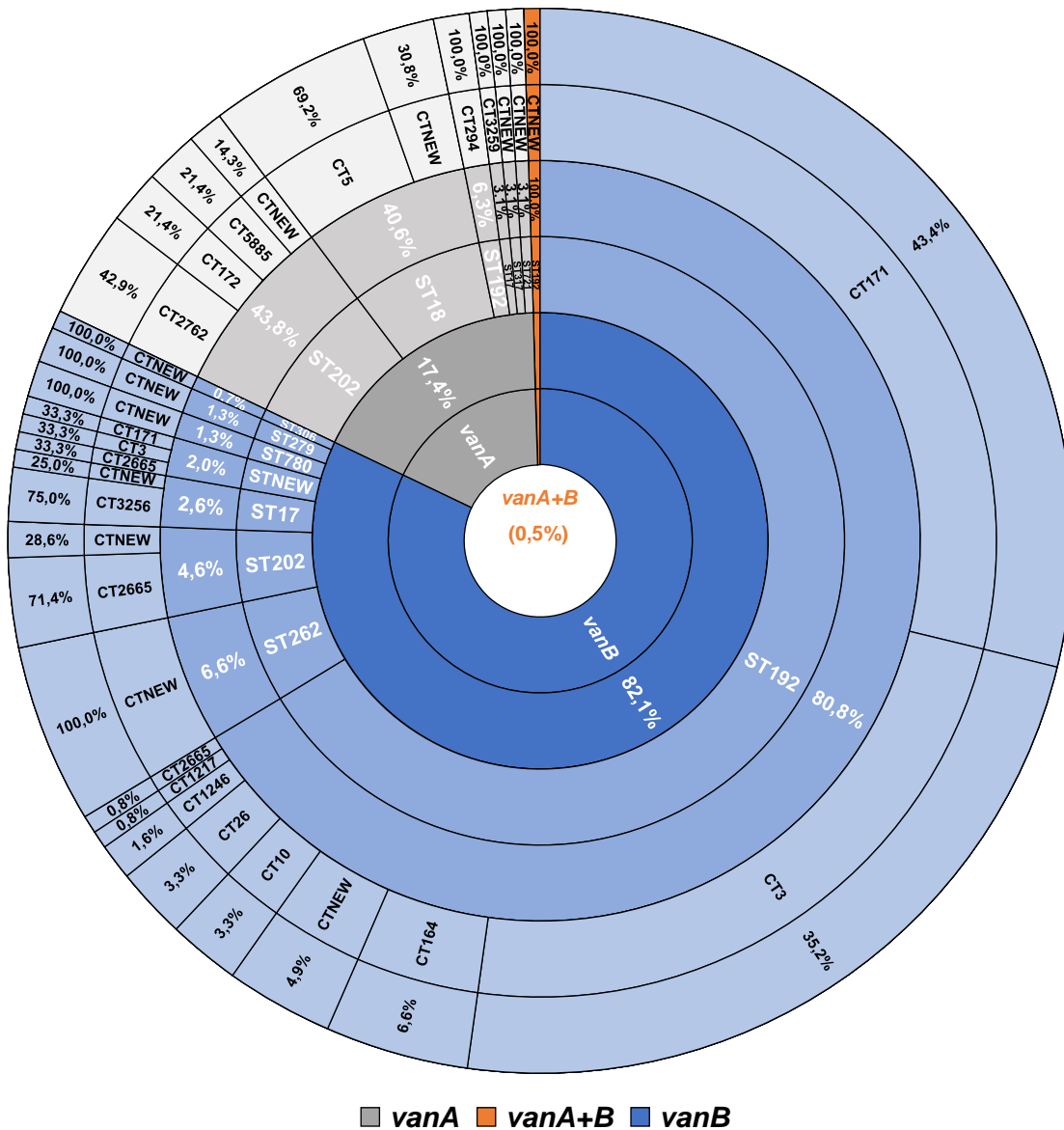


Abbildung 16: Anteile der ST/CT Typen an den *vanA/vanB* VREfm Genotypen in den Jahren 2005 bis 2007.

Für *vanA* nahm über alle Jahre der ST202 mit 43,8 % den größten Anteil ein, darunter war der ST202/CT2762 mit 42,9 % führend, gefolgt vom ST202/CT5885 mit 21,4 % und ST202/CT172 mit ebenso 21,4 %. Dem ST202 folgte der ST18 mit 40,6 %, unter diesem war der ST18/CT5 mit 69,2 % führend. Diesem folgte mit großem Abstand der ST192/CT294 mit 6,3 % und mit je 3,1 % ST721, ST317, ST17/CT3259.

Die im Jahr 2005 einmalig detektierten *vanA+vanB* Gene wurden in ST192/CTNEW gefunden.

Den größten Anteil an *vanB* konnte dem ST192 mit 80,8 % zugeschrieben werden. Darunter führend war der ST192/CT171 mit 43,4 %, dem folgend der ST192/CT3 mit 35,2 %. Weiterhin die Typen ST192/CT64 mit 6,6 %, mit je 3,3 % der ST192/CT26 und ST192/CT10, mit 1,6 % der ST192/CT1246, mit je 0,8 % der ST192/CT2665 und ST192/CT1217. Dem ST192 folgten für *vanB* mit großem Abstand der ST262 mit 6,6%, der ST202 mit 4,6 %, der ST17 mit 2,6 %, der STNEW mit 2 %, mit je 1,3 % der ST279 und ST780 sowie der ST306 mit 0,7 %.

Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind Abbildung 17 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp.

Für den häufigsten Sequenztyp dieser Studie (ST192) lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei 1:61. Von 125 Isolaten des ST192 wurden in 122 das *vanB* Resistenzgen (97,6 %), in 2 (1,6 %) das *vanA* Resistenzgen und in einem Isolat (0,5 %) das *vanA* und *vanB* Resistenzgen gefunden.

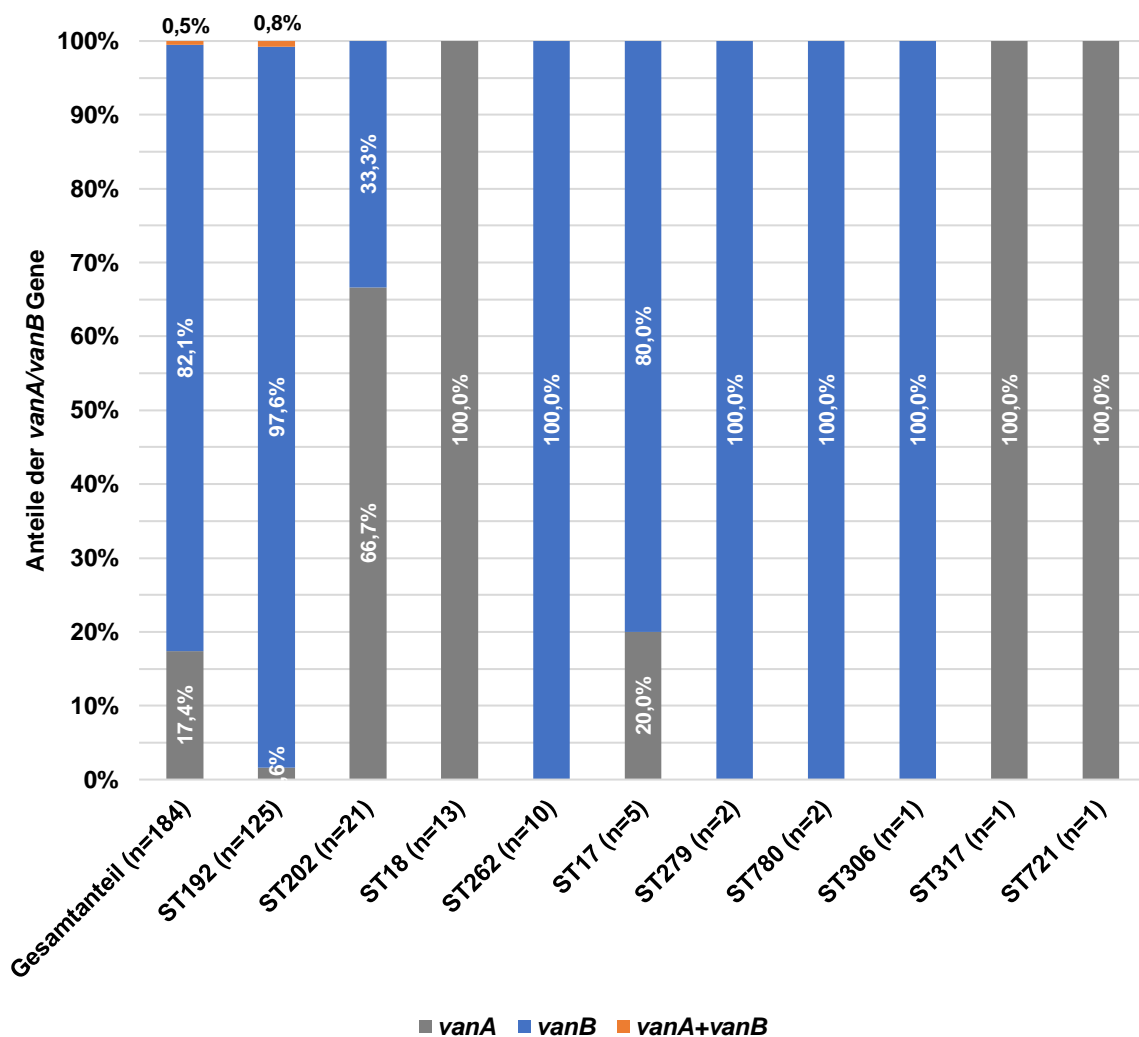


Abbildung 17: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) dieser Arbeit.

4.1.5 Antibiotika-Resistenzgene

Die 187 Isolate wurden mittels Ridom Seqsphere+³¹ und des Taskmoduls NCBI AMRFinderPlus⁴³ auf Antibiotika-Resistenzgene für *E. faecium* analysiert.

Tabelle 22 im Anhang liefert einen Überblick hinsichtlich der gefundenen Antibiotika-Resistenzgene eines jeden Isolats und des zugehörigen ST/CT.

Es konnten bei allen (n=187) Isolaten kodierende Gene für eine Aminoglykosidresistenz gefunden werden, darunter *aac(6')-I* (100 %), *aph(3')-IIIa* (79,7 %), *ant(6)-Ia* (79,7 %), *aac(6')-Ie* (4,8%), *aph(2'')-Ia* (4,8 %) und *aph(2'')-IIa* (1,1 %).

Weiterhin konnten bei allen Isolaten kodierende Gene für eine Makrolidresistenz detektiert werden, dies waren *msr(C)* (100 %) sowie *erm(B)* (89,8 %).

Auch für die Antibiotikaklasse der Chinolone konnte bei allen Isolaten eine oder mehrere mit Fluorchinolon-Resistenz in Verbindung gebrachte chromosomale Mutation gefunden werden, dies waren GyrA_S83I (90,4 %), ParC_S80R (82,9 %), ParC_S80I (17,1 %), GyrA_S83Y (7,5 %), GyrA_E87G (1,6 %), GyrA_E87K (1,1 %), GyrA_S83R (0,5 %).

Für die Klasse der Lincosamide konnte bei 74,3 % der Isolate ein kodierendes Resistenzgen entdeckt werden, dies waren *Inu(B)* (73,8 %) sowie *Isa(E)* (67,4 %).

In 74,9 % der Isolate fand sich ein kodierendes Gen für eine Tetracyclin-Resistenz, dies waren *tet(L)* (74,3 %) und *tet(M)* (0,5 %).

Das für eine Pleuromutilin-Resistenz kodierende Gen *eat(A)* trugen 99,5 % der Isolate.

Der Anteil des für eine Trimethoprim-Resistenz kodierenden Gens *dfrG* lag bei 12,8 % und der Anteil des für eine Streptothricin-Resistenz kodierenden Gens *sat4* bei 6,4 %.

Die Entwicklung der prozentualen Anteile der für die Antibiotikaklassen spezifischen Resistenzgene in den Jahren 2005, 2006 und 2007 ist in Abbildung 18 dargestellt.

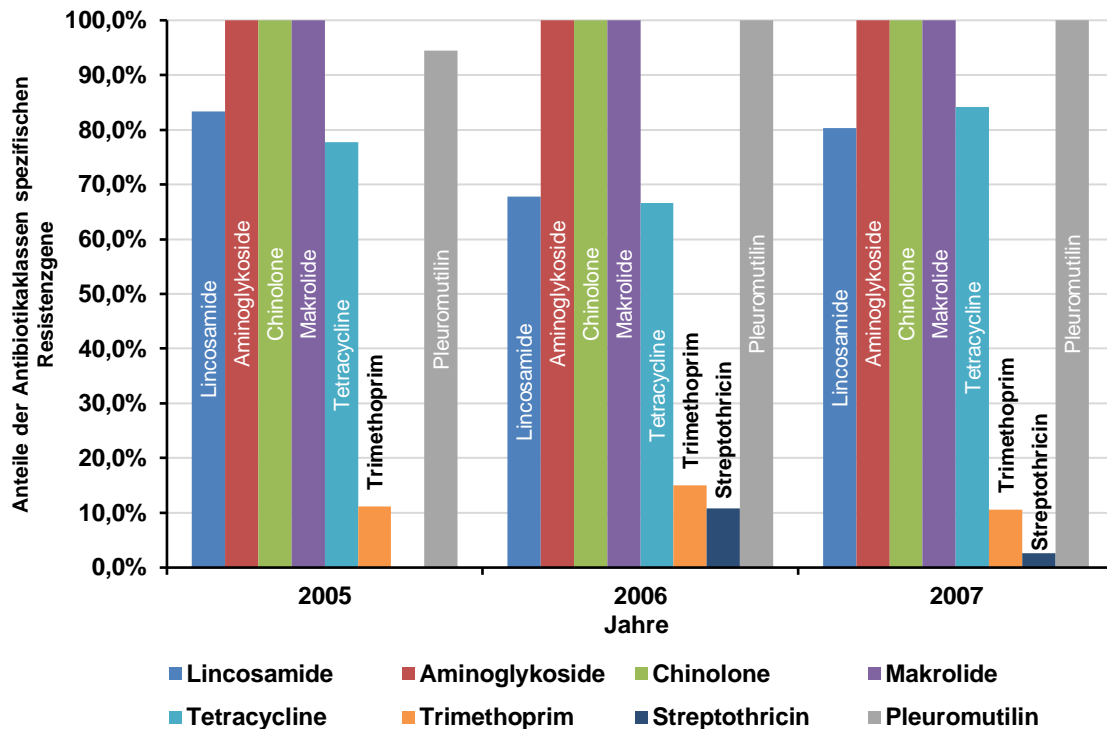


Abbildung 18: Entwicklung der prozentualen Anteile der Antibiotikaklassen spezifischen Resistenzgene der Isolate in den Jahren 2005, 2006, 2007.

Es zeigte sich, dass alle Isolate Gene für Resistenzen der Klassen Aminoglykoside, Chinolone und Makrolide über alle Jahre besaßen.

Das kodierende Gen *eat(A)* für eine Pleuromutilin-Resistenz lag 2005 bei 94,4 % (n=17/18) der Isolate vor, 2006 (n=93/93) und 2007 (n=76/76) jeweils bei 100 % der Isolate.

Der Anteil der Isolate mit einem Gen für eine Tetracyclin-Resistenz lag 2005 bei 77,8 % (n=14/18), sank 2006 auf 66,7 % (n=62/93) und stieg 2007 wieder an, auf 84,2 % (n=64/76). Ein ähnliches Bild zeigte sich hinsichtlich des Anteils der Isolate mit einem Gen für eine Lincosamid-Resistenz. 2005 lag der Anteil bei 83,3 % (n=15/18), fiel 2006 auf 67,7 % (n=63/93) und stieg 2007 wieder an auf 80,3 % (n=61/76).

Der Anteil der Isolate mit dem Gen *dfrG*, kodierend für eine Trimethoprim-Resistenz, lag 2005 bei 11,1 % (n=2/18), stieg 2006 auf 15,1 % (n=14/93) und fiel 2007 wieder auf 10,5 % (n=8/76).

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Anteile des Streptothricin-Resistenzgens *sat4*. 2005 lag dieses bei 0 % (n=0/18), stieg 2006 auf 10,8 % (n=10/93), um 2007 auf 2,6 % (n=2/76) zu fallen.

4.1.6 Wichtige *E. faecium* Virulenzfaktoren

Die Ergebnisse der Virulenzfaktoren Analyse sind in Abbildung 19 und Tabelle 23 im Anhang dargestellt. Mittels Ridom Seqsphere+³¹ und des Taskmoduls VFDB⁴⁴ wurde nach den 4 wichtigsten *E. faecium* bezogenen Virulenzfaktoren in allen Isolaten gesucht.

Bei den Faktoren *acm*, *scm*, *ecbA* handelt es sich um MSCRAMMs, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, welche die Adhäsion bzw. Bindung an Liganden wie Fibrinogen und Kollagen der Zellen und Gewebe des Wirtes fördern und dadurch invasive Infektion erleichtern.⁴⁹ Im Falle von nosokomialen Infektionen mit *E. faecium* waren dies im Detail *acm*,⁵⁰ ein Kollagen I und IV bindendes Adhäsins und *ecbA*,⁵¹ ebenso ein Adhäsins das an Nidogen und Fibrinogen der Extrazellulärmatrix bindet sowie *scm*⁵², das an Kollagen V und Fibrinogen bindet. Dem Virulenzfaktor *sgrA*⁵¹ wird dagegen eine fördernde Beteiligung an der *E. faecium* Biofilmbildung zugeschrieben.

Bei 97,9 % (n=183/187) der Isolate konnte der Faktor *sgrA*, bei 86,1 % der Faktor *acm* (n=161/187) und bei 17,6 % der Faktor *ecbA* (n=33/187) gefunden werden.

Der Virulenzfaktor *scm* trat bei keinem der Isolate auf.

Im Jahr 2005 lag der Anteil von *sgrA* an den Isolaten bei 100 % (n=18/18), ebenso 2006 (n=93/93) und fiel 2007 auf 94,7 % (n=72/76). Der Anteil des Virulenzfaktor *acm* an den Isolaten lag 2005 bei 88,9 % (n=16/18), fiel 2006 (n=76/93) auf 81,7 % um 2007 wieder auf 90,8 % (n=69/76) zu steigen. *ecbA* trat 2005 bei keinem der Isolate auf, 2006 stieg der Anteil dann auf 20,4 % (n=19/93) und fiel 2007 auf 18,4 % (n=14/76).

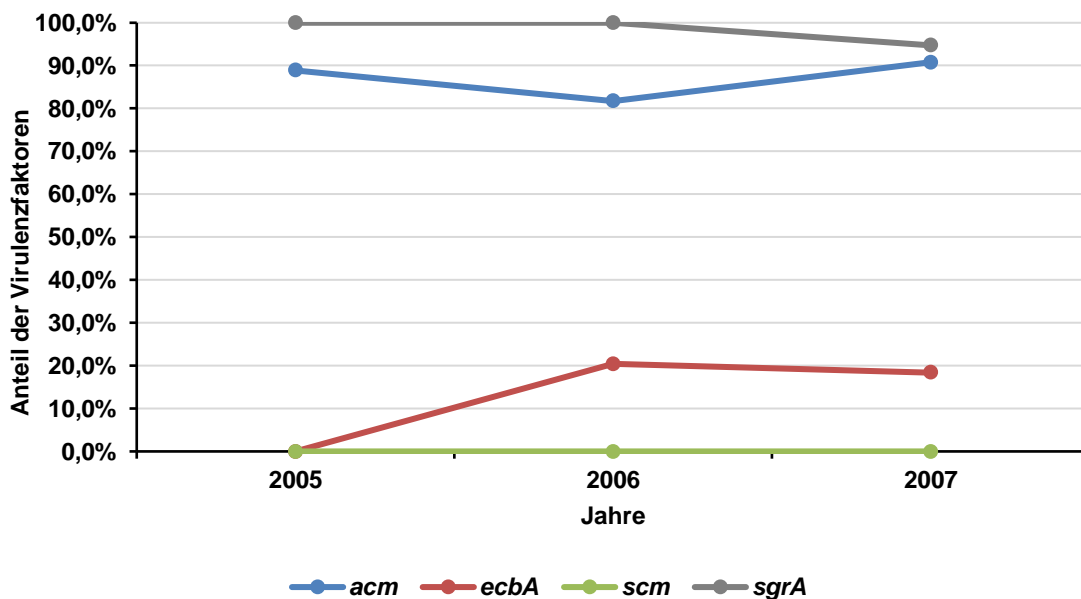


Abbildung 19: Entwicklung der prozentualen Anteile der spezifischen *E. faecium* Virulenzfaktoren *acm*, *ecbA*, *scm*, *sgrA* der Isolate in den Jahren 2005, 2006, 2007.

4.1.7 Phylogenetische Analyse der 187 VREfm Isolate aus 2005 bis 2007

In Abbildung 20 ist die phylogenetische zirkuläre Übersichts-Darstellung aller 187 im Rahmen dieser Arbeit typisierten Isolate zu sehen. Eine vergrößerte Darstellung im Querformat findet sich im Anhang, siehe Abbildung 67.

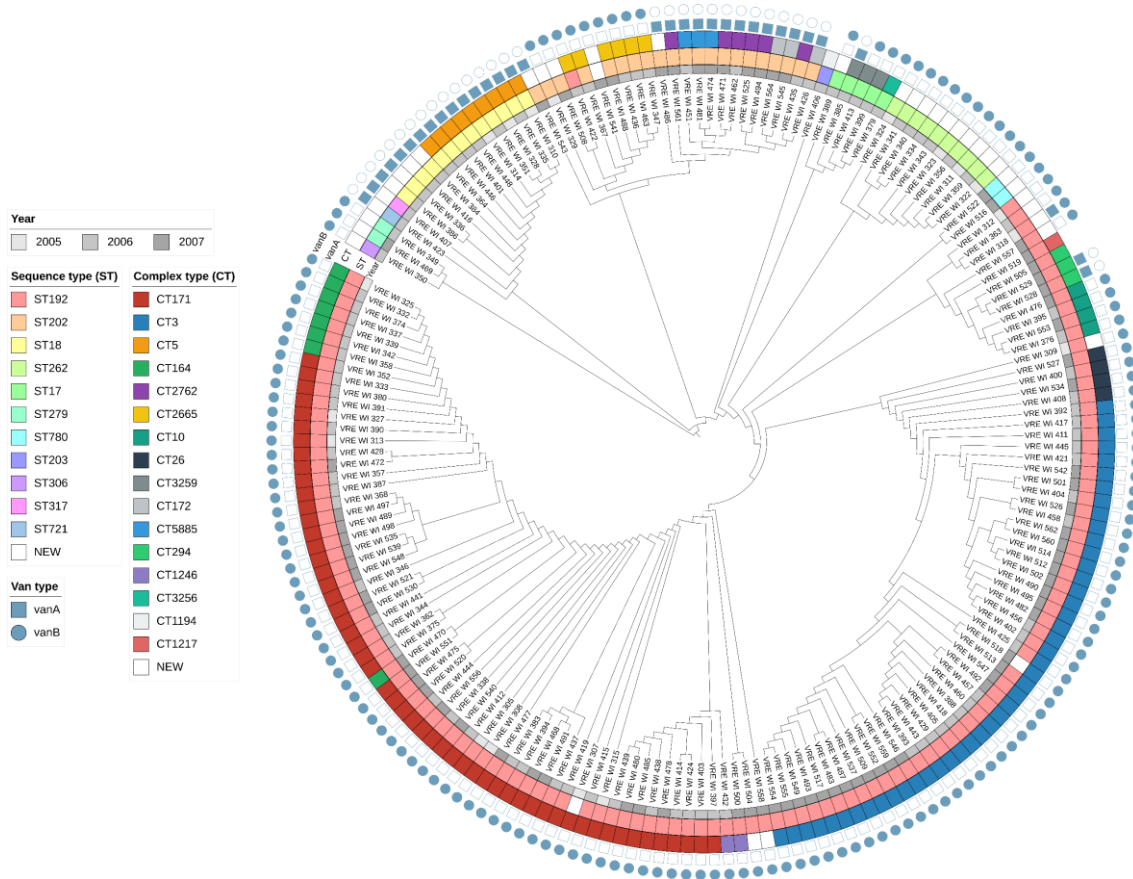


Abbildung 20: Phylogenetische zirkuläre Übersichts-Darstellung aller 187 typisierten Isolate auf Basis eines Neighbor-Joining-Trees.

Die Darstellung erfolgte auf Basis eines Neighbor-Joining-Trees nach Saitou⁴² unter Angabe (innen nach außen) der Isolaten-Nummer, des Proben-Jahres, des MLST-Sequenztyps (ST), des cgMLST-Complexyps (CT) sowie der *van* Gene.

Die inneren Linien bilden die phylogenetischen Beziehungen der Isolate zueinander ab und entsprechen den kürzesten Evolutionspfaden zwischen den Isolaten. Die Knotenpunkte stellen die letzten gemeinsamen Vorfahren der verbundenen Isolate dar.

In Abbildung 20 können mehrere Cluster lokalisiert werden. Im größten Teil clustern eng Verwandte Isolate vom Typ ST192, die sich in Subcluster CT171 und CT3 untergruppieren lassen. Als gemeinsames genetische Merkmal konnte hier das *vanB* Gen identifiziert werden.

Die phylogenetische Analyse zur Untersuchung und Visualisierung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den 187 Isolaten wurde mit Hilfe von minimum spanning trees (MST) durchgeführt, wie in Abbildung 21 zu sehen.

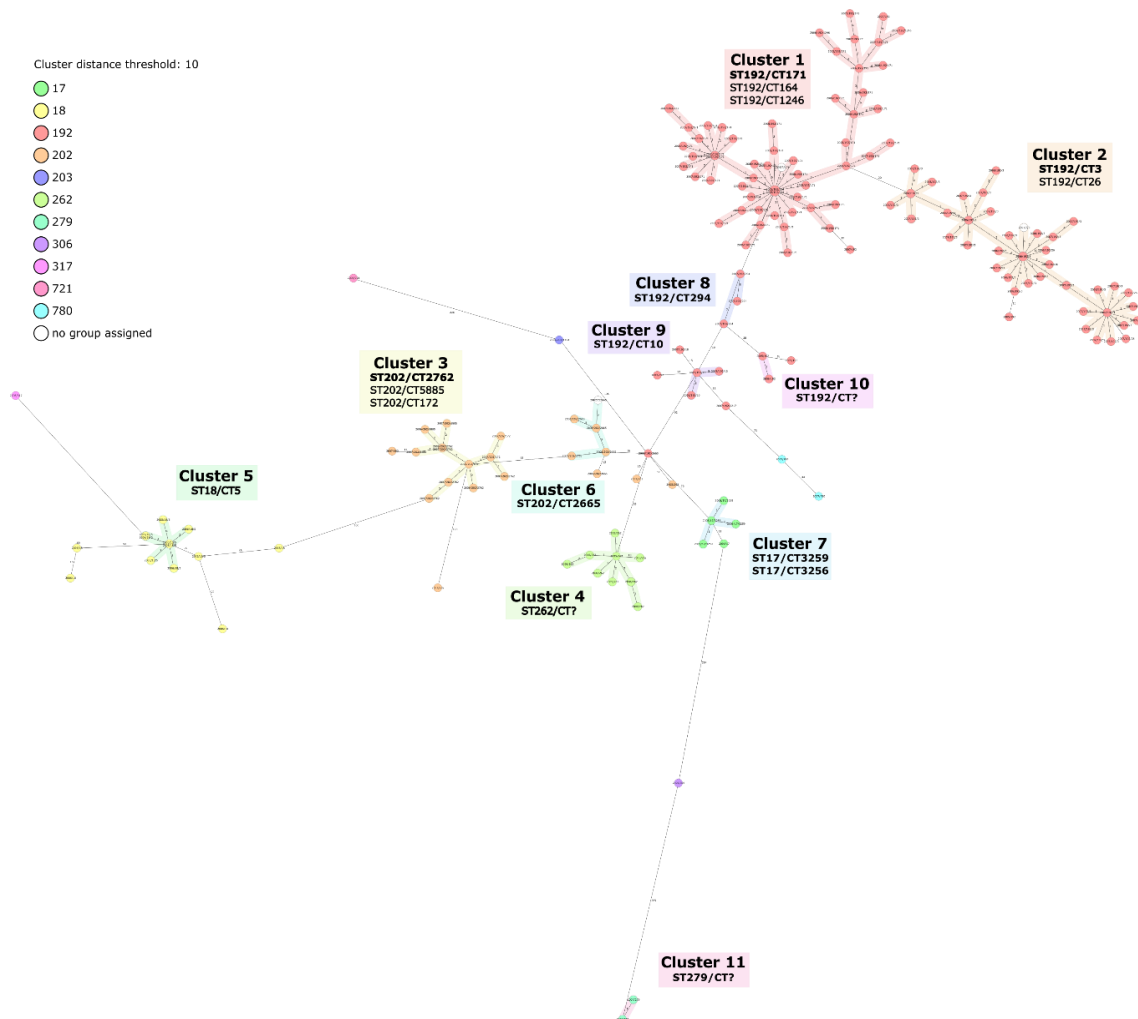


Abbildung 21: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen in Anlehnung an die Arbeiten von Falgenhauer et al.^{22,29} definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Die Analyse ergab, dass Isolate desselben Sequenz- und Complextyps aus unterschiedlichen Probenjahren (2005, 2006 und 2007) Teil desselben Clusters waren. Diese Erkenntnis war Grundlage für eine detaillierte Cluster Analyse im Folgenden.

Bei einer Schwelle von 10 Allelen Unterschied, unter Berücksichtigung von 1423 cgMLST-Kerngenomgenen und 7 MLST-Haushaltsgenen zwischen den Isolaten, konnten insgesamt 11 Cluster generiert werden, siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Übersicht der 162 von 187 Isolaten, die einem Cluster auf Basis von MLST/cgMLST Genotypisierung zugeordnet wurden. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen und eine Mindestzahl von 2 Isolaten pro Cluster nach Standardeinstellungen definiert.

Cluster	Anzahl der Isolate	ST	CT
Cluster 1	65	ST192	CT171
			CT164
			CT1246
Cluster 2	48	ST192	CT3
			CT26
Cluster 3	12	ST202	CT2762
			CT5885
			CT172
Cluster 4	10	ST262	CTNEW
Cluster 5	8	ST18	CT5
Cluster 6	5	ST202	CT2665
Cluster 7	4	ST17	CT3259
			CT3256
Cluster 8	3	ST192	CT294
Cluster 9	3	ST192	CT10
Cluster 10	2	ST192	CTNEW
Cluster 11	2	ST279	CTNEW

Das größte Cluster bildete das Cluster 1, welches aus Abbildung 21 in Abbildung 22 vergrößert ausgeschnitten und dargestellt ist. Dieses bestand vornehmlich aus Isolaten des Typs ST192/CT171. Die Allelunterschiede innerhalb dieses Clusters lagen bei ≤ 9 .

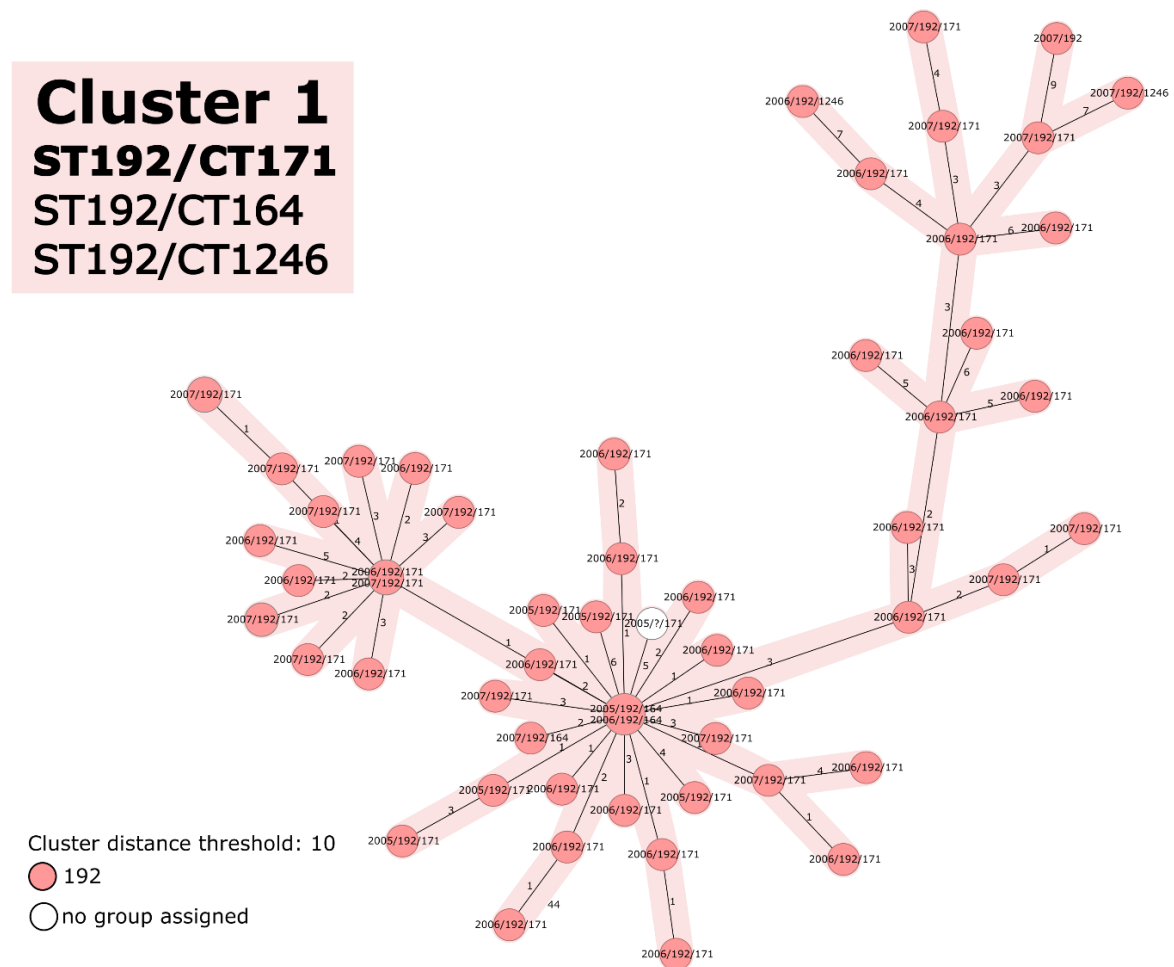


Abbildung 22: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 1 der Gesamtübersicht aus Abbildung 21. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Das Cluster 2, welches aus Abbildung 21 in Abbildung 23 vergrößert ausgeschnitten und dargestellt ist, wurde vornehmlich durch den ST192/CT3 und ST192/CT26 formiert. Hier lagen die Allelunterschiede innerhalb des Clusters bei ≤ 7 .

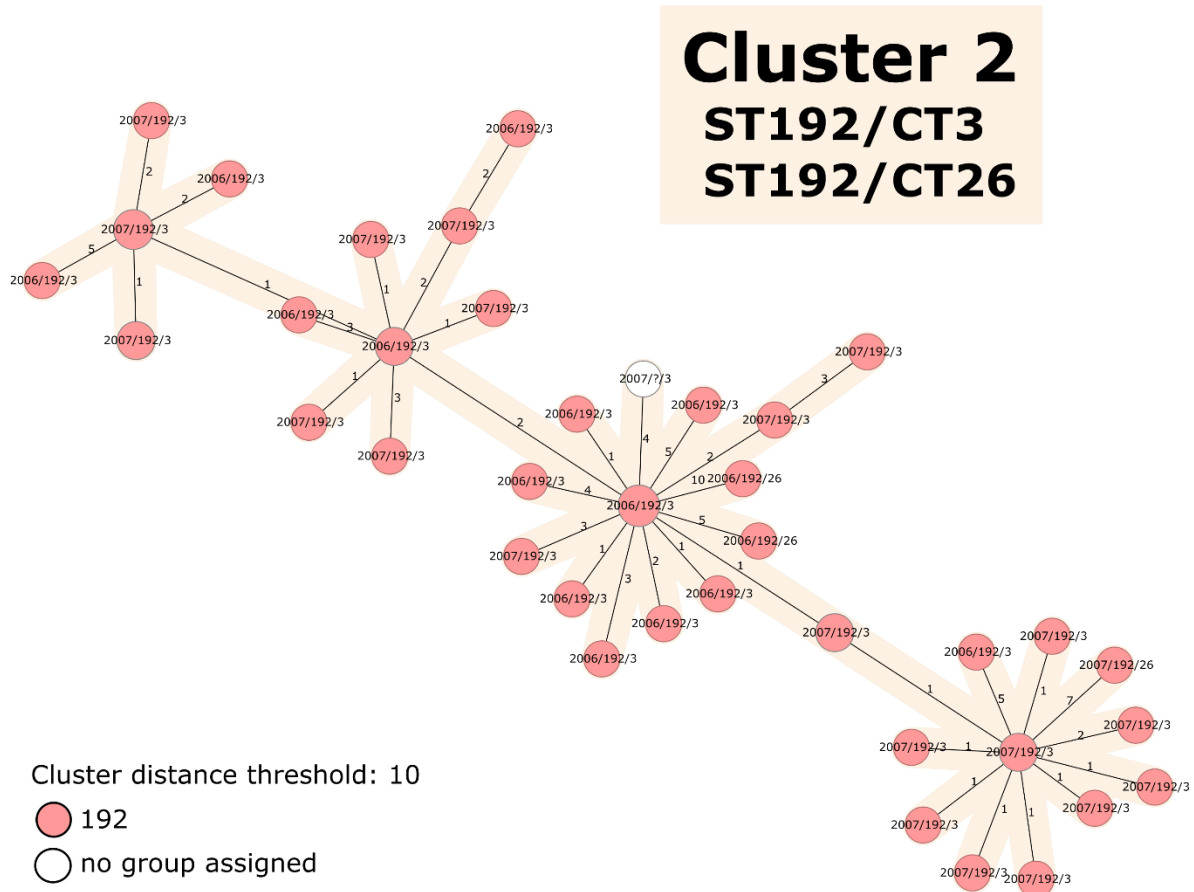


Abbildung 23: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 2 der Gesamtübersicht aus Abbildung 20. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Es konnte zwischen Cluster 1 und 2, beides ST192, eine geringste Allel-Differenz zweier Isolate unterschiedlichen CT-Subtyps von 20 ausgemacht werden. Dies legte eine engere Verwandtschaftsbeziehung zwischen dem ST192/CT171 und ST192/CT3 nahe.

Andere dem Cluster 1 nahe liegende Cluster waren das Cluster 8, Abbildung 24 zu entnehmen. Diese wurde vornehmlich durch Isolate des Typs ST192/CT294 gebildet, jedoch lag hier die minimale Zahl der Allelunterschiede zweier Isolate des jeweiligen Clusters bereits bei 44. Weitere ST192 Cluster mit weiter entfernter Verwandtschaft zum Cluster 1, waren das Cluster 9 (ST192/CT10) und das Cluster 10 mit ST192 unbekanntem Complexotyps. Letzteres unterhielt eine engere Beziehung zum Cluster 8 (ST192/CT294) bei einer Alleldifferenz von 38.

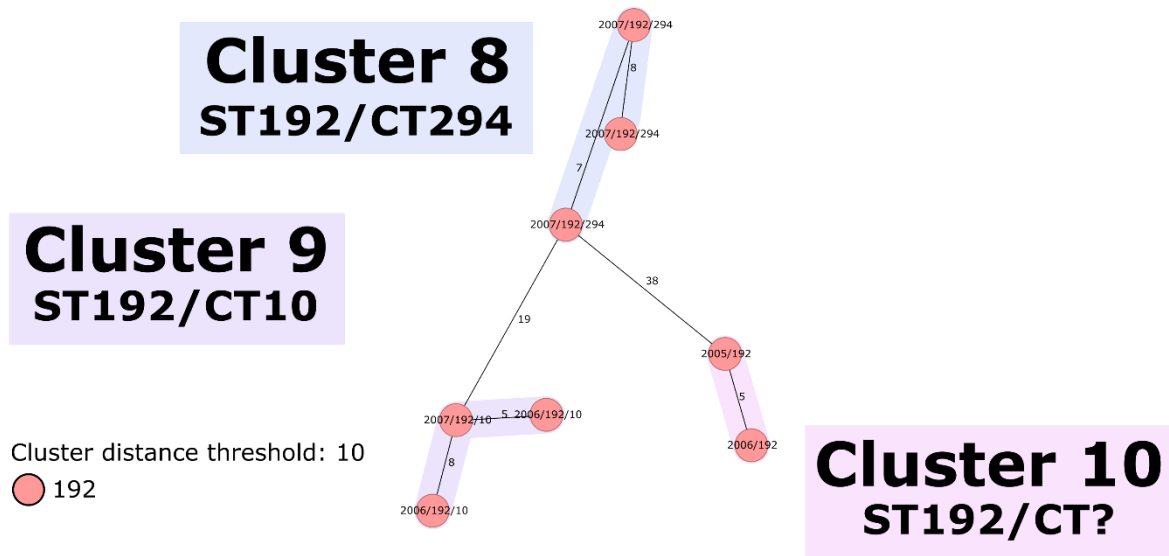


Abbildung 24: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 8, 9 und 10 der Gesamtübersicht aus Abbildung 21. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Ein weiteres größeres Cluster war das Cluster 3, vornehmlich Isolate des Typs ST202/CT2762. Dieses unterhielt zum Cluster 6 eine Beziehung, ebenso enthielt dieses Isolate des Typs ST202, jedoch CT2665 Subtyp. Die Allelunterschiede zwischen Cluster 3 und Cluster 6 lagen bei 2 Isolaten des jeweiligen Clusters jedoch bei 92.

Letztlich bildeten noch der ST18/CT5 das Cluster 5, der ST262 unbekanntem CT-Typs das Cluster 4, der ST17/CT3259 und ST17/CT3256 das Cluster 7 sowie 2 Isolate des ST279 unbekanntem CT-Typs das Cluster 11. Die Zahl der maximalen Allelunterschiede zwischen den Isolaten innerhalb der Cluster lag bei ≤ 7 (Cluster 5), ≤ 10 (Cluster 4), ≤ 2 (Cluster 7) und ≤ 1 (Cluster 11).

Der Schwellenwert für die Distanz der Allele zur Bildung der cgMLST Cluster wurde für eine weitere phylogenetische Analyse von 10 auf den durch die Ridom Seqsphere+ Software³¹ empfohlenen Wert von 20 erhöht. Hierbei konnten einige Veränderungen hinsichtlich der Clusterbildung beobachtet werden, wie in Tabelle 6 und Abbildung 25 im Vergleich zu erkennen ist. Insgesamt verringerte sich die Anzahl der Cluster von 11 auf 10, da mehr Isolate einzelnen Clustern zugeordnet wurden.

Tabelle 6: Übersicht der 173 von 187 Isolaten, die einem Cluster auf Basis von MLST/cgMLST Genotypisierung zugeordnet wurden. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen und eine Mindestzahl von 2 Isolaten pro Cluster nach Standardeinstellungen definiert.

Cluster	Anzahl der Isolate	ST	CT
Cluster 1	116	ST192	CT171
			CT3
			CT164
			CT1246
			CT26
Cluster 2	13	ST202	CT2762
			CT5885
			CT172
Cluster 3	10	ST262	CTNEW
Cluster 4	9	ST18	CT5
Cluster 5	8	ST192	CT2665
		ST202	
Cluster 6	7	ST192	CT10
		ST192	CT294
Cluster 7	5	ST17	CT3259
			CT3256
Cluster 8	3	ST192	CTNEW
Cluster 9	2	ST18	CTNEW
Cluster 10	2	ST279	CTNEW

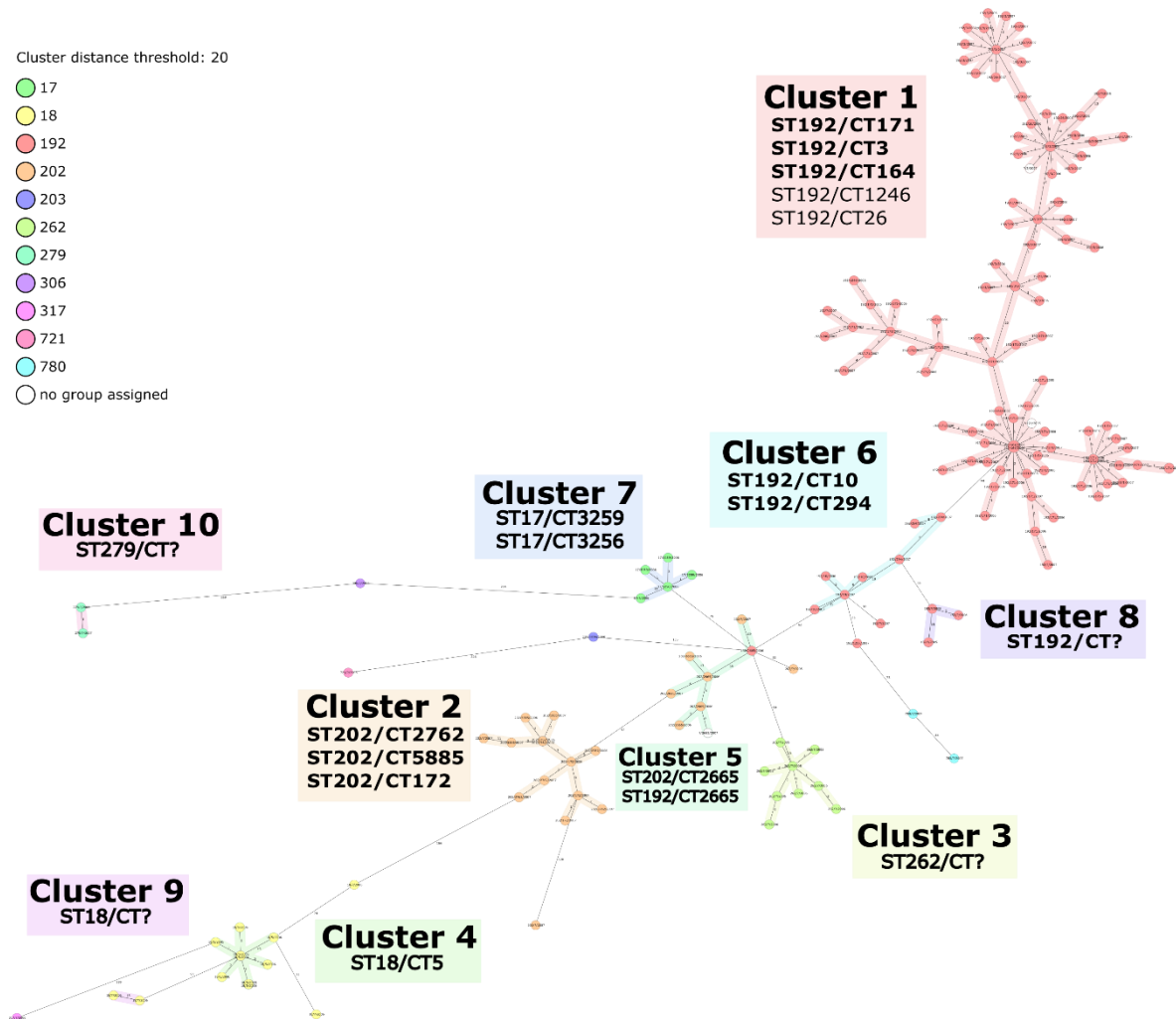


Abbildung 25: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen repräsentieren die Allelunterschiede zwischen Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Die ursprünglich getrennten Cluster 1 und Cluster 2 in Abbildung 21 formierten in Abbildung 25 ein Cluster 1, siehe im Detail in Abbildung 26.

Das Cluster 1 umfasste dabei Isolate des ST192/CT171 sowie des ST192/CT3. Hierbei lag die Zahl der unterschiedlichen Allele zwischen 2 Isolaten des ST192/CT171 und ST192/CT3 bei 20, was eine engere Verwandtschaftsbeziehung zwischen beiden nahelegte.

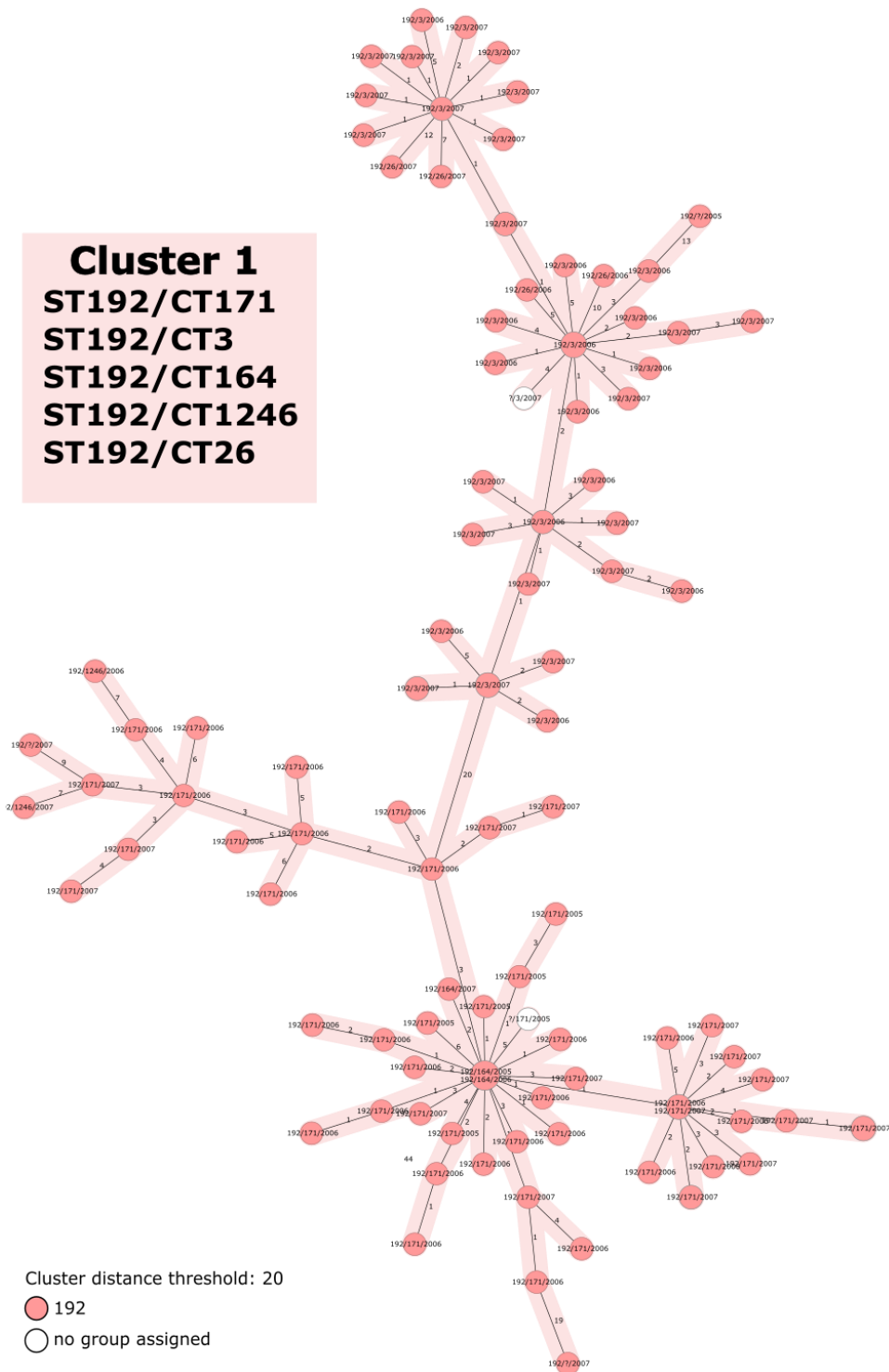


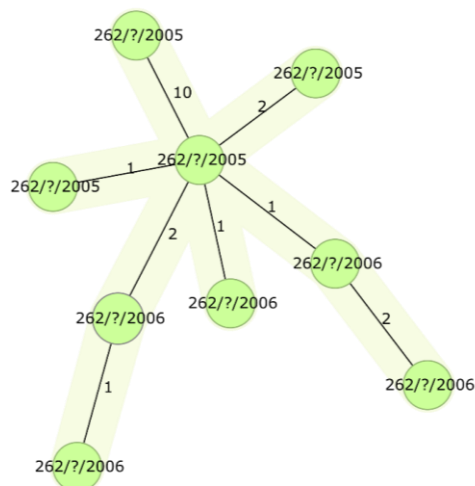
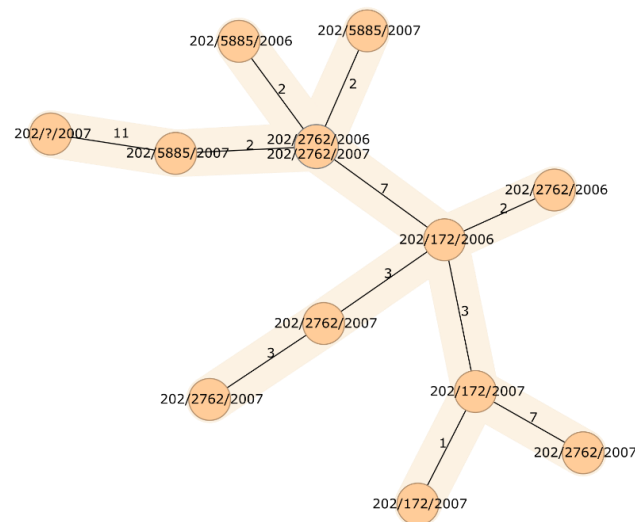
Abbildung 26: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 1 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Ein weiteres größeres Cluster war das Cluster 2, siehe Abbildung 27. Dieses enthielt Isolate des Typs ST202/CT2762, ST202/CT5885 sowie ST202/CT172 und war verwandt mit Cluster 5, ebenso enthielt dieses Isolate des Typs ST202, jedoch CT2665 Subtyp. Die Allelunterschiede zwischen Cluster 2 und Cluster 5 lagen bei 2 Isolaten des jeweiligen Clusters jedoch bei 92. Der ST262 unbekanntes CT-Typ formierte das Cluster 3, siehe ebenso Abbildung 27. Bei einer Alleldifferenz der Isolate innerhalb des Clusters von ≤ 10 . Die Allelunterschiede zwischen Cluster 3 und Cluster 5 lagen bei 2 Isolaten des jeweiligen Clusters bei 89.

Cluster 2

ST202/CT2762
ST202/CT5885
ST202/CT172

Cluster distance threshold: 20



Cluster 3

ST262/CT?

Cluster distance threshold: 20



Abbildung 27: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 2 und 3 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Das Cluster 4, siehe Abbildung 28, enthielt Isolate des Typs ST18/CT5 bei einer Alleldifferenz der Isolate innerhalb des Clusters von ≤ 15 . Cluster 4 war verwandt mit Cluster 9. Cluster 9 enthielt ebenso Isolate vom ST18 Typ, jedoch unbekanntem CT-Subtyps. Die Allelunterschiede zwischen Cluster 4 und Cluster 9 lagen bei 2 Isolatensätzen des jeweiligen Clusters bei 93.

Das Cluster 5 in Abbildung 28 umfasste neben dem ST202/CT2665, nun auch den benachbarten ST192/CT2665, unterschiedlichen ST-Typ bei identischem CT-Typ, bei einer Alleldifferenz zwischen Isolatensätzen des jeweiligen Subtyps von 16.

In Abbildung 21 stand der ST192/CT2665 bei einer Alleldifferenz von 16 und damit >10 noch außerhalb des Clusters. Die Allelunterschiede zwischen dem benachbarten Cluster 3 und 5 lagen bei 2 Isolatensätzen des jeweiligen Clusters bei 89.

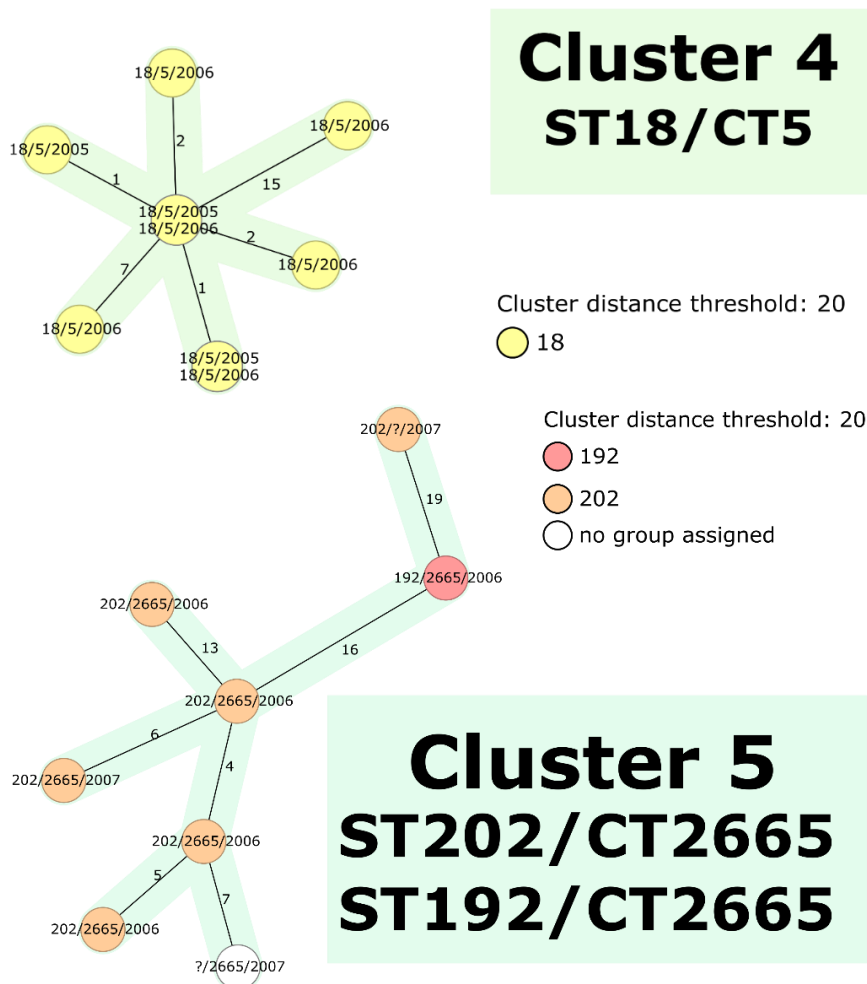


Abbildung 28: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 4 und 5 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolatensätzen. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Auch das Cluster 9 mit Isolaten des ST192/CT10 sowie das Cluster 8 mit Isolaten des ST192/CT294, formierten für eine erhöhte Schwelle zur Clusterbildung als ein Cluster 6 in Abbildung 24 bzw. im Detail in Abbildung 29. Die Alleldifferenz zwischen ST192/CT10 und ST192/CT294 lag für 2 Isolate des jeweiligen CTs innerhalb des Clusters bei minimal 19 Allelen Unterschied, was ebenso eine engere Verwandtschaftsbeziehung nahelegte.

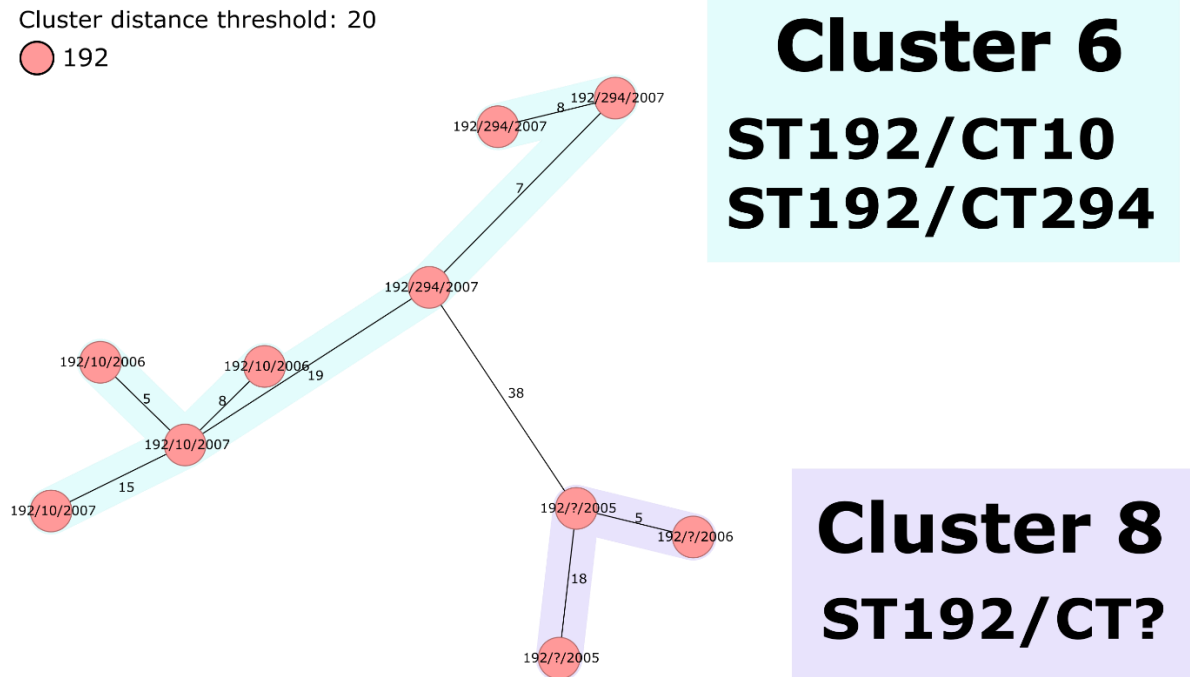


Abbildung 29: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 6 und 8 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolat. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Das Cluster 7, siehe Abbildung 30, enthielt Isolate des gleichen Sequenztyps, aber unterschiedlichen Complextyps. Der ST17/CT3259 und ST17/CT3256 bei einer Alleldifferenz der Isolate innerhalb des Clusters von ≤ 11 . Cluster 7 war verwandt mit Cluster 5. Die Allelunterschiede zwischen Cluster 7 und Cluster 5 lagen bei 2 Isolatentypen des jeweiligen Clusters bei 79.

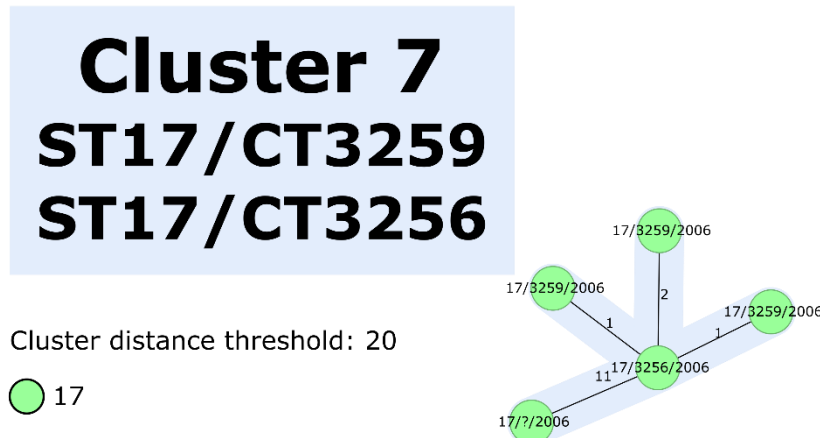


Abbildung 30: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 7 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolatentypen. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Letztlich bildeten noch einige Isolate kleinere Cluster, die bei einer Alleldifferenzschwelle von >10 wie in Abbildung 21 nicht auftraten. Dies war das Cluster 9 mit Isolatentypen des ST18 unbekanntem CT-Subtyp bei einer Alleldifferenz der Isolate innerhalb des Clusters von ≤ 13 und war verwandt mit Cluster 4, ebenso ST18, jedoch CT5 Subtyp. Die Allelunterschiede zwischen Cluster 9 und Cluster 4 lagen bei 2 Isolatentypen des jeweiligen Clusters bei 93. Ein weiteres kleineres Cluster war das Cluster 10 mit 2 Isolatentypen des ST279 unbekanntem CT-Subtyp bei einer Alleldifferenz der Isolate innerhalb des Clusters von ≤ 1 , siehe Gesamtübersicht in Abbildung 25.

Durch die Erhöhung des Schwellenwerts der Alleldistanz zur Clusterbildung von 10, wie bei Falgenhauer et al.^{22,29}, auf den durch die Ridom Seqsphere+³¹ Software empfohlenen Wert von 20, wurden mehr Isolate einzelnen Cluster zugeordnet. Weber et al.⁵³ berichteten hier von keinen Änderungen hinsichtlich der minimum spanning trees. Dadurch verringerte sich insgesamt die Anzahl der Cluster, was sich für die nachfolgenden komparativen genom-basierten Analysen, mit einer deutlich höheren Anzahl an VREfm aus dem Rhein-Main Gebiet und Deutschland, mit einem Schwellenwert von 20, zu Nutzen gemacht wurde.

4.2 Ganzgenombasierte Ergebnisse relevanter Studien für die Analyse

4.2.1 Genotypisierung der 198 VREfm Isolate von Mellmann et al. (2016)

Von 198 VREfm Isolaten der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ (2016), konnten 195 Isolate 13 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe Abbildung 31 und Tabelle 7.

Die Isolate stammten aus den Jahren 2013-2015. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen. Von 195 Isolaten wurden 18 in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen Sequenztypen (ST) bei <1 % lag.

In der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ dominierte der ST203 (54,5 %), gefolgt vom ST192 (21,7 %) und in geringerer Anzahl auftretend die Sequenztypen ST117 (5,6 %), ST80 (5,1 %), ST17 (2,0 %) und ST555 (2,0 %). Weiterhin konnten 3 Isolate (1,5 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige mit 18 Isolaten (9,1 %), findet sich in Tabelle 7 unter Angabe der Sequenztypen (ST), ihrer absoluten Anzahl und ihres Anteils.

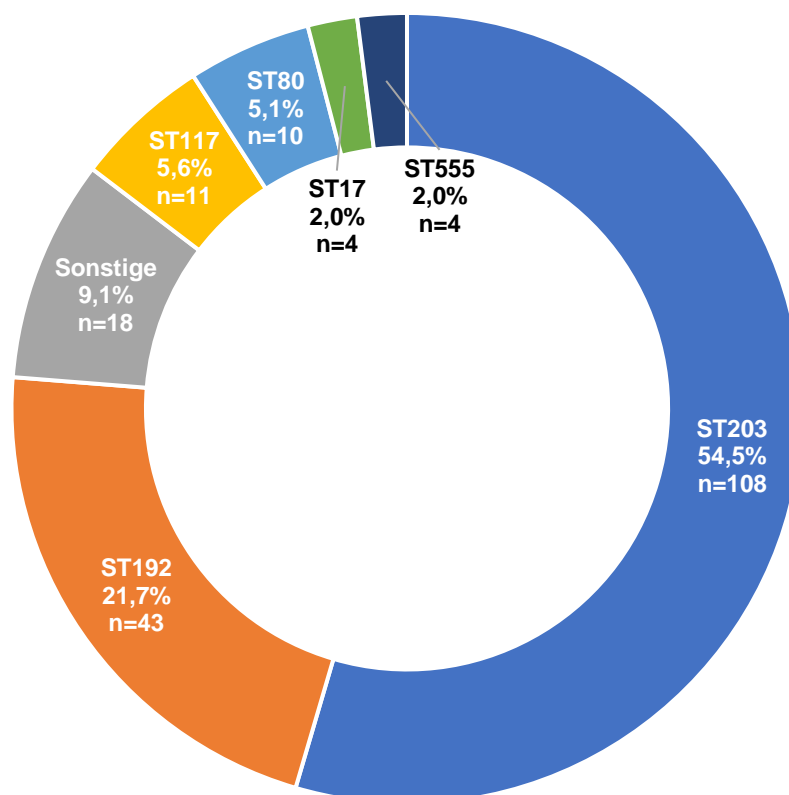


Abbildung 31: Gesamtanteile der ST der Isolate (n=198, Probenjahre: 2013-2015) von Mellmann et al.⁴⁷ (2016) in Prozent.

Tabelle 7: Übersicht der 18 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

Sonstige					
ST	Anzahl	Gesamtanteil	ST	Anzahl	Gesamtanteil
ST262	1,5 %	3	STNEW	1,5 %	3
ST721	1,5 %	3	ST1185	0,5 %	1
ST78	1,5 %	3	ST1186	0,5 %	1
ST925	1,5 %	3	ST769	0,5 %	1

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt.

Für 197 von 198 VREfm Isolaten konnte so ein bereits bekannter Complexotyp (CT) bestimmt werden, siehe Abbildung 32.

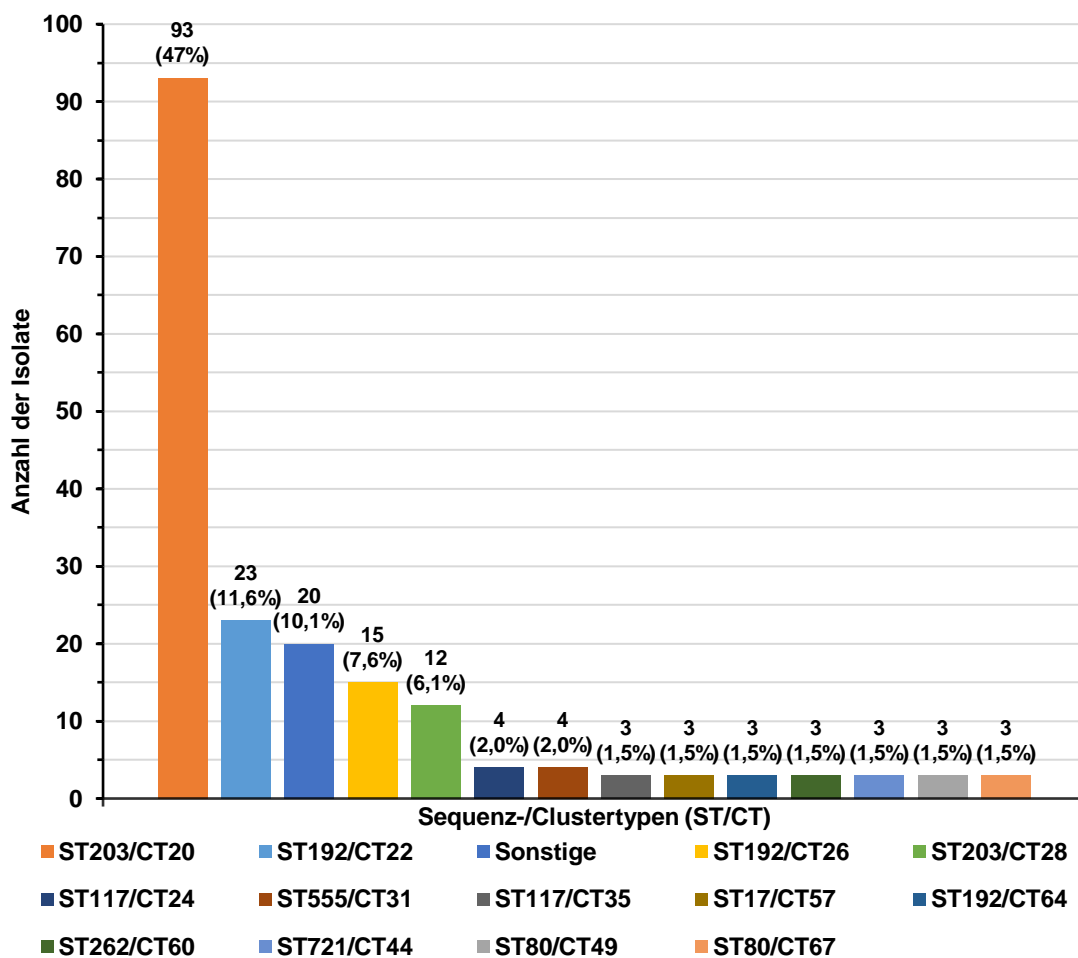


Abbildung 32: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=198, Probenjahre: 2013-2015) der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ (2016).

Von 198 Isolaten wurden 20 (10,1 %) in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen ST/CT Typen bei <1,5 % lag.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige unter Angabe des ST/CT Typs, der absoluten Anzahl und des prozentualen Anteils findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Übersicht der 198 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST117/CT30	2	1,0 %	ST17/CT29	1	0,5 %
ST192/CT3	2	1,0 %	ST203/CT39	1	0,5 %
ST78/CT55	2	1,0 %	ST203/CT56	1	0,5 %
ST80/CT16	2	1,0 %	ST203/CTNEW	1	0,5 %
ST925/CT61	2	1,0 %	ST769/CT25	1	0,5 %
STNEW/CT20	2	1,0 %	ST78/CT59	1	0,5 %
ST117/CT37	1	0,5 %	ST80/CT32	1	0,5 %
ST117/CT41	1	0,5 %	ST80/CT66	1	0,5 %
ST1185/CT43	1	0,5 %	ST925/CT65	1	0,5 %
ST1186/CT32	1	0,5 %	STNEW/CT25	1	0,5 %

Der ST203/CT20 (47 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexotypen ST192/CT22 mit 11,6 %, der ST192/CT26 mit 7,6 %, der ST203/CT28 mit 6,1 %, der ST117/CT24 mit 2,0 %, der ST555/CT31 mit 2,0 % und mit je 1,5 % der ST117/CT35, ST117/CT57, ST192/CT64, ST262/CT60, ST721/CT44, ST80/CT49 und ST80/CT67.

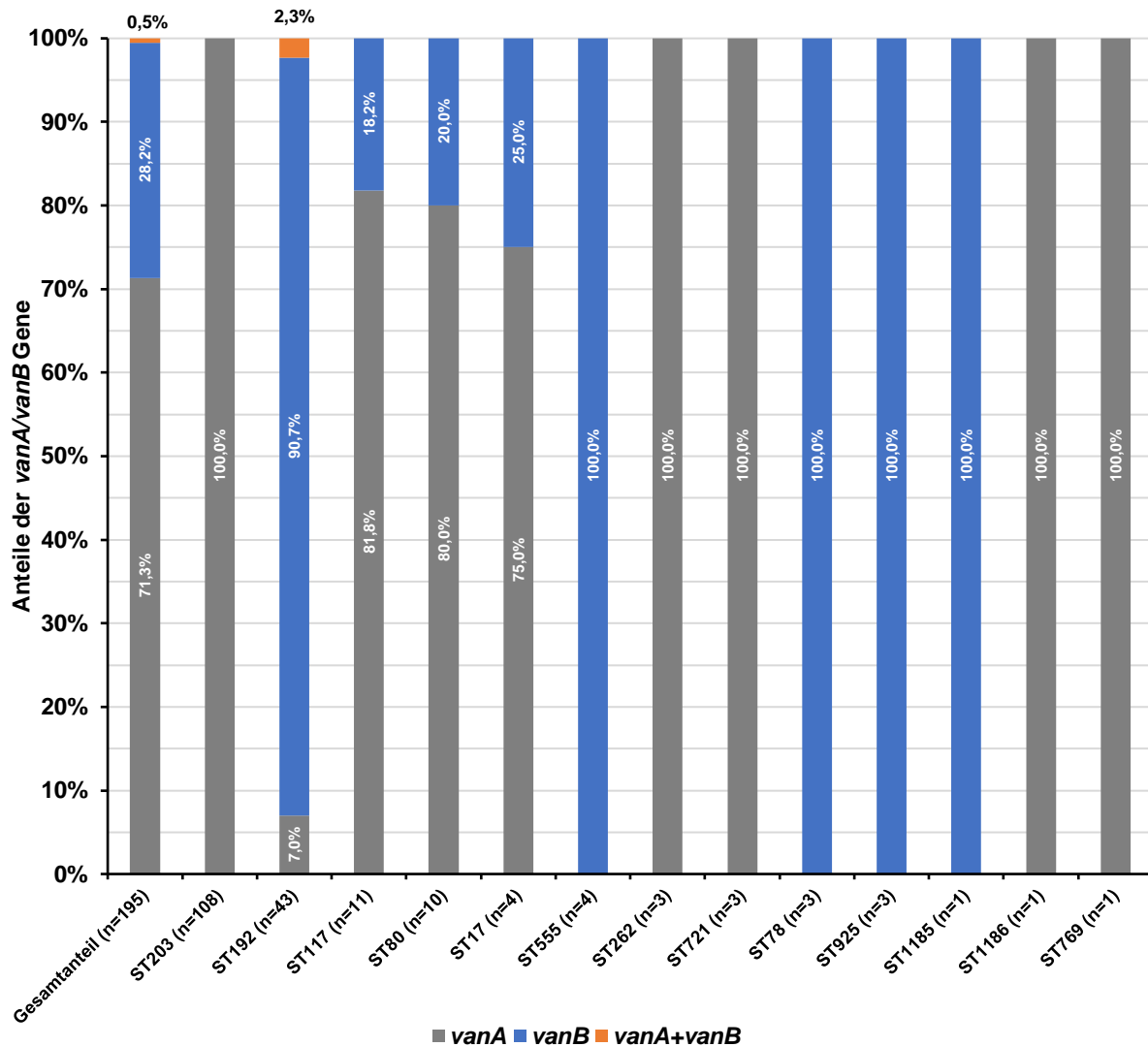


Abbildung 33: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ (2016). Die Isolate stammten aus den Jahren 2013-2015.

In 195 von 198 Isolaten (98,5 %) konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 33. Das *vanA* Gen wurde in 71,3 % der Isolate detektiert, das *vanB* Gen in 28,2 % aller Isolate. Lediglich 1 Isolat (0,5 %), der ST192, trug sowohl *vanA* als auch *vanB*. Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:0,4.

Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 33 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST).

Nur *vanA* trugen ST203, ST262, ST721, ST1186 und ST769. Dagegen trugen ST555, ST78, ST925, ST1185 nur *vanB*.

Für den häufigsten Sequenztyp (ST) dieser Arbeit, der ST192, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei Mellmann et al.⁴⁷ bei 1:13. 90,7 % der Isolate des ST192 trugen *vanB* und 7 % *vanA*.

4.2.2 Genotypisierung der 772 VREfm Isolate von Liese et al. (2019)

Von 772 VREfm Isolaten der Studie von Liese et al.²³ (2019), konnten 741 Isolate 27 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 34.

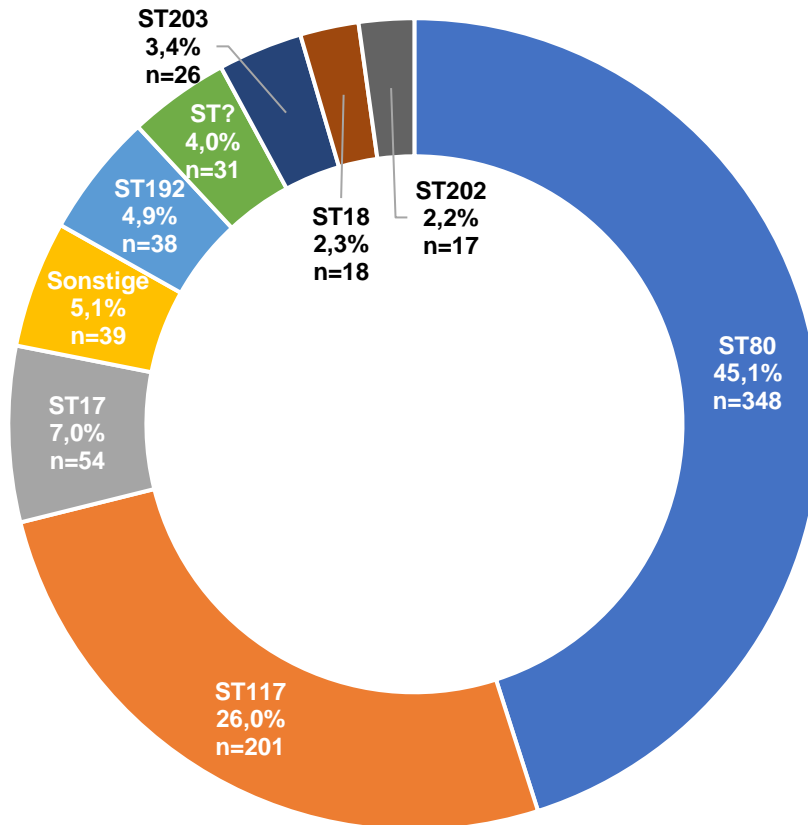


Abbildung 34: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=772, Probenjahre: 2010-2016) von Liese et al.²³ (2019) in Prozent.

Die Isolate stammten aus den Jahren 2010-2016. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen. Von 772 Isolaten wurden 39 in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen Sequenztypen (ST) bei <1 % lag.

In der Studie von Liese et al.²³ dominierte der ST80 (45,1 %), gefolgt vom ST117 (26 %) und in geringerer Anzahl auftretend die Sequenztypen ST17 (7,0 %) und ST192 (4,9 %).

Weiterhin konnten 31 Isolate (4,0 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige mit 39 Isolaten (5,1 %), findet sich in Tabelle 9 unter Angabe der Sequenztypen (ST), absoluten Anzahl und ihres Anteils.

Tabelle 9: Übersicht der 39 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Liese et al. unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

Sonstige								
ST	Anzahl	Gesamtanteil	ST	Anzahl	Gesamtanteil	ST	Anzahl	Gesamtanteil
ST925	7	0,9 %	ST64	2	0,3 %	ST612	1	0,1 %
ST132	5	0,6 %	ST104	1	0,1 %	ST721	1	0,1 %
ST78	4	0,5 %	ST1201	1	0,1 %	ST780	1	0,1 %
ST1595	3	0,4 %	ST1299	1	0,1 %	ST83	1	0,1 %
ST125	2	0,3 %	ST262	1	0,1 %	ST885	1	0,1 %
ST280	2	0,3 %	ST412	1	0,1 %	ST89	1	0,1 %
ST323	2	0,3 %	ST427	1	0,1 %			

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Liese et al.²³ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt. Für 762 von 772 VREfm-Isolaten konnte so ein bereits bekannter Complexotyp bestimmt werden, siehe Abbildung 35.

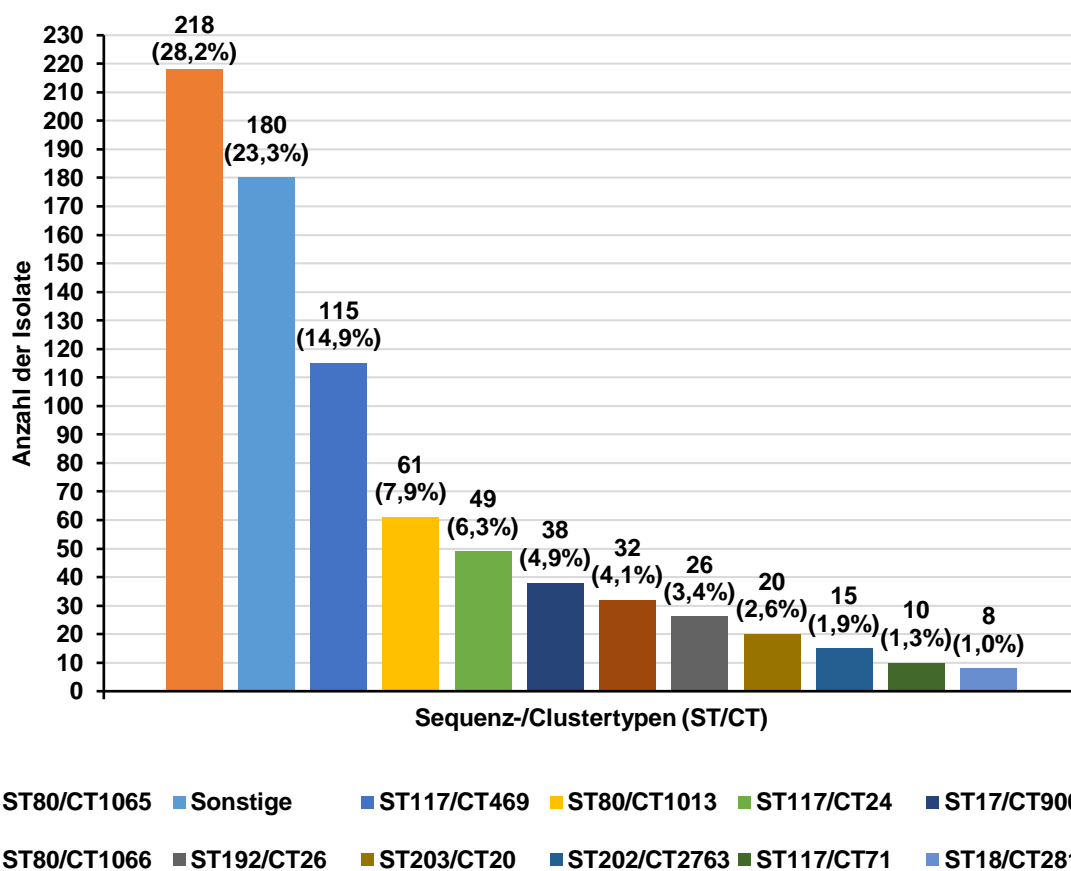


Abbildung 35: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=772, Probenjahre: 2010-2016) der Studie von Liese et al. (2019)²³.

Von 772 Isolaten wurden 180 (23,3 %) in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen ST/CT Typen bei <1 % lag.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige unter Angabe des Sequenztyps/Complexotyps (ST/CT), der absoluten Anzahl und des Anteils findet sich in Tabelle 24 im Anhang.

Der ST80/CT1065 (28,2 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexotypen ST117/CT469 mit 14,9 %, der ST80/CT1013 mit 7,9 %, der ST117/CT24 mit 6,3 %, der ST17/CT900 mit 4,9 %, der ST80/CT1066 mit 4,1 %, der ST192/CT26 mit 3,4 %, der ST203/CT20 mit 2,6 %, der ST202/CT2763 mit 1,9 %, der ST117/CT71 mit 1,3 % und letztlich der ST18/CT281 mit 1,0 %.

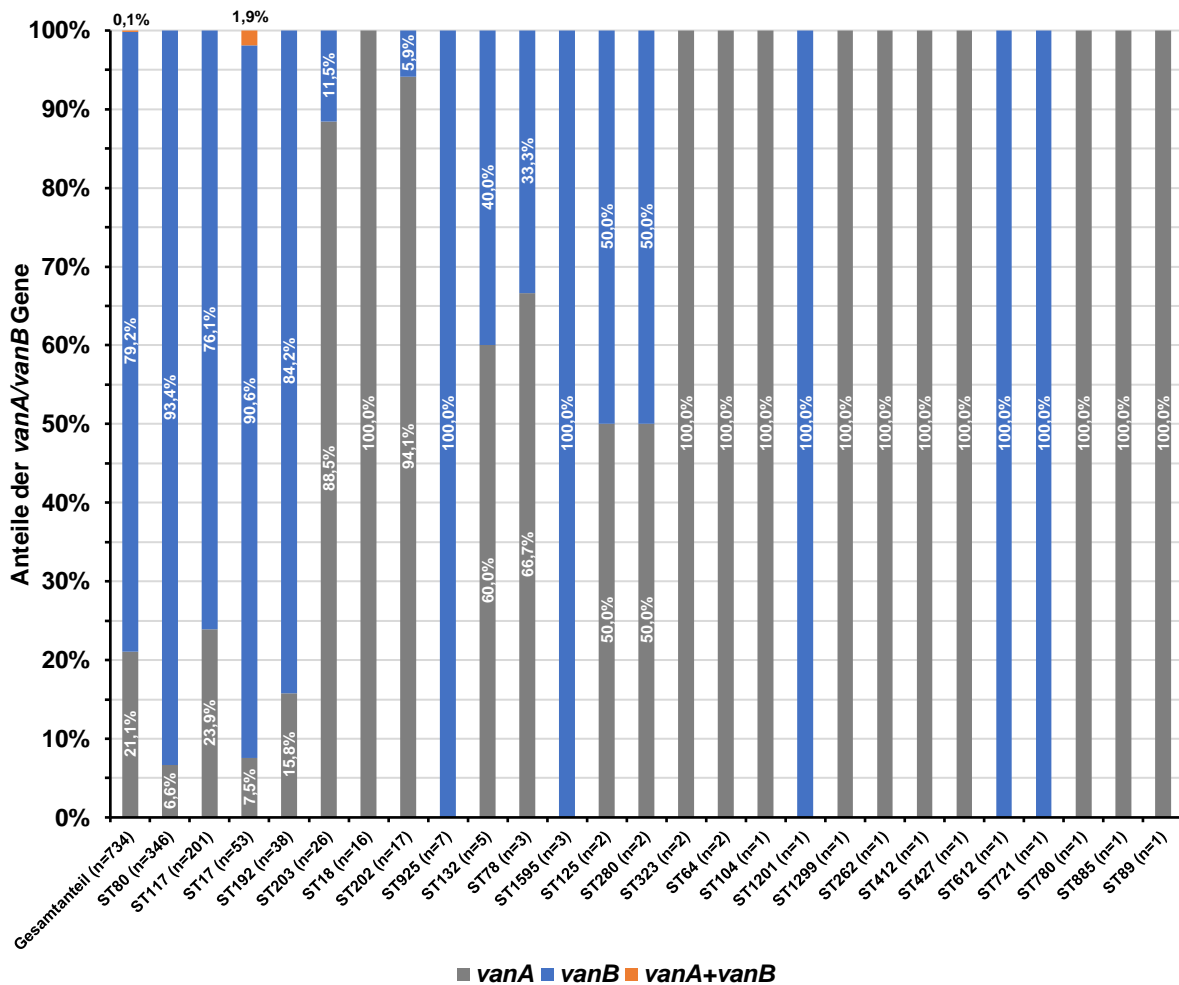


Abbildung 36: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) der Studie von Liese et al.²³ (2019). Die Isolate stammten aus den Jahren 2010-2016.

In 734 von 772 Isolaten (95,1%) konnten *van* Gene detektiert werden, siehe Abbildung 36. 79,2 % der Isolate trugen das *vanB* Gen und 21,1 % der Isolate das *vanA* Gen. Lediglich 1 Isolat (0,1 %), der ST17, trug sowohl das *vanA* als auch *vanB* Gen.

Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:3,8. Die *vanA/vanB* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 36 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST). Nur *vanA* trugen ST18, ST323, ST64, ST104, ST1299, ST262, ST412, ST427, ST780, ST885 und ST89. Dagegen trugen ST925, ST1595, ST1201, ST612 und ST721 nur *vanB*.

Für den häufigsten ST der Studie von Liese et al.²³, der ST80, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei 1:14. In 93,4 % der Isolate des ST80 wurde *vanB*, in 6,6 % *vanA* und bei 1 (0,1 %) Isolat sowohl *vanA* als auch *vanB* detektiert. Für den häufigsten Sequenztyp (ST) dieser Arbeit, der ST192, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei Liese et al.²³ bei 1:5,3. 84,2 % der Isolate des ST192 trugen *vanB* und 15,8 % *vanA*.

4.2.3 Genotypisierung der 42 VREfm Isolate von Eichel et al. (2020)

Von 42 VREfm Isolaten der Studie von Eichel et al.²⁷ (2020), konnten 41 Isolate 4 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 37.

Die Isolate stammten aus dem Jahr 2016. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen. In der Studie von Eichel et al.²⁷ dominierte der ST117 (73,8 %), gefolgt vom ST80 (16,7 %) und in geringerer Anzahl auftretend die Sequenztypen ST262 (4,8 %) und ST1352 (2,4 %). Weiterhin konnte 1 Isolat (2,4 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

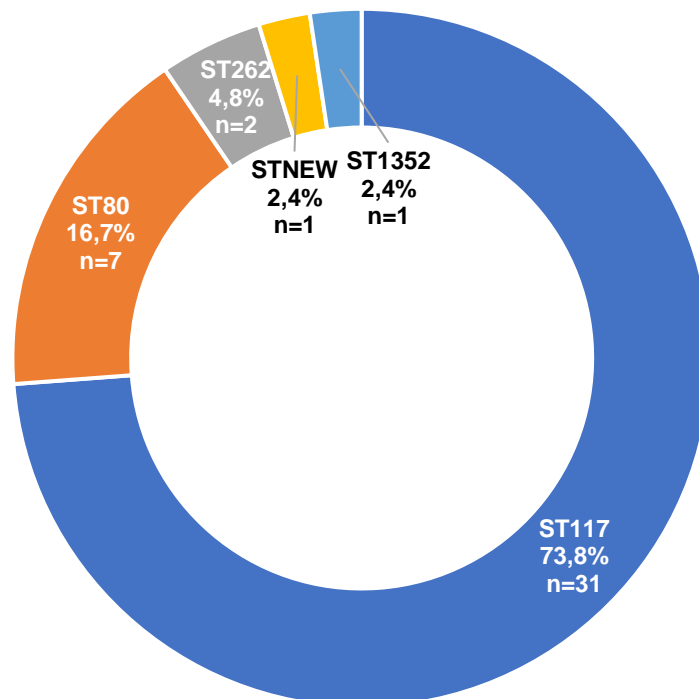


Abbildung 37: Gesamtanteile der (ST) Sequenztypen der Isolate (n=42, Probenjahr: 2016) von Eichel et al.²⁷ (2020) in Prozent.

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Eichel et al.²⁷ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt.

Für alle 42 VREfm Isolate konnte so ein bereits bekannter CT bestimmt werden, siehe Abbildung 38.

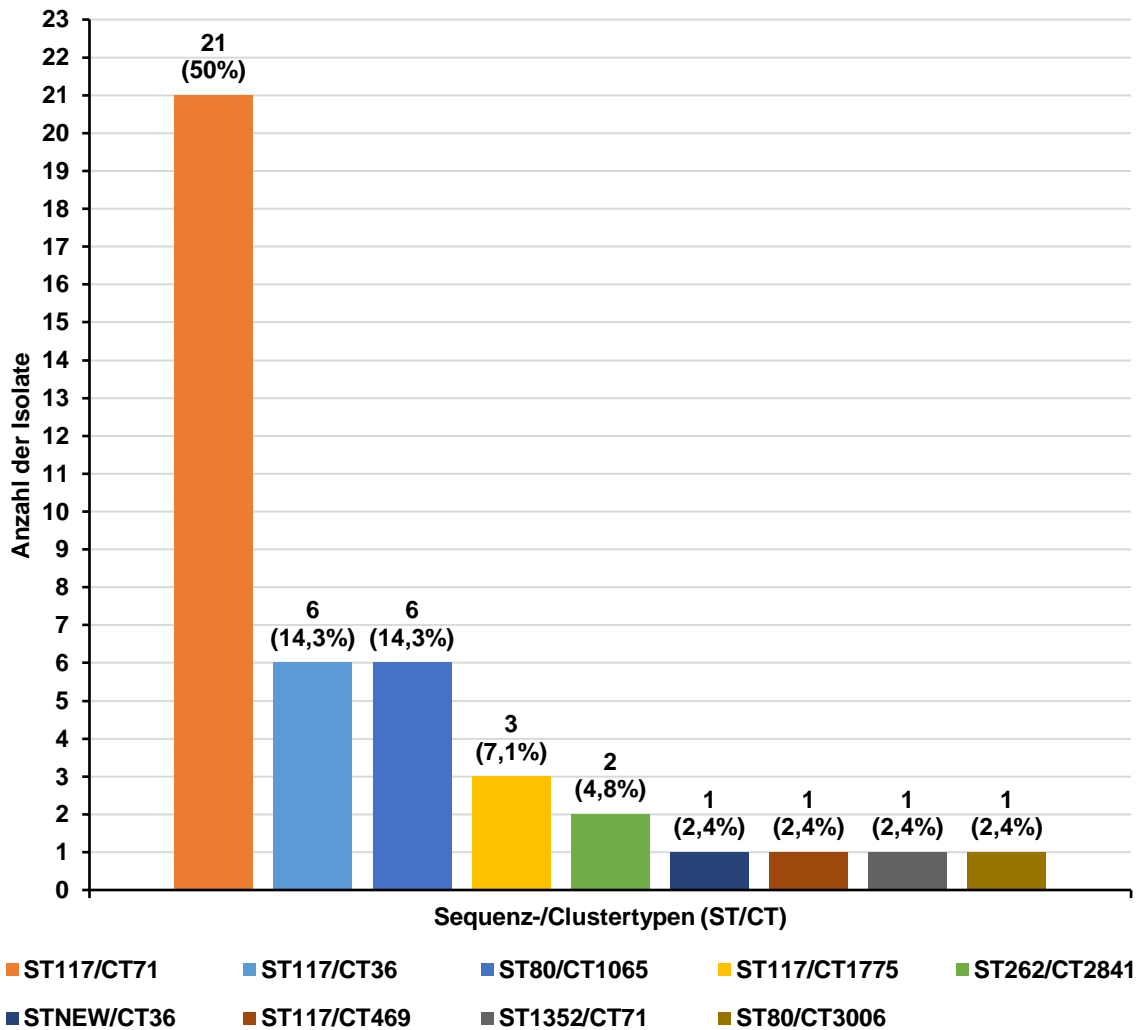


Abbildung 38: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=42, Probenjahr: 2016) der Studie von Eichel et al.²⁷ (2020).

Der ST117/CT171 (50 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexotypen ST117/CT36 und ST80/CT1065 mit je 14,3 %, der ST117/CT1775 mit 7,1 %, der ST262/CT2841 mit 4,8 % und mit je 2,4 % der STNEW/CT36, ST117/CT469, ST1352/CT71 und ST80/CT3006.

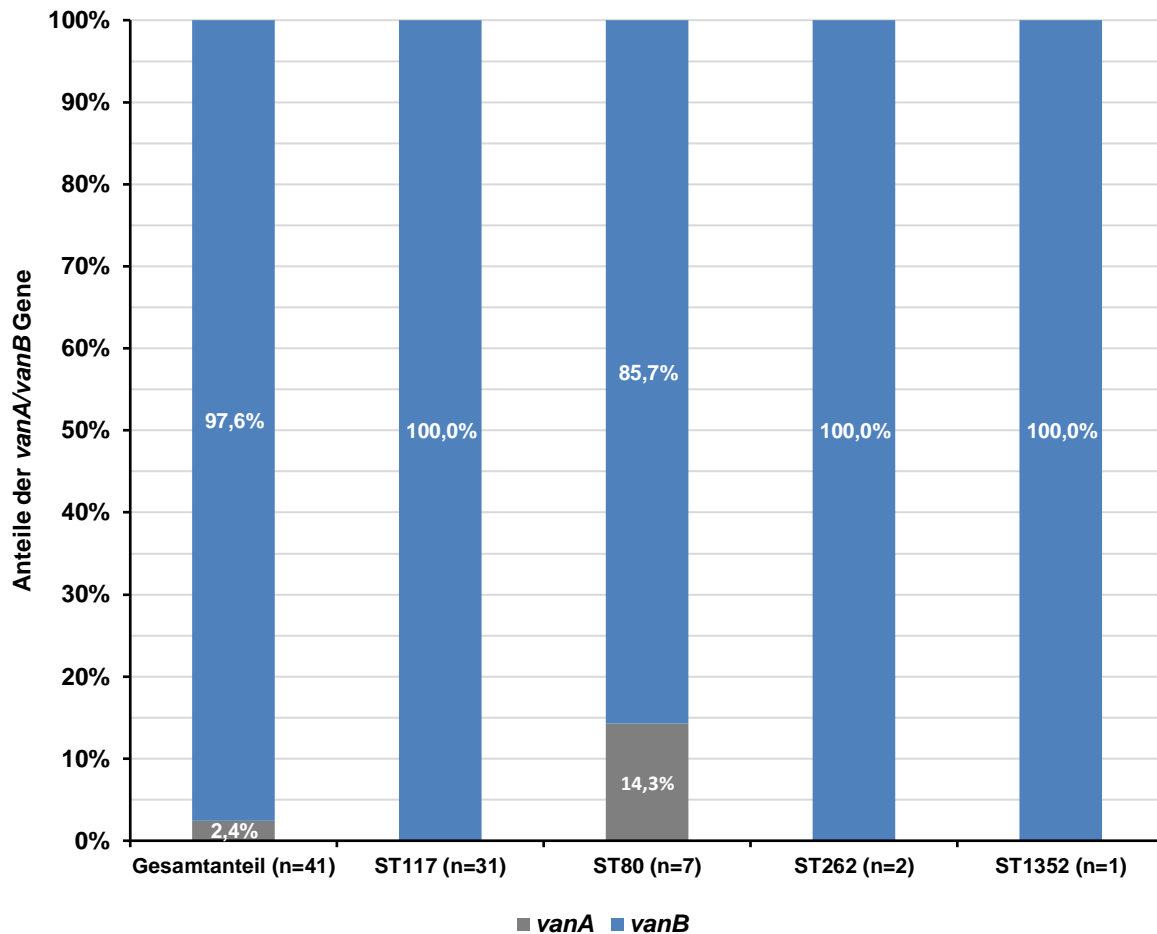


Abbildung 39: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den (ST) Sequenztypen der Studie von Eichel et al. (2020). Die Isolate stammten aus dem Jahr 2016.

In 41 von 42 Isolaten konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 39.

Das *vanA* Gen wurde in 2,4 % der Isolate detektiert, das *vanB* Gen in 97,6 % aller Isolate.

Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:40. Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 39 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST). Nur *vanB* trugen ST262 und ST1352.

Im Falle des häufigsten ST der Studie von Eichel et al.²⁷, ST117, trugen ebenso alle Isolate *vanB*. In der Studie trug lediglich 1 Isolat des ST80 (14,3 %) das *vanA* Gen.

4.2.4 Genotypisierung der 111 VREfm Isolate von Neumann et al. (2020)

Von 111 VREfm Isolaten der Studie von Neumann et al.²⁶ (2020), konnten alle Isolate 12 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe Abbildung 40.

Die Isolate stammten aus den Jahren 2014-2015. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen.

Von 111 Isolaten wurden 9 in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen Sequenztypen (ST) bei <1 % lag.

In der Studie von Neumann et al.²⁶ dominierte der ST117 (74,8 %), gefolgt vom ST192 (9,9 %) und in geringerer Anzahl auftretend die Sequenztypen ST80 (5,4 %) und ST564 (1,8 %).

Weiterhin konnte 1 Isolat (0,9 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

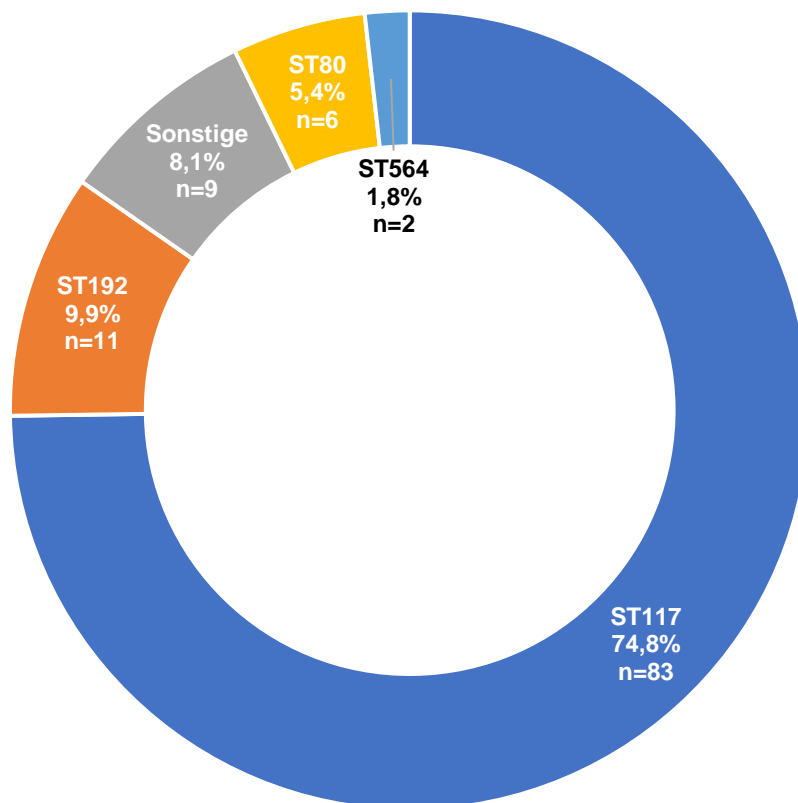


Abbildung 40: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=111, Probenjahre: 2014-2015) von Neumann et al.²⁶ (2020) in Prozent.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige mit 9 Isolaten (8,1 %), findet sich in Tabelle 10 unter Angabe der ST, ihrer absoluten Anzahl und ihres Anteils.

Tabelle 10: Übersicht der 9 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Neumann et al. unter Angabe der (ST) Sequenztypen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

Sonstige					
ST	Anzahl	Gesamtanteil	ST	Anzahl	Gesamtanteil
ST17	0,9 %	1	ST78	0,9 %	1
ST18	0,9 %	1	ST780	0,9 %	1
ST203	0,9 %	1	ST89	0,9 %	1
ST280	0,9 %	1	STNEW	0,9 %	1
ST6	0,9 %	1			

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Neumann et al.²⁶ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt.

Für alle 111 VREfm Isolate konnte so ein bereits bekannter CT bestimmt werden, siehe Abbildung 41.

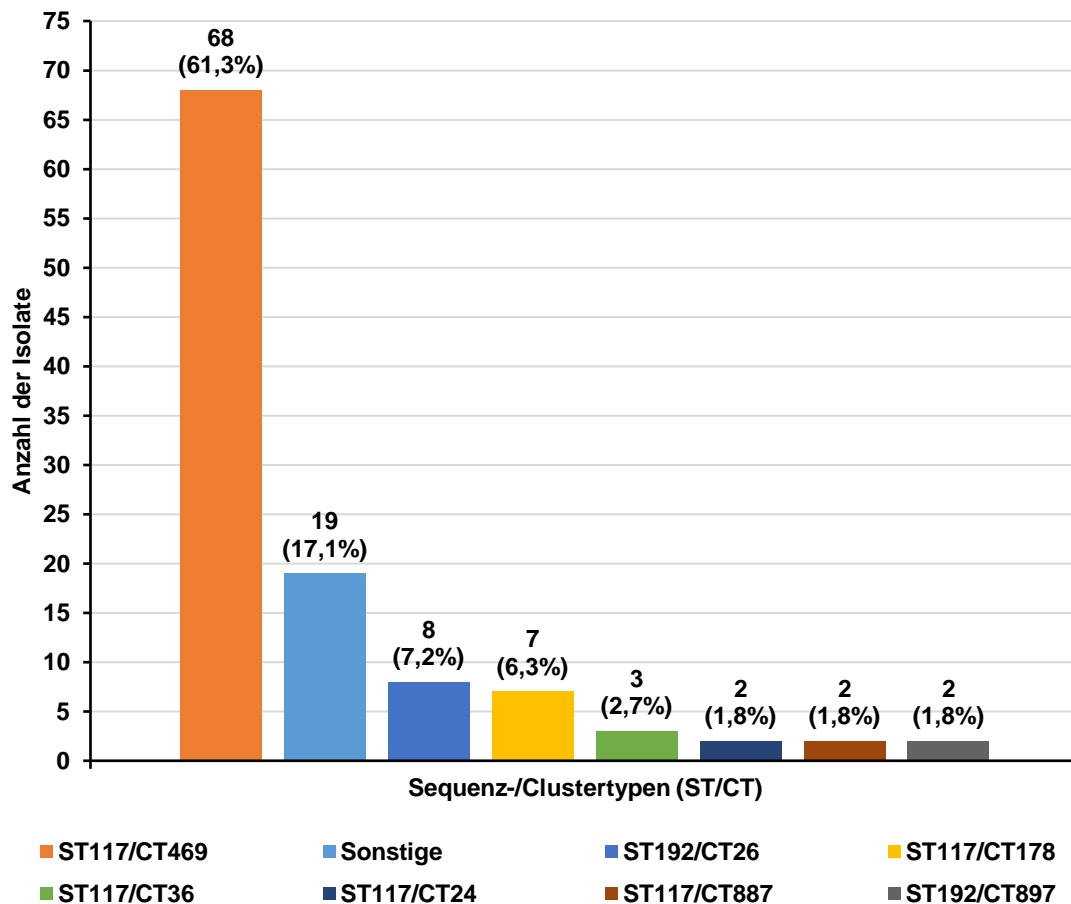


Abbildung 41: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=111, Probenjahre: 2014-2015) der Studie von Neumann et al.²⁶ (2020).

Von 111 Isolaten wurden 19 (17,1 %) in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen ST/CT Typen bei <1 % lag.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige unter Angabe des Sequenztyps/Complexotyps (ST/CT), der absoluten Anzahl und des Anteils findet sich in Tabelle 11.

Tabelle 11: Übersicht zu Kapitel 4.8.4 der 111 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Neumann et al. unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST117/CT895	1	0,9 %	ST80/CT896	1	0,9 %
ST17/CT900	1	0,9 %	ST80/CT315	1	0,9 %
ST18/CT253	1	0,9 %	ST80/CT847	1	0,9 %
ST192/CT3	1	0,9 %	ST80/CT888	1	0,9 %
ST203/CT39	1	0,9 %	ST80/CT890	1	0,9 %
ST280/CT893	1	0,9 %	ST80/CT891	1	0,9 %
ST564/CT901	1	0,9 %	ST80/CT899	1	0,9 %
ST564/CT898	1	0,9 %	ST89/CT301	1	0,9 %
ST6/CT889	1	0,9 %	STNEW/CT892	1	0,9 %
ST78/CT894	1	0,9 %			

Der ST117/CT469 (61,3 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexotypen ST192/CT26 mit 7,2 %, der ST117/CT178 mit 6,3 %, der ST117/CT36 mit 2,7 % und mit je 1,8 % der ST117/CT24, ST117/CT887 und ST192/CT897.

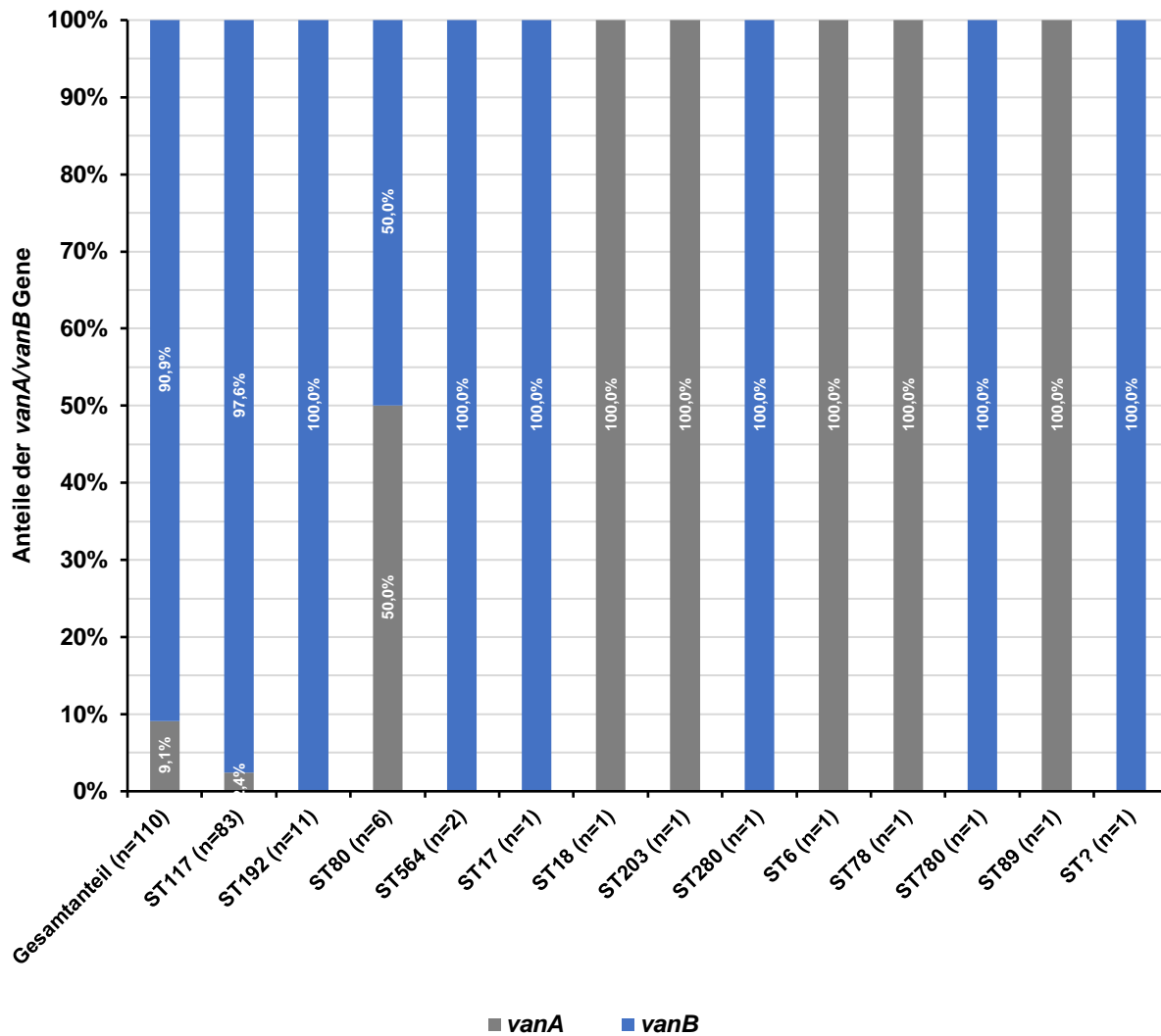


Abbildung 42: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den (ST) Sequenztypen der Studie von Neumann et al.²⁶ (2020). Die Isolate stammten aus dem Jahr 2014-2015.

In 110 von 111 Isolaten (99,1 %) konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 42. Das *vanA* Gen wurde in 9,1 % der Isolate detektiert und das *vanB* Gen in 90,9 % aller Isolate.

Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:10. Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 42 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST).

Nur *vanA* trugen ST18, ST203, ST6, ST78 und ST89. Dagegen trugen nur *vanB* ST192, ST564, ST17, ST280, ST780 und STNEW.

Für den häufigsten ST der Studie von Neumann et al.²⁶, der ST117, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei 1:40,5. 97,6 % der Isolate des ST117 trugen *vanB* und 2,4 % *vanA*.

Für den häufigsten Sequenztyp dieser Arbeit, ST192, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei Neumann et al.²⁶ bei 0:1. Von 11 Isolaten des ST192 trugen alle *vanB*.

4.2.5 Genotypisierung der 97 VREfm Isolate von Eisenberger et al. (2020)

Von 97 VREfm Isolaten der Studie von Eisenberger et al.²⁸ (2020), konnten 94 Isolate 5 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 43. Die Isolate stammten aus den Jahren 2018-2019. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen.

In der Studie von Eisenberger et al.²⁸ dominierte der ST80 (55,7 %), gefolgt vom ST117 (20,6 %) und ST78 (18,6 %) und je einmal auftretend die Sequenztypen ST552 (1,0 %) und ST612 (1,0 %).

Weiterhin konnten 3 Isolate (3,1 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp zugeordnet werden.

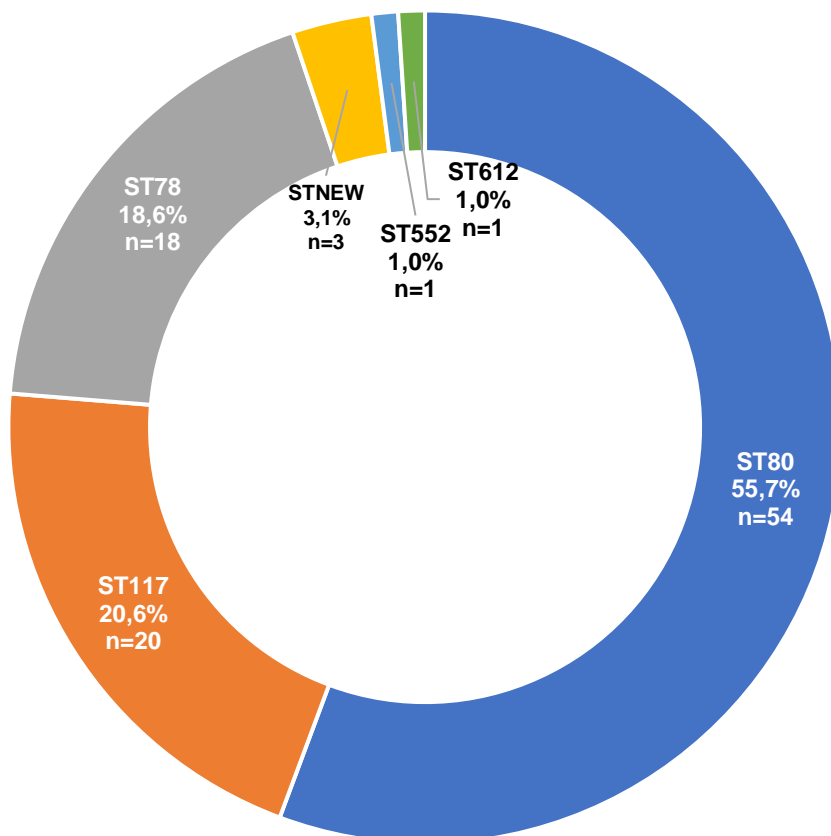


Abbildung 43: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=97, Probenjahre: 2018-2019) von Eisenberger et al.²⁸ (2020) in Prozent.

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Eisenberger et al.²⁸ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt. Für 96 VREfm Isolate konnte so ein bereits bekannter Complexotyp (CT) bestimmt werden, siehe Abbildung 44.

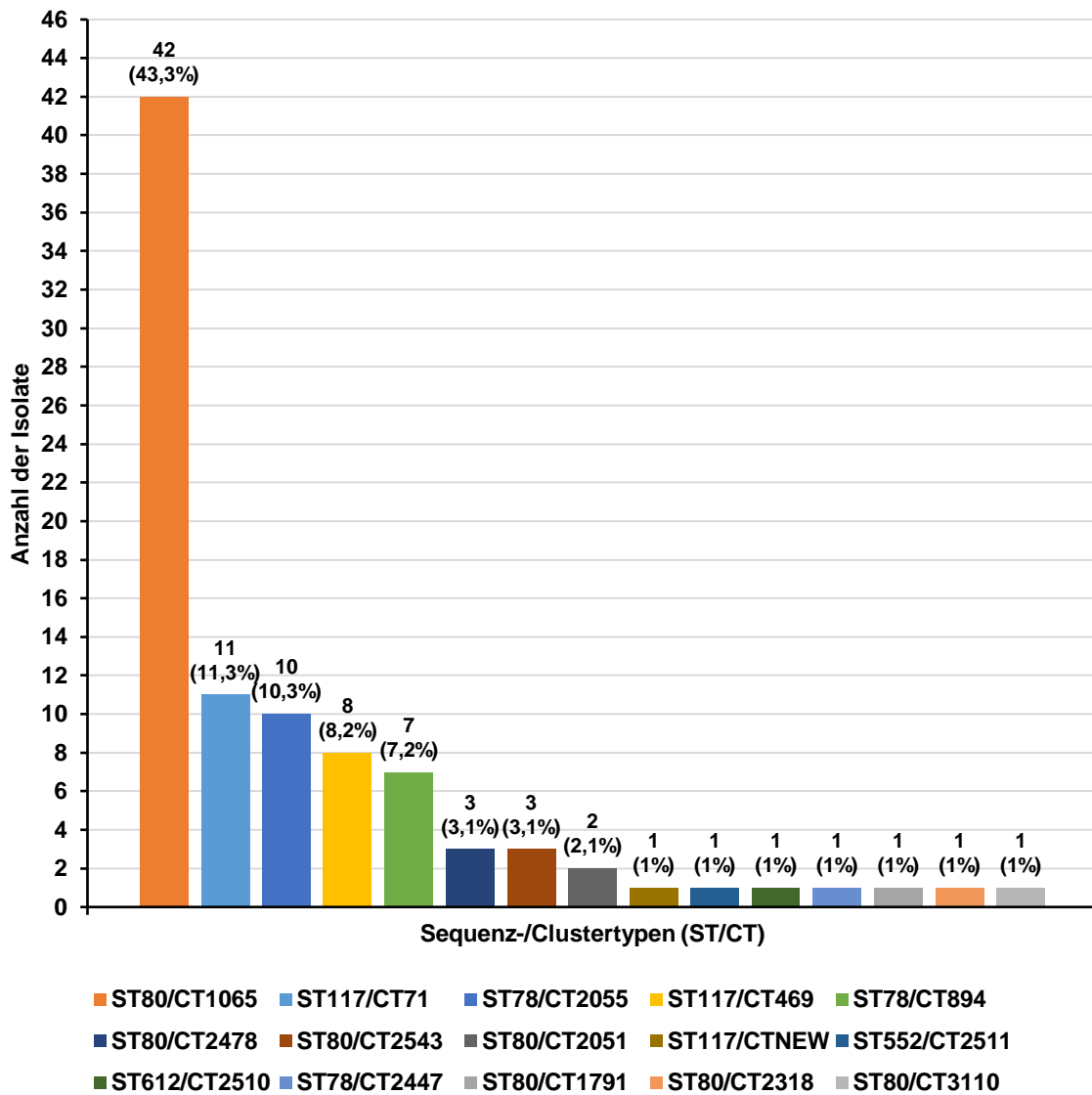


Abbildung 44: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=97, Probenjahre: 2018-2019) der Studie von Eisenberger et al.²⁸ (2020).

Der ST80/CT1065 (43,3 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexypen ST117/CT71 mit 11,3 %, der ST78/CT2055 mit 10,3 %, der ST117/CT469 mit 8,2 %, der ST78/CT894 mit 7,2 %, mit je 3,1 % der ST80/CT2478 und der ST80/CT2543, der ST80/CT2051 mit 2,1 % und mit je 1 % der ST117/CTNEW, ST552/CT2511, ST612/CT2510, ST78/CT2447, ST80/CT1791, ST80/CT2318 und ST80/CT3110.

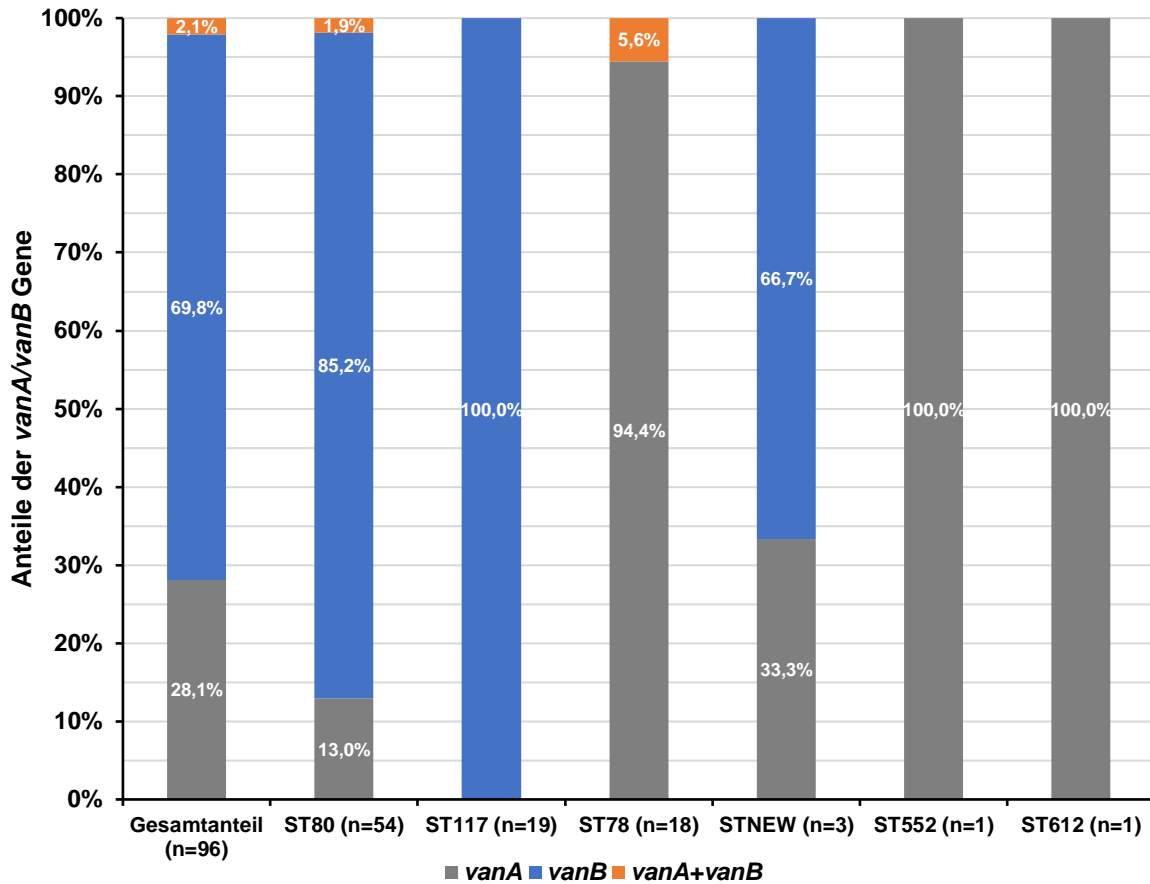


Abbildung 45: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den (ST) Sequenztypen der Studie von Eisenberger et al.²⁸ (2020). Die Isolate stammten aus den Jahren 2018-2019.

In 96 von 97 Isolaten (99 %) konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 45. Das *vanA* Gen wurde in 28,1 % der Isolate detektiert, das *vanB* Gen in 69,8 % aller Isolate. Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:2,5.

Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 45 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST). Nur *vanA* trugen ST552 und ST612. Dagegen trug ausschließlich ST117 nur *vanB*.

Für den häufigsten ST der Studie von Eisenberger et al.²⁸, der ST80, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei 1:6,6. 13,0 % der Isolate des ST80 trugen *vanB* und 85,2% *vanA*. 1 Isolat (1,8%) trug sowohl *vanA* als auch *vanB*.

4.2.6 Genotypisierung der 94 VREfm Isolate von Falgenhauer et al. (2019)

Von 94 VREfm Isolaten der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019), konnten alle Isolate 5 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 46. Die Isolate stammten aus den Jahren 2017-2018. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen.

In der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019) dominierte der ST117 (94,7 %), mit großem Abstand gefolgt vom ST80 (2,1 %) und nur je einmal (je 1,1 %) auftretend die Sequenztypen ST1428, ST192 und ST262.

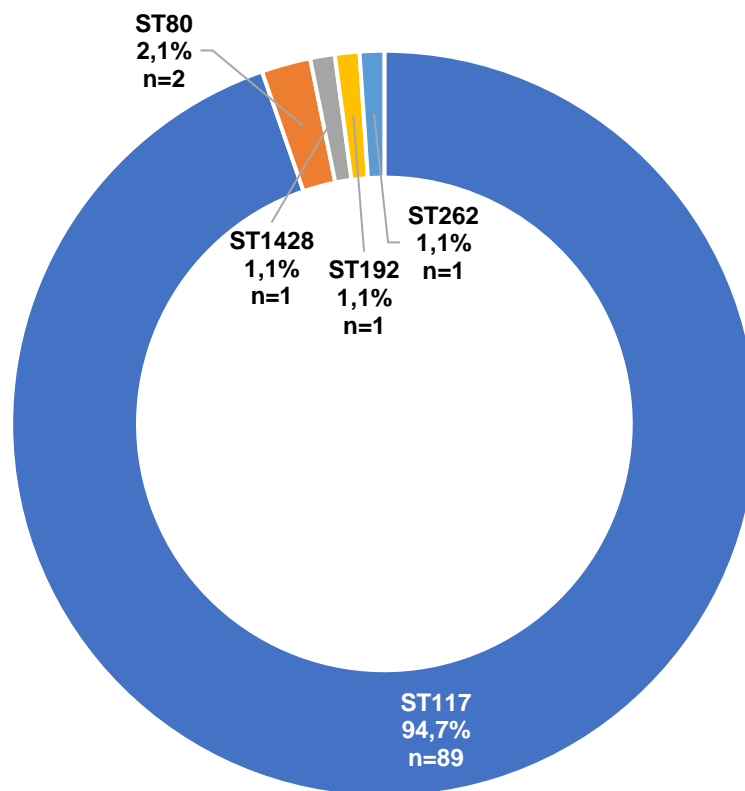


Abbildung 46: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=94, Probenjahre: 2017-2018) von Falgenhauer et al.²² (2019) in Prozent.

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019) der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt. Für alle 94 VREfm Isolate konnte so ein bereits bekannter Complexotyp (CT) bestimmt werden, siehe Abbildung 47.

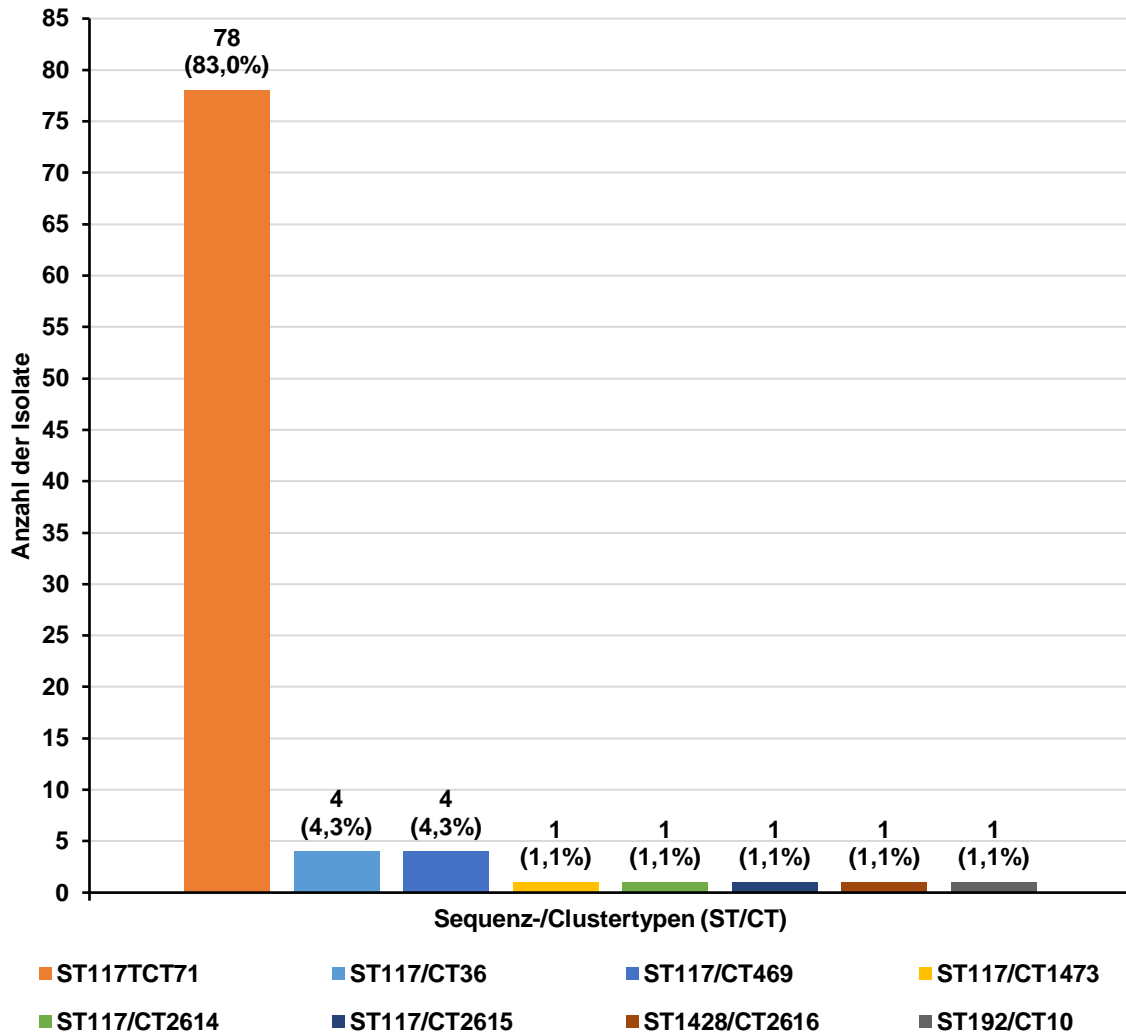


Abbildung 47: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=94, Probenjahre: 2017-2018) der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019).

Der ST117/CT71 (83 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexypen ST117/CT36 und ST117/CT469 mit je 4,3 % und je einmal auftretend der ST117/CT1473, ST117/CT2614, ST117/CT2615, ST1428/CT2616 und ST192/CT10 mit je 1,1 %

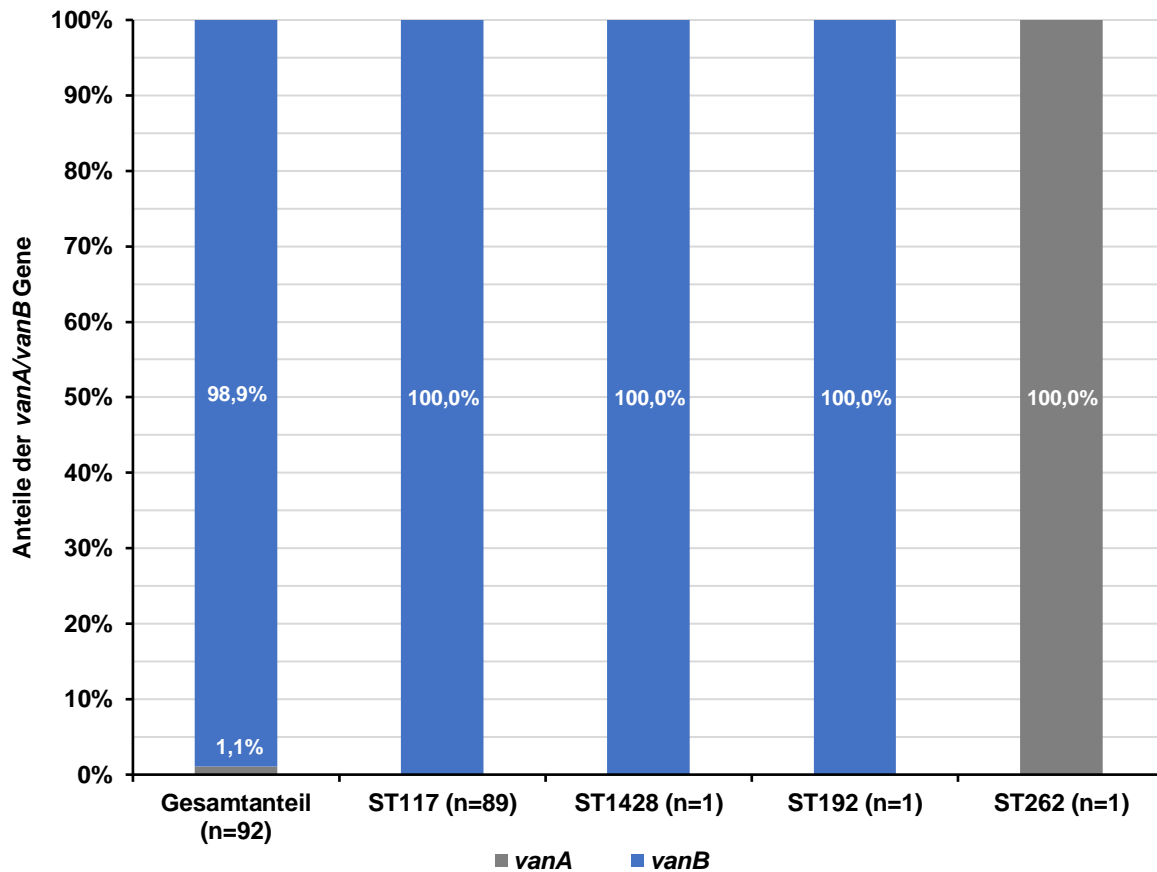


Abbildung 48: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019). Die Isolate stammten aus den Jahren 2017-2018.

In 92 von 94 Isolaten (97,9 %) konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 48. Das *vanA* Gen wurde lediglich bei 1,1 % der Isolate detektiert, das *vanB* Gen in 98,9 % aller Isolate.

Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:91. Die *van* Gen Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 48 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST). Ausschließlich der ST262 trug nur *vanA*, dagegen trugen der ST117, ST1428 und ST192 nur *vanB*.

Im Falle des häufigsten ST der Studie von Falgenhauer et al.²² (2019), ST117, lies sich für alle Isolate das *vanB* Gen detektieren. Der häufigste Sequenztyp (ST) dieser Arbeit, ST192, trat lediglich einmal in Erscheinung und trug *vanB*.

4.2.7 Genotypisierung der 55 VREfm Isolate von Falgenhauer et al. (2021)

Von 55 VREfm Isolate der Studie von Falgenhauer et al.²⁹ (2021), konnten 54 Isolate 3 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 49. Die Isolate stammten aus den Jahren 2016-2018. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen.

In der Studie von Falgenhauer et al.²⁹ dominierte der ST117 (92,7 %), mit größerem Abstand gefolgt vom ST18 (3,6 %) und nur einmal auftretend der Sequenztyp ST262 (1,8 %). Weiterhin konnte 1 Isolat (1,8 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

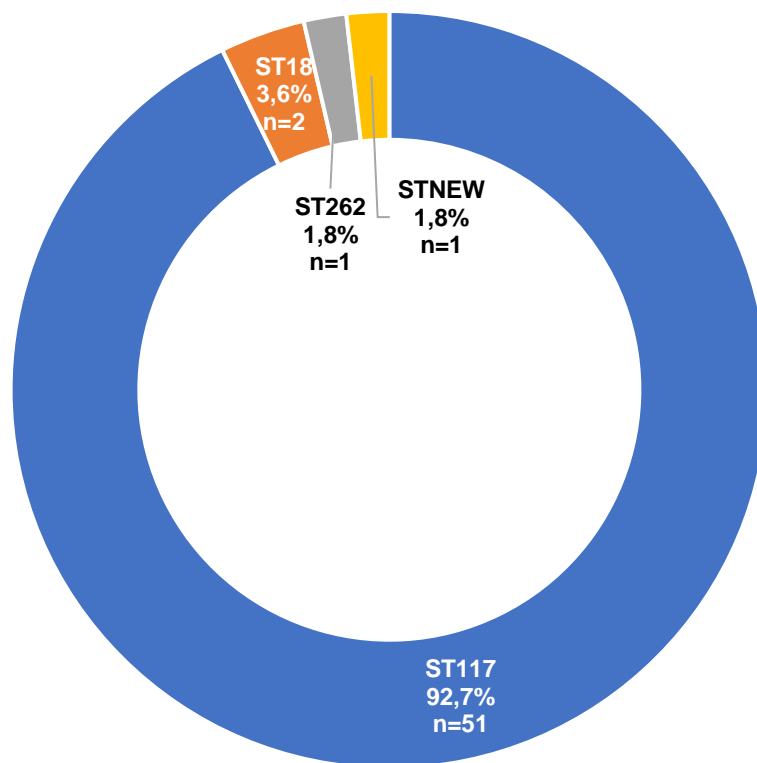


Abbildung 49: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=55, Probenjahre: 2016-2018) von Falgenhauer et al.²⁹ (2021) in Prozent.

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Falgenhauer et al.²⁹ (2021) der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt, dies erfolgte unter Berücksichtigung von 1423 Genen. Für 49 von 55 VREfm Isolaten konnte so ein bereits bekannter Complexotyp (CT) bestimmt werden, siehe Abbildung 50.

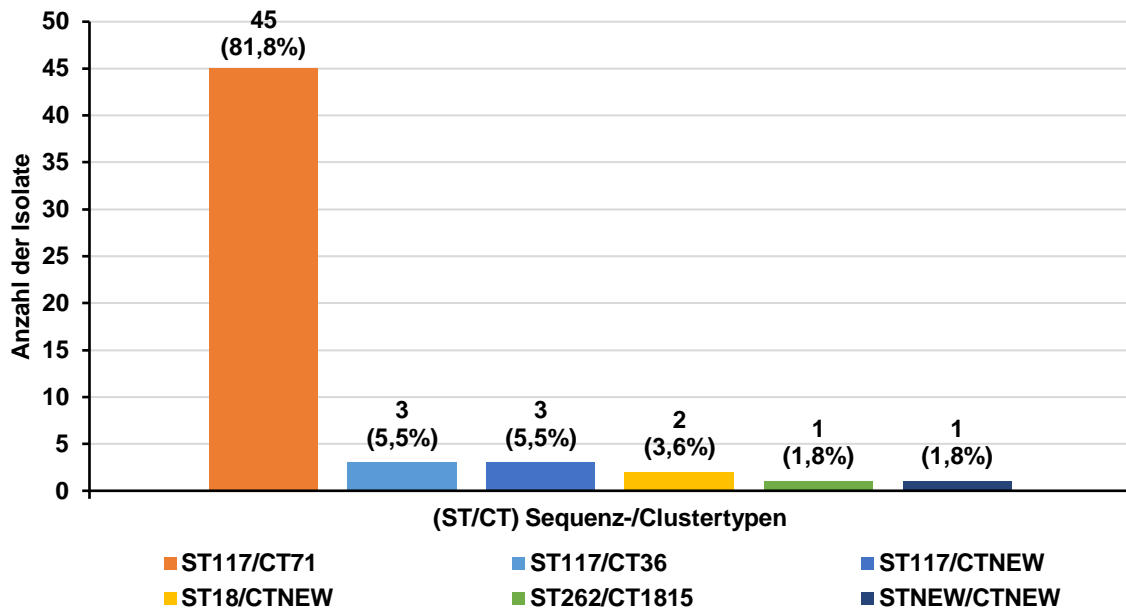


Abbildung 50: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=55, Probenjahre: 2016-2018) der Studie von Falgenhauer et al.²⁹ (2021).

Der ST117/CT71 (81,8 %) hatte den größten Anteil an allen Isolaten bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexypen ST117/CT36 und der ST117/CTNEW mit je 5,5 %, der ST18/CTNEW mit 3,6 % und je einmal der ST262/CT1815 und STNEW/CTNEW mit je 1,8 %.

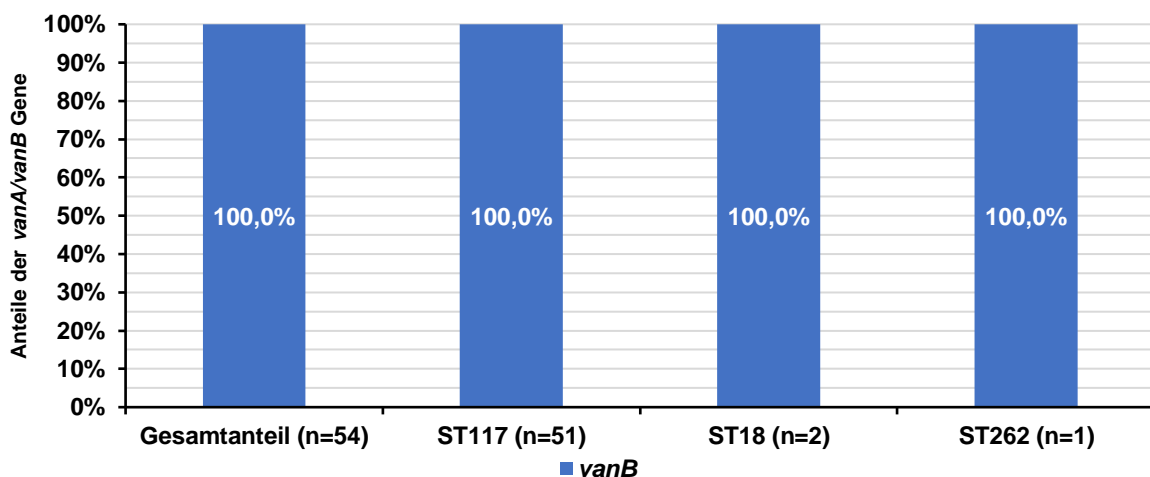


Abbildung 51: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) der Studie von Falgenhauer et al.²⁹ (2021). Die Isolate stammten aus den Jahren 2016-2018.

In 54 von 55 Isolaten konnten *van* Gene bestimmt werden, davon trugen alle das *vanB* Gen, siehe Abbildung 51.

4.2.8 Genotypisierung der 636 VREfm Isolate von Xanthopoulou et al. (2020)

Von 636 VREfm Isolaten der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ (2020), konnten 631 Isolate 30 bereits bekannten Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, siehe hierzu Abbildung 52. Die Isolate stammten aus den Jahren 2014-2018. Die Typisierung erfolgte mittels MLST-Schema für *E. faecium* nach Homan et al.⁴⁰ unter Berücksichtigung von 7 Haushaltsgenen. Von 636 Isolaten wurden 37 in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen Sequenztypen (ST) bei <1 % lag.

In der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ dominierte der ST117 (50,5 %), gefolgt vom ST80 (19,7 %) und in geringerer Anzahl auftretend die Sequenztypen ST203 (8,0 %), ST78 (4,6 %), ST17 (3,3 %), ST262 (2,8 %), ST192 (1,6 %), ST18 (1,4 %), ST323 (1,3 %) und ST721 (1,1 %). Weiterhin konnten 5 Isolate (0,8 %) nicht einem bereits bekannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden.

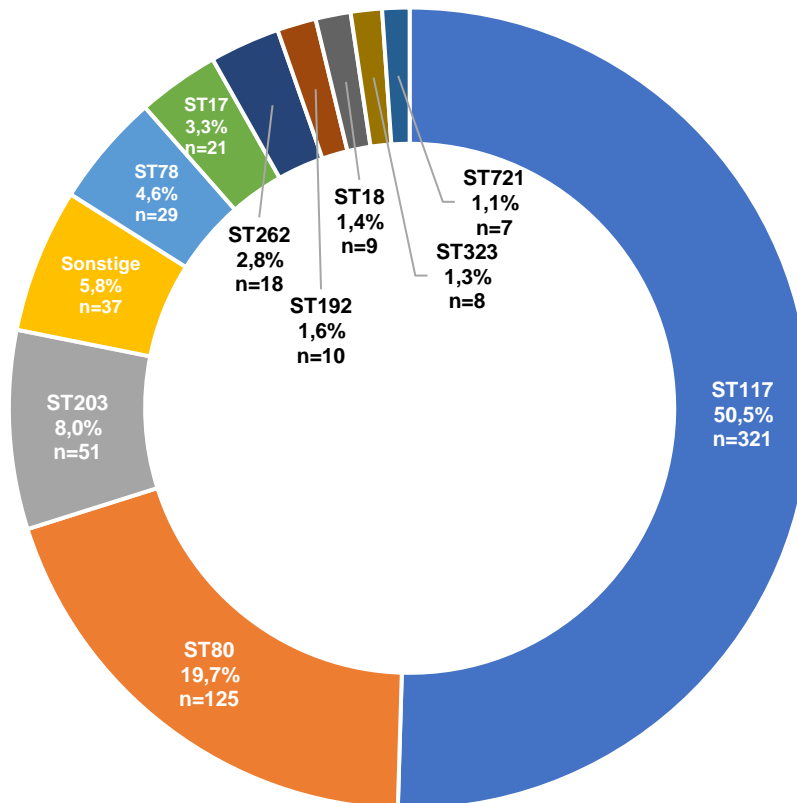


Abbildung 52: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=636, Probenjahre: 2014-2018) von Xanthopoulou et al.²⁵ (2020) in Prozent.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige mit 37 Isolaten (5,8 %), findet sich in Tabelle 12 unter Angabe der Sequenztypen (ST), ihrer absoluten Anzahl und ihres Anteils.

Tabelle 12: Übersicht der 37 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

Sonstige					
ST	Anzahl	Gesamtanteil	ST	Anzahl	Gesamtanteil
ST1595	0,9 %	6	ST2363	0,2 %	1
ST612	0,8 %	5	ST253	0,2 %	1
STNEW	0,8 %	5	ST280	0,2 %	1
ST1478	0,3 %	2	ST296	0,2 %	1
ST32	0,3 %	2	ST329	0,2 %	1
ST361	0,3 %	2	ST5	0,2 %	1
ST1055	0,2 %	1	ST535	0,2 %	1
ST1186	0,2 %	1	ST56	0,2 %	1
ST1489	0,2 %	1	ST89	0,2 %	1
ST154	0,2 %	1	ST992	0,2 %	1
ST2170	0,2 %	1			

Zur genaueren Auflösung und als Bedingung für die komparative phylogenetische Analyse, wurden alle Isolate der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ der cgMLST basierten Typisierung für *E. faecium* nach de Been⁴¹ zugeführt.

Für 629 von 636 VREfm Isolaten konnte so ein bereits bekannter Complexotyp (CT) bestimmt werden, siehe Abbildung 52. Von 636 Isolaten wurden 293 (46,1 %) in der Gruppe Sonstige subsummiert, da ihr jeweiliger Anteil an allen aufgetretenen ST/CT Typen bei <1 % lag.

Die genaue Aufschlüsselung der Gruppe Sonstige unter Angabe des Sequenztyps/Complexotyps (ST/CT), der absoluten Anzahl und des Anteils findet sich in Tabelle 25 im Anhang.

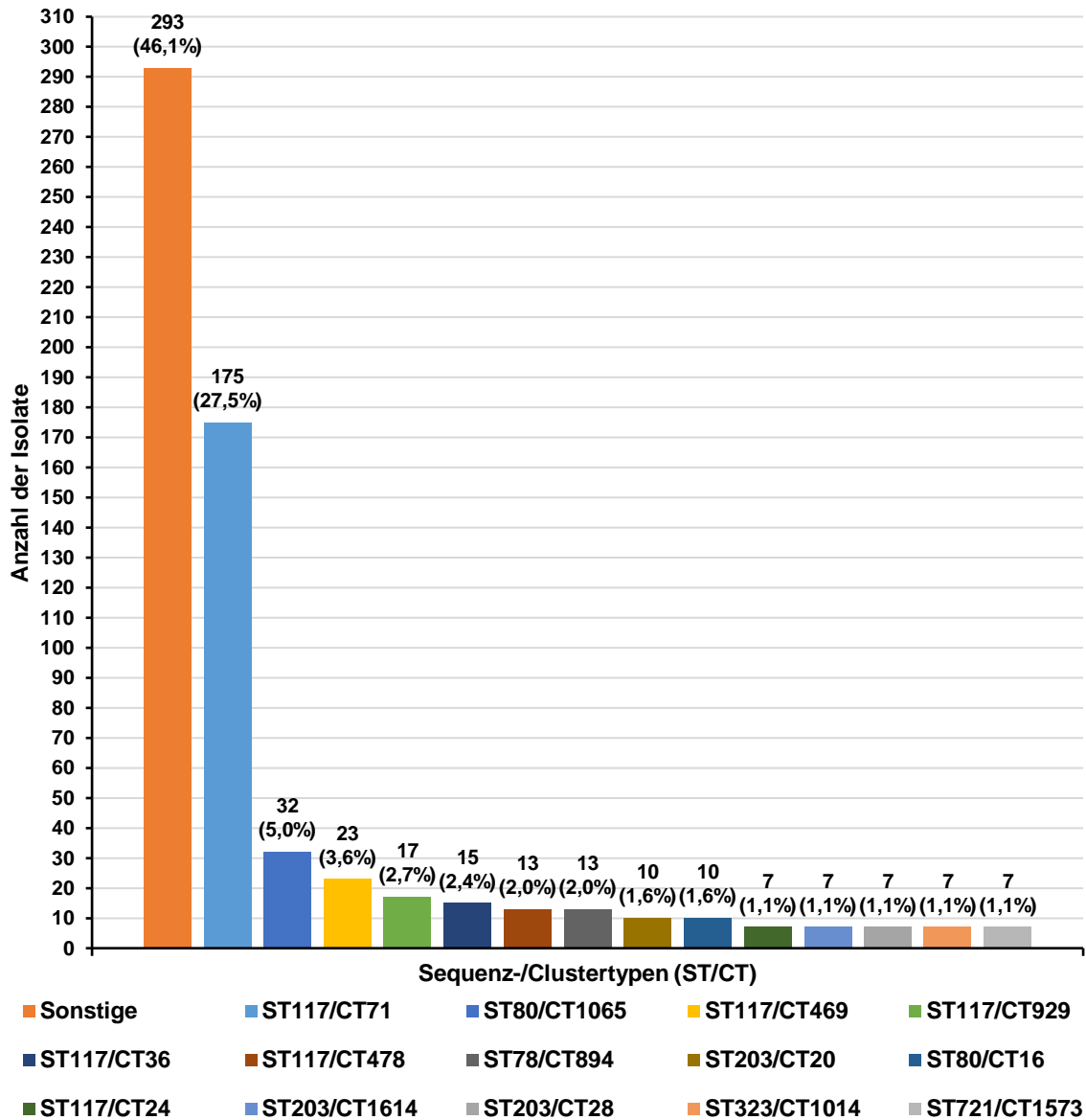


Abbildung 53: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=636, Probenjahre: 2014-2018) der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ (2020).

Der ST117/CT71 (27,5 %) hatte den größten Anteil an allen Isolatentypen bzw. ST/CT Typen. Diesem folgten mit größerem Abstand die Sequenz-/Complexypen ST80/CT1065 mit 27,5 %, der ST117/CT469 mit 3,6 %, der ST117/CT929 mit 2,7 %, der ST117/CT36 mit 2,4 %, der ST117/CT478 und ST78/CT894 mit je 2,0 %, der ST203/CT20 und ST80/CT16 mit je 1,6 % und Isolate des ST117/CT24, ST203/CT1614, ST203/CT28, ST323/CT1014 und ST721/CT1573 mit je 1,1 %.

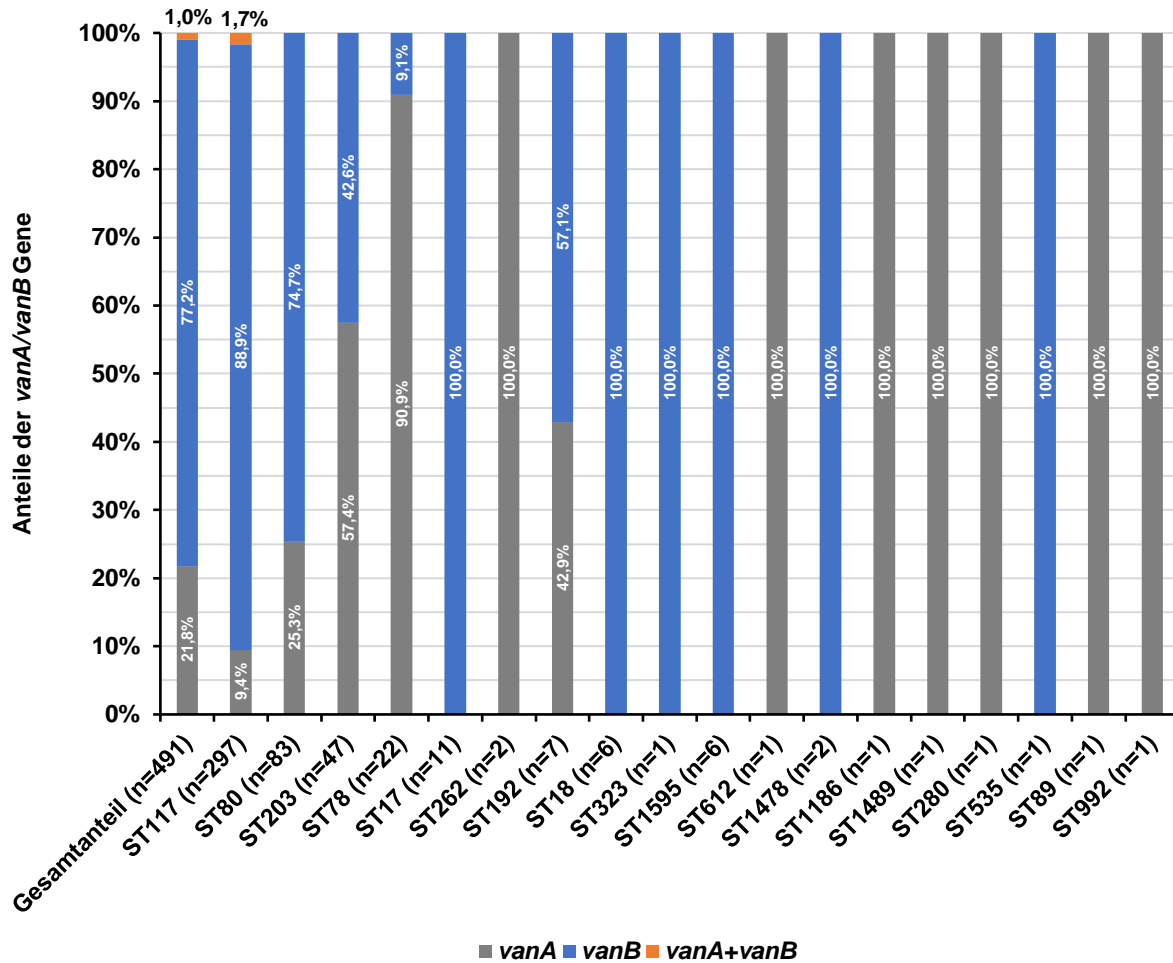


Abbildung 54: Anteile der *vanA/vanB* Gene an den Sequenztypen (ST) der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ (2020). Die Isolate stammten aus den Jahren 2014-2018.

In 491 von 636 Isolaten konnten *van* Gene bestimmt werden, siehe Abbildung 54.

Das *vanA* Gen wurde in 21,8 % der Isolate detektiert, das *vanB* Gen in 77,2 % aller Isolate. Weiterhin trugen 1 % der Isolate sowohl *vanA* als auch *vanB*.

Das Verhältnis von *vanA* zu *vanB* lag damit bei 1:3,5. Die *van* Verhältnisse der jeweiligen Sequenztypen (ST) sind ebenso Abbildung 54 zu entnehmen und unterschieden sich je nach Sequenztyp (ST). Nur *vanA* trugen der ST262, ST612, ST1186, ST1489, ST280, ST89 und ST992. Dagegen trugen ST17, ST18, ST323, ST1595, ST1478 und ST535 ausschließlich *vanB*.

Für den häufigsten ST der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵, der ST117, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei 1:9,4. 88,9 % des ST117 trugen *vanB*, 9,4 % *vanA* und 1,7 % *vanA* und *vanB*. Für den häufigsten Sequenztyp (ST) dieser Arbeit, ST192, lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei Xanthopoulou et al.²⁵ bei 1:1,3. 57,1 % der Isolate des ST192 trugen *vanB* und 42,9 % *vanA*.

4.3 Komparative genombasierte Analyse der VREfm Isolate dieser Arbeit gegenüber genetischen Fingerabdrücken von VREfm Isolaten aus dem Rhein-Main Gebiet und anderen Studien aus Deutschland

Die 187 VREfm Isolate dieser Arbeit wurden zunächst mit verfügbaren genetischen Fingerabdrücken von VREfm Isolaten^{22,29} aus dem Rhein-Main-Gebiet der Jahre 2016 bis 2018 verglichen, siehe hierzu Abbildung 55 in Kapitel 4.3.1.

Dann erfolgte die Ausweitung der komparativen Analyse der Isolate dieser Arbeit (n=187) auf einen Vergleich mit Isolaten aus Deutschland (n=2005) der Studien in Tabelle 13. Innerhalb dieses deutschlandweiten Vergleichs wurde initial das Vorkommen der in dieser Arbeit aufgetretenen Sequenztypen (ST) mit dem Vorkommen in den anderen Studien verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Kapitel 4.3.2 als Diagramm in Abbildung 57 und Tabelle 14 visualisiert. Daraufhin wurde der Vergleich auch auf die Complextypen (CT) ausgeweitet, siehe hierzu Tabelle 15 und Abbildung 58 in Kapitel 4.3.3. Die vorhandenen WGS-Daten zu 13 VREfm Isolaten von Weber et al.⁵³ enthielten nur den ST117/CT71 und wurden daher von der komparativen Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 13: Übersicht der Isolate aus Veröffentlichungen, die zur komparativen genombasierten Analyse herangezogen wurden.

Autoren (Accession-Number)	Jahr (Publikation)	Ort	Jahr (Proben)	Anzahl (Isolate)	Referenz (Publikation)
Mellmann et al. (PRJEB8084)	2016	Münster	2013- 2015	198	47
Liese et al. (PRJEB30772)	2019	Baden- Württemberg	2010- 2016	772	23
Falgenhauer et al. (PRJEB29744)	2019	Hessen/Rhein- Main	2017- 2018	94	22
Xanthopoulou et al. (PRJEB28593)	2020	Deutschland	2014- 2018	636	25
Neumann et al. (PRJNA524489)	2020	Süddeutschland	2014- 2015	111	26
Eisenberger et al. (PRJEB34664)	2020	Bayern	2018- 2019	97	28
Eichel et al. (PRJNA604888)	2020	Baden- Württemberg	2016	42	27
Falgenhauer et al. (PRJNA631114)	2021	Hessen/Rhein- Main	2016- 2018	55	29

4.3.1 Komparative Analyse der 187 VREfm Isolate dieser Arbeit gegenüber verfügbaren genetischen Fingerabdrücken von VREfm Isolaten aus dem Rhein-Main-Gebiet der Jahre 2016 bis 2018

Die 187 VREfm Isolate dieser Arbeit wurden mittels Clusteranalyse mit den Isolaten (PRJNA631114: 55, PRJEB29744: 94, n=149) aus dem Rhein-Main-Gebiet der Jahre 2016-2018 der Untersuchung von Falgenhauer et al.,^{13,19} publiziert in den Jahren 2019 und 2021, verglichen und vor deren Hintergrund analysiert.

Die Grundlage dieser komparativen Analyse war ein allelbasierter Vergleich für das Kerngenom von *E. faecium* nach cgMLST Schema von de Been⁴¹ für 1423 Gene und MLST Schema für 7 Haushaltsgene nach Homan.⁴⁰

Die Schwelle zur Clusterbildung nach cgMLST wurde auf 20 festgelegt. Das Ergebnis der komparativen Analyse aller 336 Isolate und deren genetischer Beziehung ist in Abbildung 55 der nachfolgenden Seite dargestellt.

Diese ergab die Bildung von 13 Clustern, davon wurden die Cluster 1, 8, 10, 12 aus Isolaten von Falgenhauer et al.^{22,29} und die Cluster 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14 aus Isolaten dieser Untersuchung gebildet.

Die komparative Analyse ergab zwischen den in der Untersuchung von Falgenhauer et al.^{22,29} dominierenden ST117/CT71 Isolaten des Clusters 1 und einem ST192/CT2665 des Clusters 7 dieser Arbeit, eine minimale Zahl an Allelunterschieden von 149.

Weiterhin konnte eine Beziehung zwischen ST18 Isolaten dieser Untersuchung und ST262 Isolaten der Untersuchungen von Falgenhauer et al.^{22,29} ausfindig gemacht werden, wenn auch mit großer Alleldifferenz.

Dies waren im Detail ein Isolat des ST18/CTNEW des Clusters 14 dieser Arbeit, das zu einem Isolat des ST262/CT2613 bei einer Alleldifferenz von 241 in Beziehung stand. Ein Isolat des Typs ST18/CT5 des Clusters 5 dieser Arbeit stand bei einer Alleldifferenz von 319 zu einem Isolat des ST18/CTNEW in Verbindung.

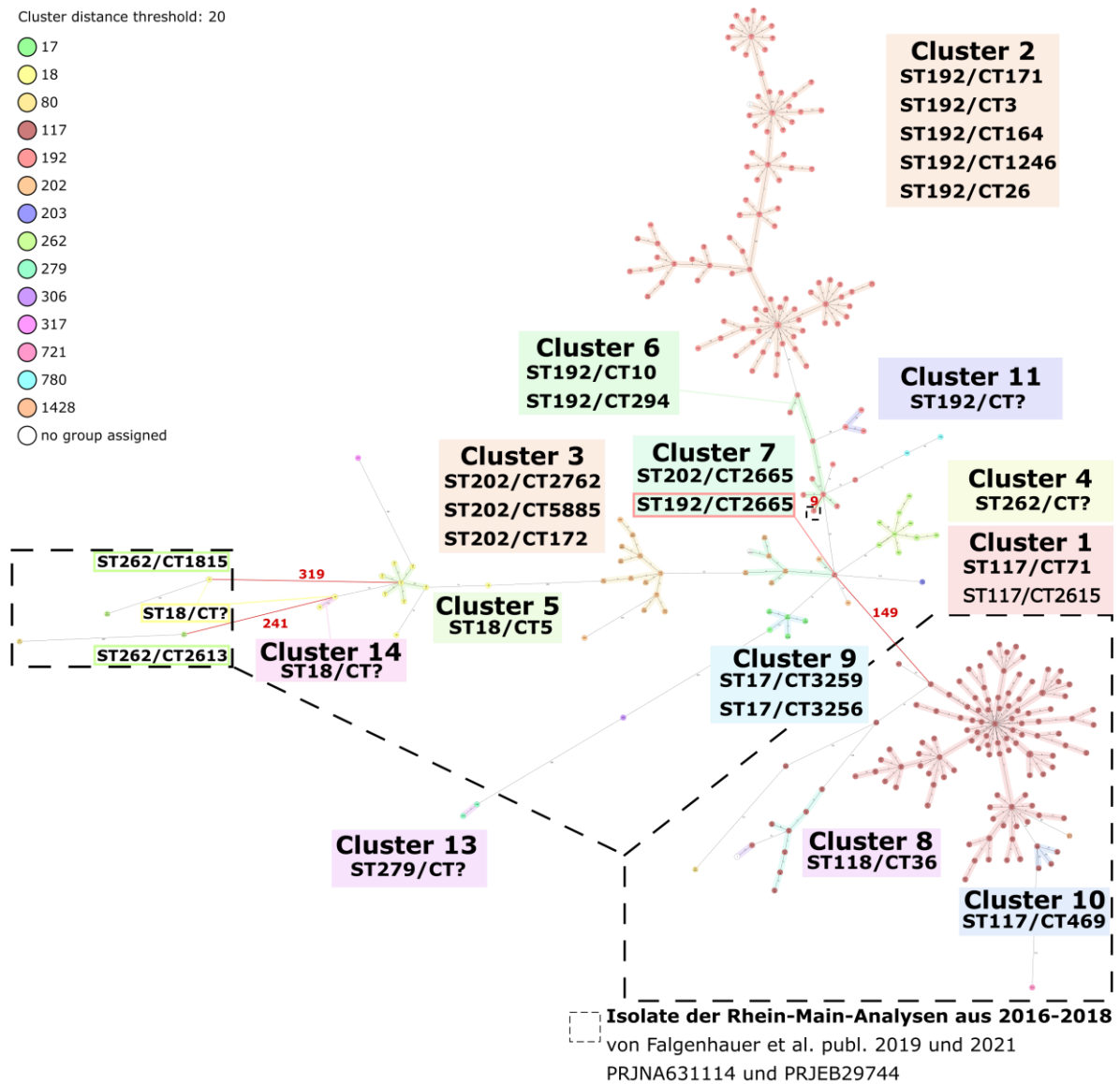


Abbildung 55: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate dieser Arbeit aus 2005-2007 auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung im Vergleich zu den Isolate aus 2016-2018 von Falgenhauer et al.^{22,29}, gestrichelter Rahmen. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom Seqsphere+ definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolate. Allelunterschiede zwischen dieser und der Analyse von Falgenhauer et al. unter Angabe der Alleldifferenz in rot. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Lediglich das Cluster 6 enthielt sowohl Isolate dieser Arbeit als auch ein Isolat der Arbeit von Falgenhauer et al. 2019 (PRJEB29744).²²

Hierbei handelte es sich um ein Isolat des Typs ST192/CT10, das bei einer Alleldifferenz von 9, in Abbildung 56 rot dargestellt, zu einem ST192/CT10 Isolat dieser Arbeit eine Verwandtschaftsbeziehung unterhielt, obwohl 10 Jahre zwischen der Probennahme der Isolate dieser Arbeit und dem Isolat von Falgenhauer et al. lagen.

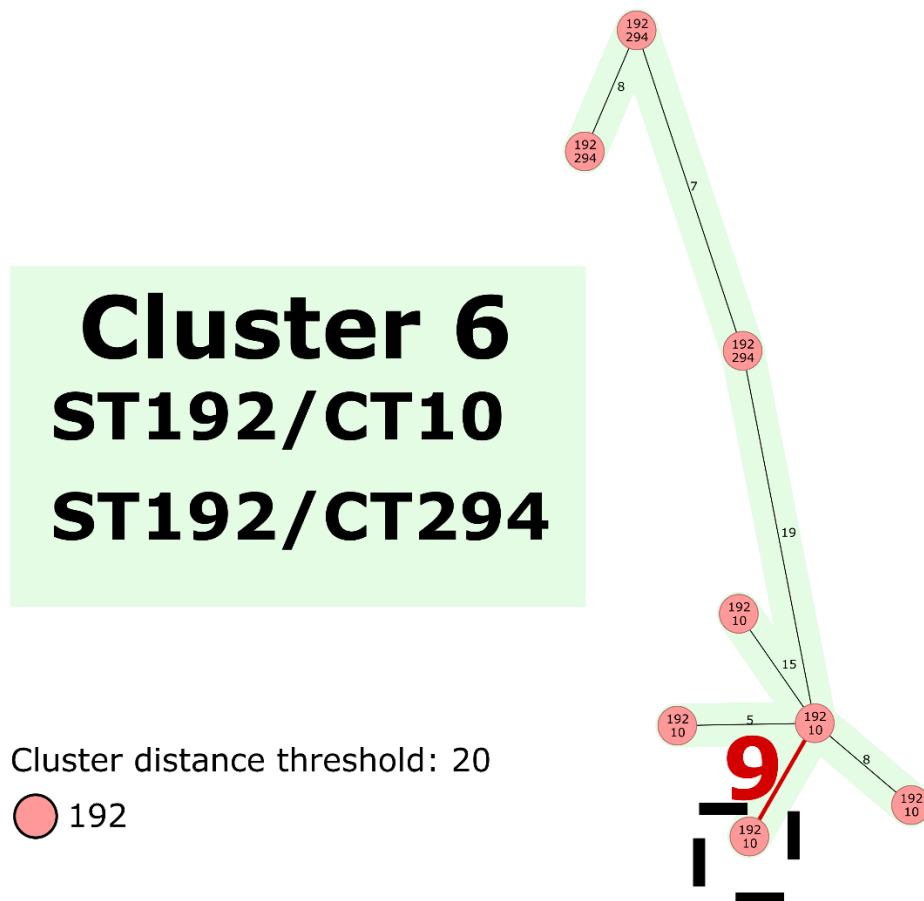


Abbildung 56: Vergrößerte Darstellung des Clusters 6 aus der Gesamtdarstellung in Abbildung 55 in Form eines minimum spanning tree (MST) mit ST192/CT10 und ST192/CT294 Isolaten dieser Arbeit aus 2006-2007 im Vergleich zu den Isolaten aus 2017-2018 von Falgenhauer et al.²², gestrichelter Rahmen. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom Seqsphere+ definiert. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

4.3.2 Vergleich des Vorkommens der in dieser Arbeit aufgetretenen Sequenztypen (ST) mit anderen Studien aus Deutschland

In Tabelle 14 ist zu sehen, dass in keiner Studie alle Sequenztypen dieser Arbeit (n=11) vorkamen. In der Studie von Liese et al. kamen die meisten Sequenztypen dieser Arbeit vor (n=8/11), am geringsten war diese Zahl bei Eisenberger et al. (n=0/11).

In den für diese Studie im Hinblick auf die Regionalität besonders relevanten Rhein-Main-Studien von Falgenhauer et al. aus 2019 und 2021 waren dies je 2 Sequenztypen (ST), zum einen ST192 und ST262 der Studie aus 2019 sowie ST18 und ST262 der Studie aus 2021.

Tabelle 14: Übersicht der in dieser Studie aufgetretenen Sequenztypen (ST) im Vergleich zu anderen Studien. Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines Sequenztyps in einer Studie.

Diese Arbeit	Studie							
	Mellmann et al. (2016) ⁴⁷	Falgenhauer et al. (2019) ²²	Liese et al. (2019) ²³	Eichel et al. (2020) ²⁷	Xanthopoulou et al. (2020) ²⁵	Neumann et al. (2020) ²⁶	Eisenberger et al. (2020) ²⁸	Falgenhauer et al. (2021) ²⁹
ST192								
ST202								
ST18								
ST262								
ST17								
ST279								
ST780								
ST203								
ST306								
ST317								
ST721								

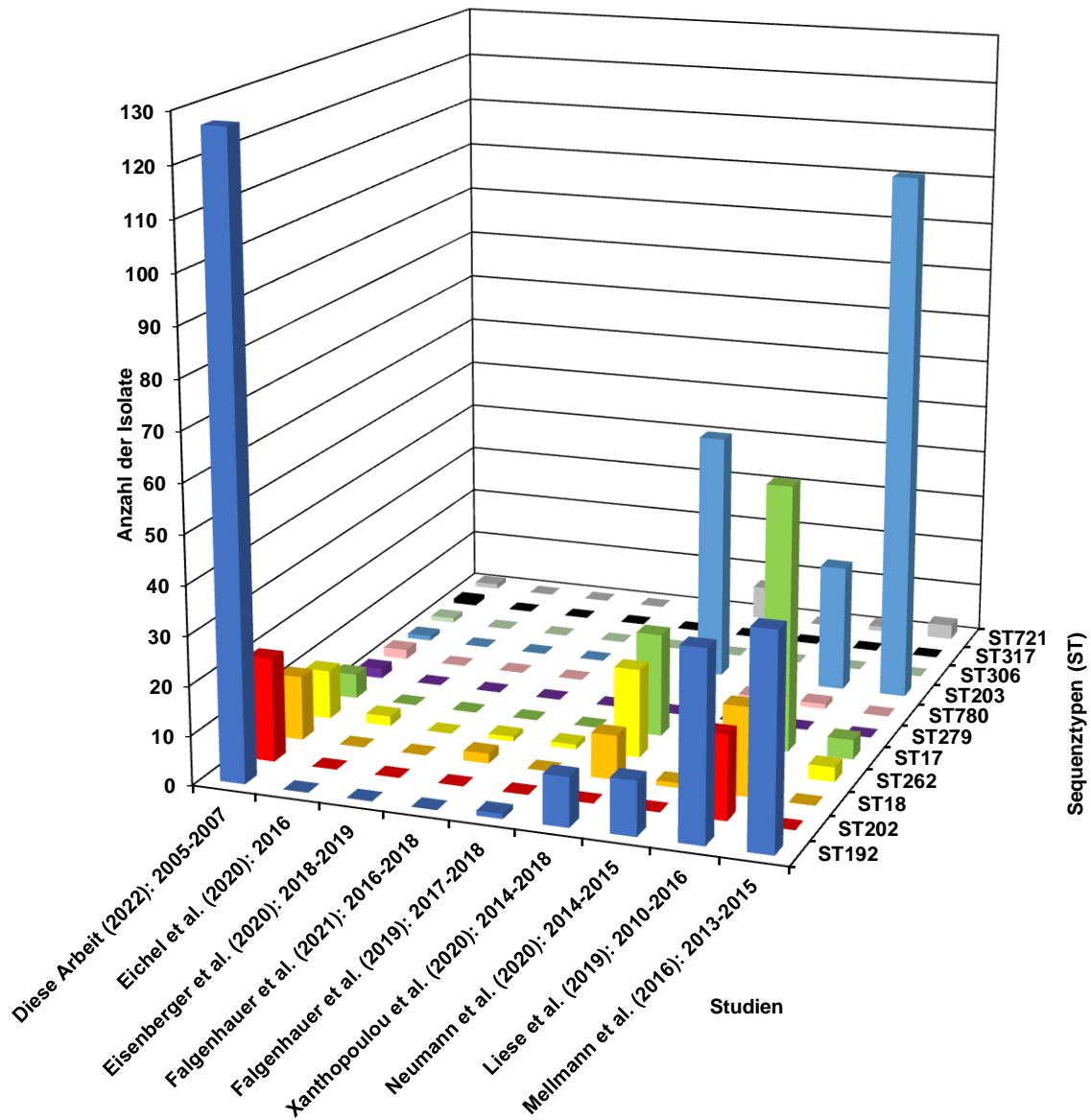


Abbildung 57: Vergleich der in dieser Studie aufgetretenen Sequenztypen (ST) mit anderen Studien unter Angabe des Publikationsjahrs in Klammern und Probenjahre der Isolate nach Doppelpunkt.

Das Diagramm in Abbildung 57 zeigt, dass der ST192 Sequenztyp in dieser Arbeit bei 67,9% ($n=127/187$) der Isolate, bei Mellmann et al. (2016) bei 21,7 % ($n=43/198$) der Isolate, bei Liese et al. (2019) bei 4,9 % ($n=38/773$) der Isolate, bei Neumann et al. (2020) bei 9,9 % ($n=11/111$) der Isolate, bei Xanthopoulou et al. (2020) bei 4,1 % ($n=10/247$) Isolate und bei Falgenhauer et al. (2019) bei 1,1 % ($n=1/95$) der Isolate typisiert werden konnte. In den Studien von Eichel et al. (2020), Eisenberger et al. (2020) und Falgenhauer et al. (2021) trat der ST192 Sequenztyp nicht auf.

In dieser Arbeit konnten 11,2 % der Isolate als ST202 typisiert werden. Ansonsten trat dieser ST nur in der Studie von Liese et al. (2019) bei 2,2 % der Isolate auf. In allen anderen Arbeiten wurden keine Isolate als ST202 typisiert.

Als Sequenztyp ST18 wurden in dieser Arbeit 7 % der Isolate typisiert. In der Studie von Falgenhauer et al. (2021) betrug der Anteil 3,6 %, bei Liese et al. (2019) 2,3 %, bei Xanthopoulou et al. (2020) 1,4 % und bei Neumann et al. (2020) 0,9 %. In den Studien von Falgenhauer et al. (2019) und Eichel et al. (2020) trat dieser Sequenztyp nicht auf.

Der Sequenztyp ST262 wurde in dieser Arbeit bei 5,3 % der Isolate nachgewiesen. In der Studie von Eichel et al. (2020) wurde er bei 4,8 % der Isolate festgestellt, bei Xanthopoulou et al. (2020) bei 2,8 %, bei Falgenhauer et al. (2021) bei 1,8 %, bei Mellmann et al. (2016) bei 1,5 %, bei Falgenhauer et al. (2019) bei 1,1 % und bei Liese et al. (2019) bei 0,1 %. In der Studie von Neumann et al. (2020) trat der ST262 nicht auf.

Der ST17 Sequenztyp trat in dieser Arbeit bei 2,7 % Isolate in Erscheinung. Bei Liese et al. (2019) lag der Anteil bei 7 %, bei Xanthopoulou et al. (2020) bei 3,3 %, bei Mellmann et al. (2016) bei 2 % und bei Neumann et al. (2020) bei 0,9 %. In den Studien von Falgenhauer et al. (2019), Eichel et al. (2020) und Falgenhauer et al. (2021) wurde kein Isolat als ST17 typisiert.

Der ST780 wurde in dieser Arbeit bei 1,1 % der Isolate identifiziert, ebenso bei 0,9 % der Isolate in der Studie von Neumann et al. (2020) und bei 0,1 % der Isolate in der Studie von Liese et al. (2019).

Der Sequenztyp ST203 trat in dieser Arbeit bei 0,5 % der Isolate auf. In der Studie von Mellmann et al. (2016) wurde er jedoch bei 54,5 % der Isolate nachgewiesen, bei Xanthopoulou et al. (2020) bei 8 %, bei Liese et al. (2019) bei 3,4 % und bei Neumann et al. (2020) bei 0,9 %.

Der Sequenztyp ST279 wurde ausschließlich in dieser Arbeit bei 1,1 % der Isolate typisiert. Der ST306 und ST317 traten mit je 0,5 % Anteil ebenso nur in dieser Arbeit auf.

Der ST721 wurde im Rahmen dieser Arbeit bei 0,5 % der Isolate vorgefunden. In der Studie von Mellmann et al. (2016) wurde er bei 1,5 % der Isolate nachgewiesen, bei Xanthopoulou et al. (2020) bei 1,1 % und bei Liese et al. (2019) bei 0,1 %.

4.3.3 Vergleich des Vorkommens der in dieser Arbeit aufgetretenen Complextypen (CT) mit anderen Studien aus Deutschland

In Tabelle 15 ist ein Vergleich des Vorkommens der in Complextypen (CT) subdifferenzierten Sequenztypen (ST) zu sehen, die in dieser Arbeit und anderen Studien auftraten. Kein Complextyp dieser Arbeit kam in allen anderen Studien vor.

In der Studie von Liese et al. kamen die meisten (n=3) Complextypen dieser Arbeit vor. Dies waren 2 Complextypen des ST192 (CT13 und CT10) sowie 1 Complextyp des Sequenztyps ST202 (CT2762). In den Studien von Eichel et al. (2020) und Falgenhauer et al. (2021) gab es keinerlei Übereinstimmungen im Hinblick auf die Complextypen dieser Arbeit.

In der für diese Arbeit im Hinblick auf die Regionalität relevanten Rhein-Main-Studie von Falgenhauer et al. aus 2019, trat der ST192/CT10 auf.

Tabelle 15: Übersicht der in dieser Studie und anderen Studien aufgetretenen Complextypen (CT) der jeweiligen Sequenztypen (ST). Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines ST/CT in einer Studie. Nicht vorgekommene ST bzw. deren CT wurden exkludiert.

		Studie							
		Mellmann et al. (2016) ⁴⁷	Falgenhauer et al. (2019) ²²	Liese et al. (2019) ²³	Eichel et al. (2020) ²⁷	Xanthopoulou et al. (2020) ²⁵	Neumann et al. (2020) ²⁶	Eisenberger et al. (2020) ²⁸	Falgenhauer et al. (2021) ²⁹
Diese Arbeit	CT								
ST192	CT171								
	CT3								
	CT164								
	CT10								
	CT26								
	CT294								
	CT1246								
	CT2665								
	CT1217								
ST202	CT2762								
	CT2665								
	CT172								
	CT5885								

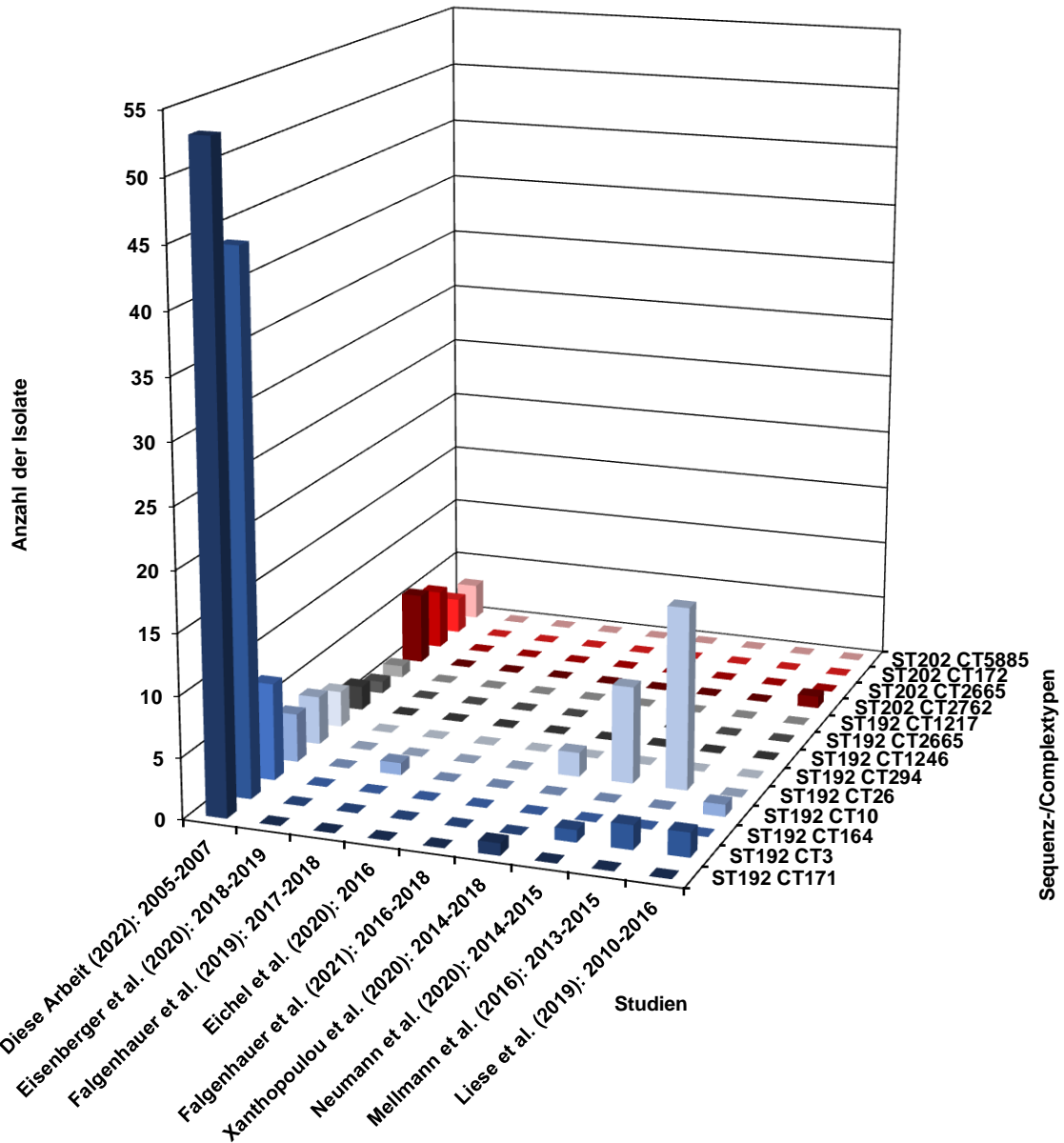


Abbildung 58: Vergleich der in dieser Studie und anderen Studien aufgetretenen Complexypen (CT) des jeweiligen Sequenztyps (ST).

Abbildung 58 zeigt, dass der ST192/CT171 als häufigster Complexyp in dieser Arbeit mit einem Anteil von 28,3 % typisiert werden konnte, bei Xanthopoulou et al. (2020) waren dies 0,2 % der Isolate.

Der zweithäufigste Complexyp dieser Arbeit, ST192/CT3, wurde in 23,5 % der Isolate identifiziert. Im Vergleich trat dieser Typ in der Studie von Liese et al. (2019) in 0,3 % der Fälle auf, bei Mellmann et al. (2016) in 1 % und in der Untersuchung von Neumann et al. (2020) wurde er bei 0,9 % der Isolate nachgewiesen.

Der ST192/CT10 wurde in dieser Arbeit bei 2,1 % der Isolate typisiert, dagegen in den Studien von Falgenhauer et al. (2019) bei 1,1 % und Liese et al. (2019) bei 0,1 %.

Der ST192/CT26 wurde in dieser Untersuchung in 2,1 % der Isolate bestimmt und wurde ebenso durch Mellmann et al. (2016) in 7,6 %, durch Neumann et al. (2020) in 7,2 % und durch Xanthopoulou et al. (2020) in 0,3 % der Fälle typisiert.

Der ST202/CT2762 trat mit einem Anteil von 3,2 % in dieser Arbeit, nur bei Liese et al. (2019) mit 0,1 % auf.

Der ST192/CT164, ST192/CT294, ST192/CT1246, ST192/2665, ST192/CT1217 trat in keiner der anderen Studien in Erscheinung.

4.3.4 Phylogenetischer allelbasierter Vergleich aller genotypisierten VREfm Isolate, die in dieser Arbeit als auch in Studien aus Deutschland auftraten

Die Grundlage dieser deutschlandweiten komparativen Analyse war ein allelbasierter Vergleich für das Kerngenom von *E. faecium* nach cgMLST Schema⁴¹ für 1423 Gene zur Identifizierung von phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen.

Bei einer Schwelle von 20 Allel Unterschieden zwischen den Isolaten, konnten insgesamt 104 Cluster generiert werden. Von diesen 104 Clustern wurden die ersten 64 Cluster mit einer Anzahl an Isolaten von ≥ 3 in Tabelle 16 aufgelistet, alle übrigen Cluster mit Isolaten < 3 sind in Tabelle 26 im Anhang zu finden.

Die Cluster wurden absteigend indexiert nach Größe bzw. Isolaten Anzahl. Weiterhin wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen mittels eines minimum spanning trees (MST) in Abbildung 59 visualisiert. In diesem wurden die Isolate, neben der Angabe des Sequenz- und Complextyps, nach Herkunfts-Publikation eingefärbt.

Die Schattierung der Allel-Verbindungslinien zur Visualisierung der Allel Differenzen zwischen den Isolaten wurde für die Hervorhebung der Cluster ebenso vorgenommen. Tabelle 16 veranschaulicht, dass einzelne Cluster aus genetisch ähnlichen Isolaten, also bei Vorliegen einer geringen Alleldifferenz, aber unterschiedlichen Veröffentlichungen gebildet wurden.

Tabelle 16: Übersicht der Cluster des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs der VREfm Isolate unter Angabe der Clusternummer, Anzahl der Isolate n, Sequenztyp/Complexyp (ST/CT) und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.

Cluster	n	ST/CT	Studie								
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulos et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Eisenberger et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)
Cluster 1	574	ST117/CT469									
		ST1201/CT469									
		ST117/CT1522									
		ST117/CT2794									
		ST117/CT71									
		ST117/CT1566									
		STNEW/CT1566									
		ST1352/CT71									
		ST117/CT2907									
		ST117/CT2615									
		ST1478/CT71									
ST117/CT1795											
Cluster 2	301	ST80/CT1065									
		ST80/CT7188									
		STNEW/CT1065									
Cluster 3	186	ST192/CT171									
		ST192/CT164									
		ST192/CT897									
		ST192/CT1246									
		ST192/CT3									
		ST192/CT26									
		ST192/CT1617									
		ST192/CT2824									
ST1595/CT26											
Cluster 4	129	ST203/CT20									
		STNEW/CT20									
Cluster 5	82	ST117/CT24									
		ST117/CT2773									
		ST117/CT2798									
		STNEW/CT2780									
		ST117/CT41									
		ST117/CT178									
ST117/CT2768											
Cluster 6	67	ST80/CT1013									
Cluster 7	44	ST17/CT900									
Cluster 8	41	ST117/CT36									
		ST117/CT991									
		STNEW/CT36									
		ST117/CT1526									
Cluster 9	37	ST80/CT1066									
Cluster 10	35	ST78/CT2055									
		ST78/CT894									
		ST78/CT1187									
		ST78/CT2447									
Cluster 11	29	ST202/CT2763									
		ST202/CT2762									
		ST202/CT172									
		ST202/CT5885									
Cluster 12	28	ST80/CT315									
		ST80/CT2077									
		ST80/CT3085									
		ST80/CT1008									

Cluster	n	ST/CT	Studie									
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Eisenberger et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)	
		ST80/CT1017										
		ST80/CT2844										
		ST80/CT2843										
		ST80/CT2845										
		ST80/CT2638										
		ST80/CT475										
		ST80/CT2331										
		ST80/CT202										
Cluster 13	23	ST117/CT929										
		ST117/CT2505										
		ST117/CT2690										
Cluster 14	23	ST192/CT22										
Cluster 15	20	ST203/CT28										
Cluster 16	14	ST117/CT478										
		ST118/CT1683										
Cluster 17	12	ST80/CT16										
Cluster 18	12	ST192/CT2771										
		ST192/CT10										
		ST192/CT294										
Cluster 19	10	ST262/CTNEW										
Cluster 20	9	ST18/CT5										
Cluster 21	8	ST202/CT2665										
		STNEW/CT2665										
		ST192/CT2665										
Cluster 22	8	ST18/CT281										
Cluster 23	7	ST262/CT1016										
Cluster 24	7	ST117/CT35										
Cluster 25	7	ST78/CT1121										
		ST78/CT2885										
Cluster 26	7	ST203/CT1010										
		ST203/CT2801										
Cluster 27	7	ST203/CT1614										
Cluster 28	7	ST323/CT1014										
Cluster 29	7	ST721/CT1573										
Cluster 30	7	STNEW/CT2808										
Cluster 31	6	ST80/CT1046										
		ST80/CT1083										
		ST80/CT1755										
Cluster 32	6	ST17/CT1482										
Cluster 33	6	ST17/CT29										
Cluster 34	5	ST80/CT32										
		ST1186/CT32										
Cluster 35	5	ST17/CT3256										
		ST17/CT3259										
		ST1186/CT32										
Cluster 36	5	ST18/CT163										
Cluster 37	5	ST262/CT1561										
Cluster 38	5	ST192/CT46										
Cluster 39	4	ST262/CT2841										
Cluster 40	4	ST18/CT253										
Cluster 41	4	ST117/CT1177										
Cluster 42	4	ST262/CT2841										
Cluster 43	4	ST555/CT31										
Cluster 44	4	STNEW/CT892										
Cluster 45	4	ST117/CT1612										

Cluster	n	ST/CT	Studie								
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Eisenberger et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)
Cluster 46	3	ST17/CT2779									
Cluster 47	3	ST80/CT467									
Cluster 48	3	ST80/CT1128									
Cluster 49	3	ST80/CT2543									
Cluster 50	3	ST80/899									
Cluster 51	3	ST80/CT106									
Cluster 52	3	ST80/CT1791									
Cluster 53	3	ST80/CT1495									
Cluster 54	3	ST117/CT1169									
Cluster 55	3	ST117/CT1062									
Cluster 56	3	ST78/CT2116									
Cluster 57	3	ST203/CT1028									
		ST203/CT474									
Cluster 58	3	ST203/CT1689									
Cluster 59	3	ST18/CT222									
Cluster 60	3	ST925/CT2816									
Cluster 61	3	ST925/CT2785									
Cluster 60	3	ST117/CT1686									
Cluster 61	3	ST89/CT301									
Cluster 62	3	ST192/CTNEW?									
Cluster 63	3	ST17/CT57									
Cluster 64	3	ST117/CT1686									
Cluster 65	3	ST89/CT301									
Cluster 63	3	ST17/CT1490									
Cluster 64	3	ST925/CT61									
Cluster 65	3	ST192/CT155									
Cluster 66	3	ST80/CT2804									
Cluster 67	3	ST612/CT2688									
Cluster 68	3	ST80/CT67									
Cluster 69	3	ST80/CT2478									
Cluster 70	3	ST262/CT60									
Cluster 71	3	ST721/CT44									
Cluster 72	3	ST17/CT1490									
Cluster 73	3	ST925/CT61									
Cluster 74	3	ST192/CT155									
Cluster 75	3	ST117/CT2775									
Cluster 76	3	ST80/CT49									
Cluster 77	3	ST132/CT1493									
Cluster 78	3	ST117/CT1775									

Auf Basis von Tabelle 14 und Tabelle 15 wurden Isolate mit Sequenztypen (ST) und Complexotypen (CT), die in dieser Arbeit und anderen Studien auftraten, aber auch Isolate unterschiedlichen Genotyps aus dieser Arbeit und anderen Studien, die jedoch bei einer Alleldifferenz von ≤ 20 gemeinsame Cluster bildeten, mittels vergrößerter minimum spanning trees (MST) aus Abbildung 59 näher untersucht und in Abbildung 60, Abbildung 61, Abbildung 62 sowie Abbildung 63 im Detail abgebildet.

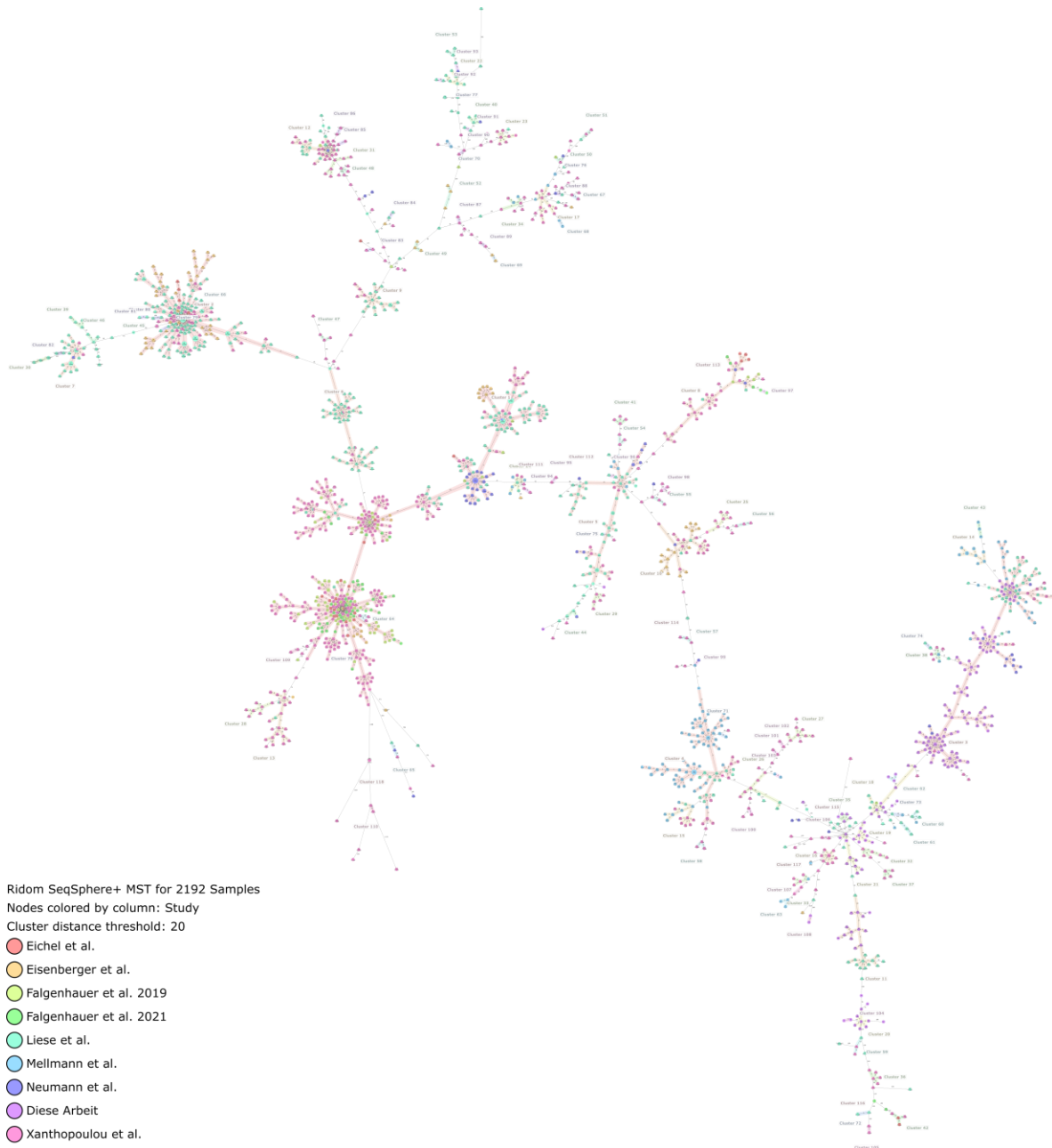


Abbildung 59: Gesamtdarstellung des minimum spanning trees (MST) mit 2192 Isolaten. 187 Isolate dieser Arbeit aus 2005–2007 und 2005 Isolate aus Deutschland auf Basis von MLST/cgMLST. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom Seqsphere+ definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den Studien nach Legende links. Die colorierten Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. ST und CT in den Kreisen angegeben, jedoch nicht sichtbar. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

In Abbildung 60 ist ein vergrößerter Ausschnitt der Cluster aus der Gesamtdarstellung Abbildung 59 dargestellt, die sowohl aus Isolaten dieser Arbeit als auch aus Isolaten anderer Untersuchungen gebildet wurden. Dies waren die Cluster 3, Cluster 11 und Cluster 18, welche in Abbildung 61, Abbildung 62 und Abbildung 63 weiter vergrößert dargestellt sind, um Isolate und Allel Differenzen des minimum spanning trees (MST) entnehmen zu können.

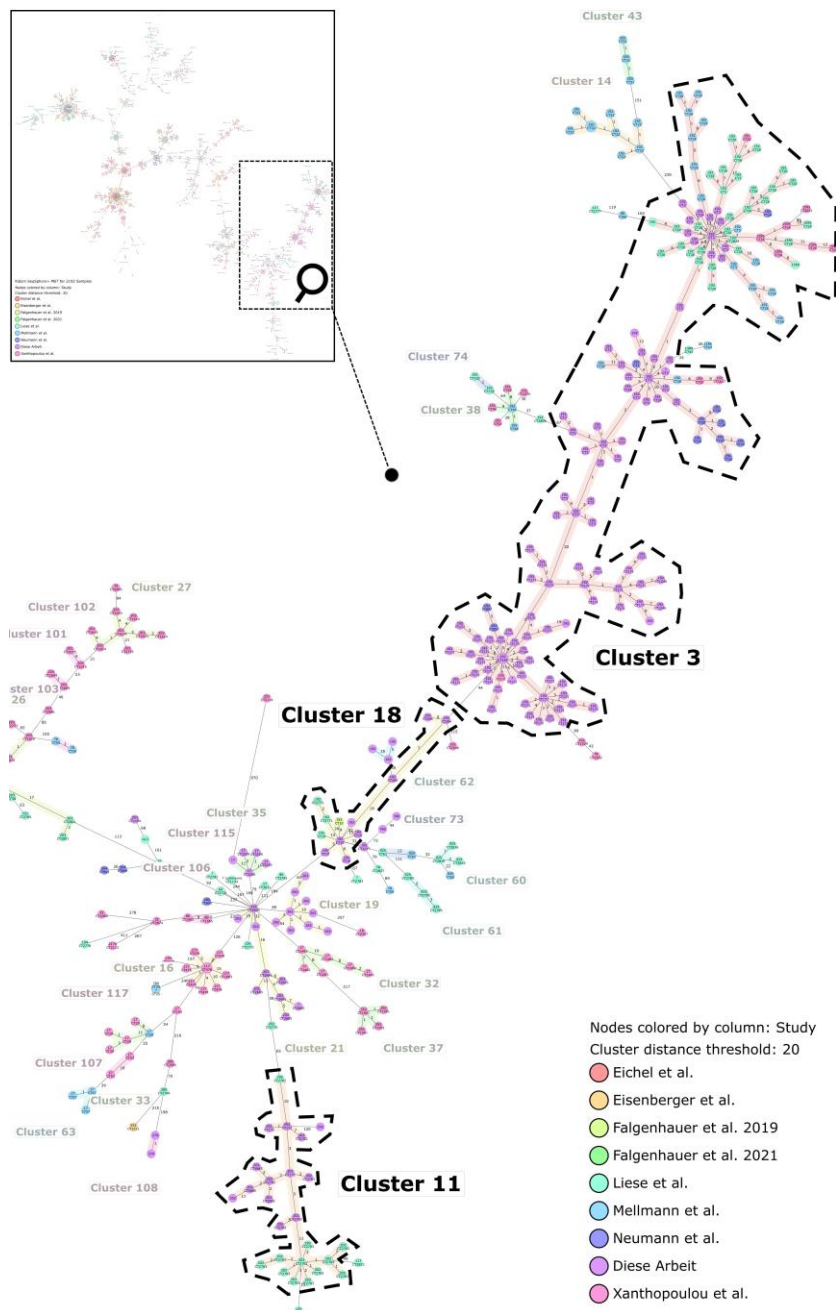


Abbildung 60: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit jenen Clustern 3, 11 und 18 (umrahmt in gestrichelter Linie), die sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurden. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Das Cluster 3 wurde als größtes Cluster durch Isolate des ST192 unterschiedlicher Complexotypen (CT) gebildet wie in Abbildung 61 vergrößert zu sehen, unter Angabe der Studien und vorkommenden ST/CT Typen in Tabelle 17.

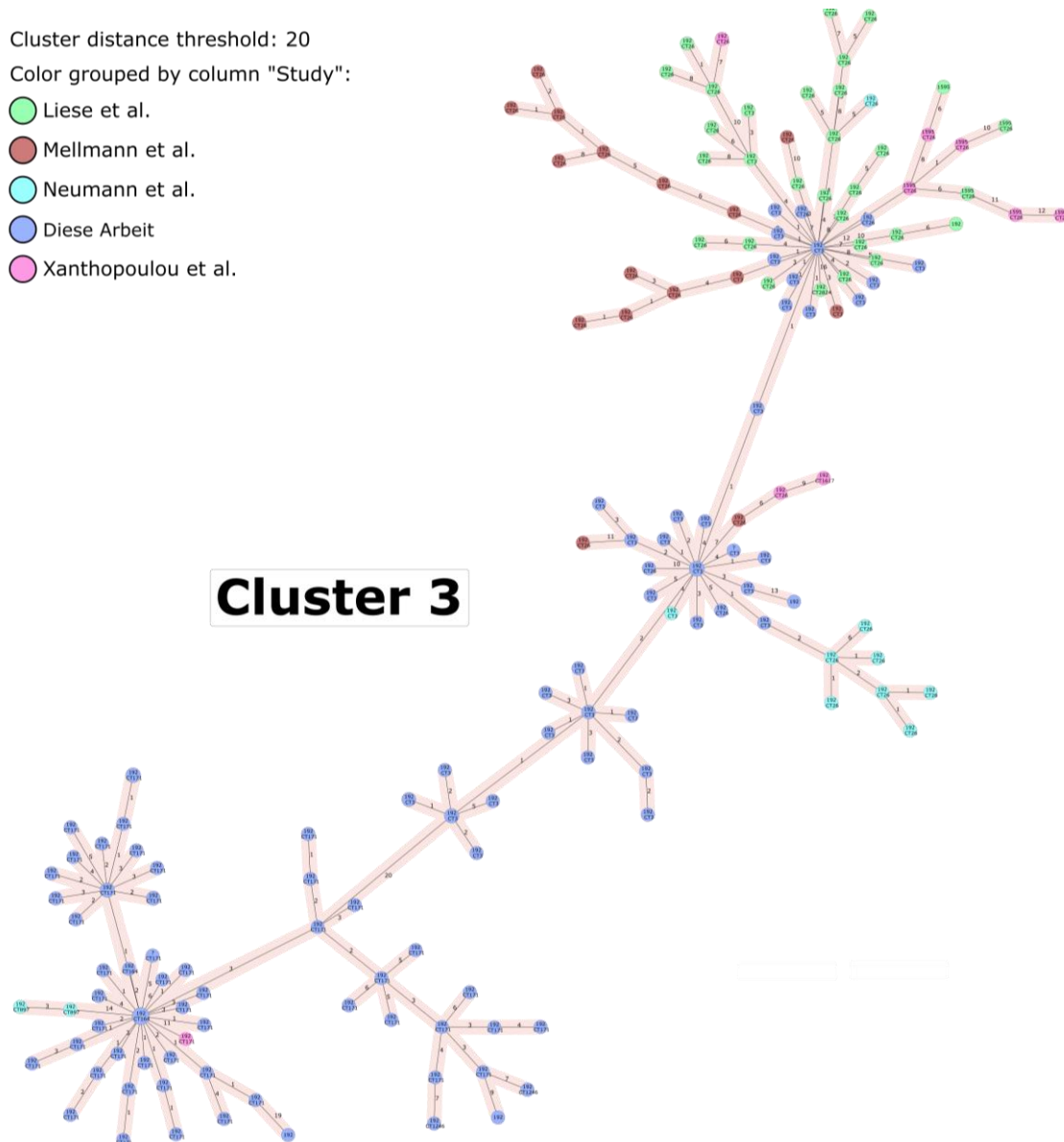


Abbildung 61: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 3, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende links. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Der ST192 Sequenztyp ließ sich in weitere Complexotypen (CT) differenzieren, dies waren zum einen der ST192/CT171 aus dieser Veröffentlichung und der Arbeit von Xanthopoulou et al., die Alleldifferenz lag hier bei 11. Die Isolate des ST192 von Xanthopoulou et al. stammten dabei aus den Jahren 2014, 2015, 2016 und 2018, wohingegen die Isolate dieser Arbeit 10 Jahre zuvor gewonnen wurden.

Tabelle 17: Übersicht des Clusters 3 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.

Cluster	n	ST/CT	Studie							
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)
Cluster 3	186	ST192/CT171	■					■		
		ST192/CT164	■							
		ST192/CT897							■	
		ST192/CT1246	■							
		ST192/CT3	■			■			■	
		ST192/CT26	■					■	■	
		ST192/CT1617						■		
		ST192/CT2824				■				
		ST1595/CT26				■		■		

Zum anderen waren Isolate des Subtyps ST192/CT3, die bereits in dieser Arbeit 2006 und 2007 detektiert wurden, in Cluster 3 zu finden. Diese traten jedoch auch in Arbeiten von Mellmann et al., Liese et al. und Neumann et al. auf.

Die Alleldifferenz lag zwischen Isolaten dieser und Isolaten von Mellmann et al. bei 3, bei Liese et al. sowie jenen von Neumann et al. minimal bei 4. Obwohl die Isolate von Mellmann et al. der Jahre 2013 bis 2015 aus Münster, die von Neumann et al. aus dem Jahr 2014 einer Klinik in Süddeutschland und von Liese et al. aus den Jahren 2010 bis 2015 aus der Universitätsklinik Tübingen stammten, legte dies ebenso eine enge Verwandtschaftsbeziehung nahe.

Isolate des Typs ST192/CT26 traten sowohl bei Mellmann et al. aus 2013-2015, also auch bei Xanthopoulou et al. aus den Jahren 2014-2018, Neumann et al. aus 2015 und Liese et al. auf und unterhielten eine enge Verwandtschaftsbeziehung zum ST192/CT26 und ST192/CT3 der Jahre 2006 und 2007 dieser Arbeit. Die Alleldifferenz lag minimal bei 2 zwischen Isolaten des Typs ST192/CT3 dieser Arbeit und Isolaten des Typs ST192/CT26 von Neumann et al., zu Isolaten des Typs ST192/CT26 von Mellmann et al. bei 7.

Differenzen von 3 Allelen zu Isolaten des ST192/CT26 von Liese et al. und 8 Allele zu Isolaten des Typs ST192/CT26 von Xanthopoulou et al. wurden ermittelt.

Isolate des Typs ST1595 von Xanthopoulou et al. und Liese et al. wurden ebenso dem Cluster 3 zugeordnet, da sie wie die Isolate des ST192/CT26 den CT26 aufwiesen, was damit eine enge Verwandtschaftsbeziehung nahelegte. Die Alleldifferenz von Isolaten des Typs ST1595/CT26 lag minimal bei 7 zum Typ ST192/CT3 dieser Arbeit.

Daneben traten Isolate der Typen ST192/CT164 und ST192/CT1246 nur in dieser Arbeit, Isolate des Typs ST192/CT897 nur in der Arbeit von Neumann et al., Isolate des Typs ST192/CT2824 nur bei Liese et al. und Isolate des Typs ST192/CT1617 nur in der Arbeit von Xanthopoulou et al. auf.

Das Cluster 11, vergrößert in Abbildung 62 dargestellt unter Angabe der Studien und vorkommenden ST/CT Typen in Tabelle 18, setzte sich aus Isolaten des ST202 dieser Arbeit und der von Liese et al. zusammen. Die Isolate des Typs ST202/CT2762 traten in beiden Arbeiten auf. Der Typ ST202/CT172 und ST202/CT5885 kamen nur in dieser Arbeit sowie der ST202/CT2763 nur in der Arbeit von Liese et al. vor. Der ST202/CT172 dieser Arbeit unterhielt bei einer Alleldifferenz von 10 eine enge Beziehung zum ST202/CT2762 von Liese et al. Ebenso der ST202/CT2762 bei einer Alleldifferenz von 12 zum ST202/CT2763 von Liese et al. Die Alleldifferenz zwischen Isolaten des Typs ST202/CT2762 und ST202/CT172, beide aus dieser Arbeit, lag bei 3.

Tabelle 18: Übersicht des Clusters 10 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexotyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.

Cluster	n	ST/CT	Studie							
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)
Cluster 11	29	ST202/CT2763								
		ST202/CT2762								
		ST202/CT172								
		ST202/CT5885								

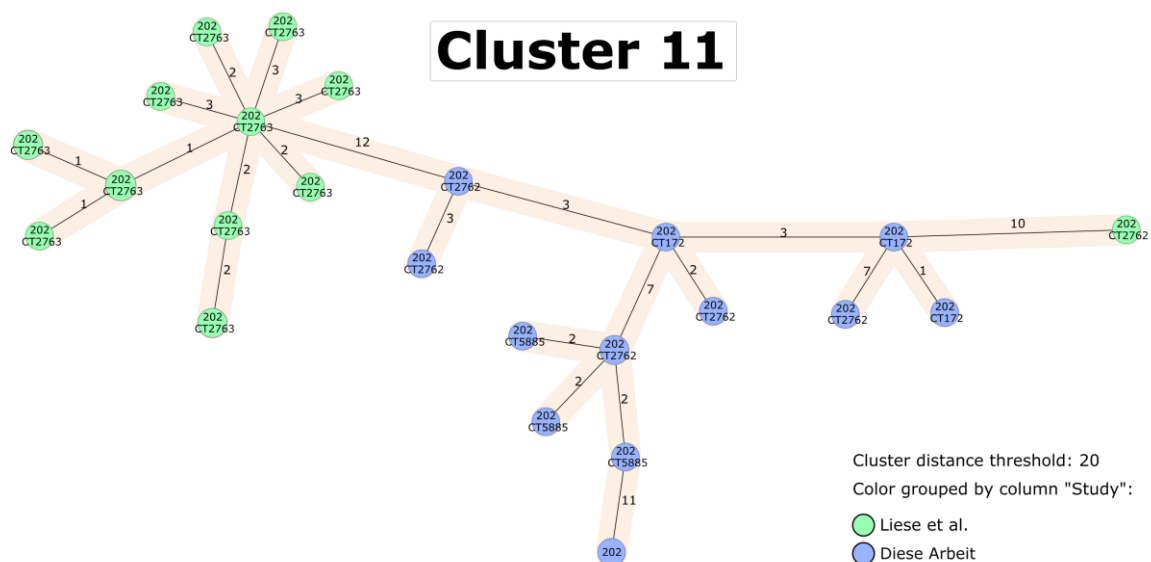


Abbildung 62: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 11, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

Das Cluster 18 wurde durch Isolate des ST192 formiert. Es enthielt Isolate des ST192/CT10 aus dieser Arbeit, eines von Liese et al. sowie eines von Falgenhauer et al. 2019. Die Alleldifferenz lag zum Isolat von Liese et al. bei 15, zu Falgenhauer et al. bei 9. Der ST192/CT2771 trat nur bei Liese et al. auf, unterhielt jedoch eine enge Beziehung zum ST192/CT10 dieser Arbeit bei einer Alleldifferenz von 20.

Der Typ ST192/CT294 trat nur in dieser Arbeit auf.

Tabelle 19: Übersicht des Clusters 18 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexotyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.

Cluster	n	ST/CT	Studie							
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)
Cluster 18	12	ST192/CT2771								
		ST192/CT10								
		ST192/CT294								

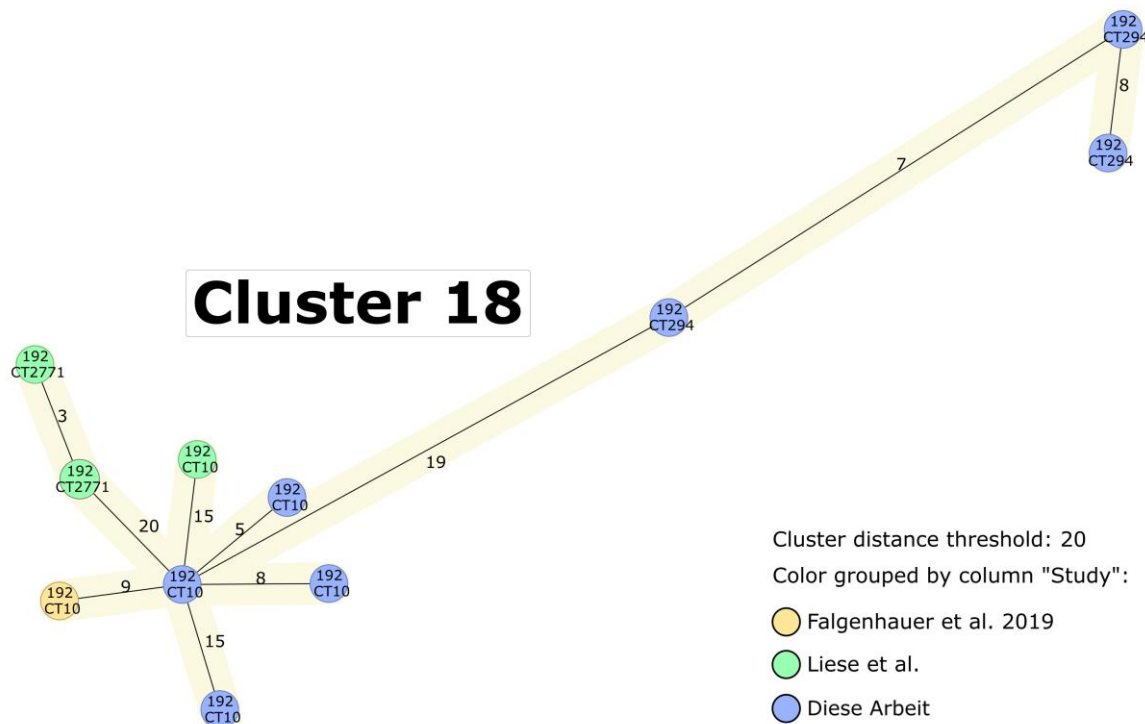


Abbildung 63: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 18, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

4.3.5 Vergleich der *van* Gene dieser Arbeit mit Studien aus Deutschland

Die vom jeweiligen dominierenden Sequenztyp (ST) der Studien abhängigen *vanA/vanB* Gen Verhältnisse lagen, mit Ausnahme der Untersuchung von Mellmann et al.⁴⁷, auf Seiten des *vanB* Genotyps, siehe hierzu Tabelle 20 und Abbildung 64.

In der Studie von Mellmann et al.⁴⁷ war der ST203, von dem alle Isolate das *vanA* Gen trugen, am häufigsten.

Studien mit einer Dominanz des ST117, wie von Falgenhauer et al. (2019 und 2021)^{22,29}, Xanthopoulou et al.²⁵, Neumann et al.²⁶ und Eichel et al.²⁷ zeigten ein *vanA/vanB* Verhältnis zu Gunsten des *vanB* Genotyps. Im Hinblick auf den ST80 der Untersuchung von Liese et al.²³ und den ST80 von Eisenberger et al.²⁸ war dies ebenso der Fall.

Tabelle 20: Übersicht der *vanA/vanB* Gesamtverhältnisse, dominierenden Sequenztypen (ST) und deren *vanA/vanB* Verhältnisse nach Studie im Vergleich.

Autoren	Ort	Probenjahr	<i>vanA/vanB</i> Gesamt- Verhältnis	Häufigster Sequenztyp (ST) und dessen Anteil	<i>vanA/vanB</i> Verhältnis des häufigsten ST
Diese Arbeit	Diese Arbeit	2005-2007	1:5	ST192 (68 %)	1:61
Mellmann et al. (2016)	Münster	2013-2015	1:0,4	ST203 (54,5 %)	1:0
Liese et al. (2019)	Baden- Württemberg	2010-2016	1:3,8	ST80 (45,1 %)	1:14
Falgenhauer et al. (2019)	Hessen Rhein-Main	2017-2018	1:91	ST117 (94,7 %)	0:1
Xanthopoulou et al. (2020)	Deutschland	2014-2018	1:3,5	ST117 (50,5 %)	1:9,4
Neumann et al. (2020)	Süddeutschland	2014-2015	1:10	ST117 (74,8 %)	1:40,5
Eisenberger et al. (2020)	Bayern	2018-2019	1:2,5	ST80 (55,7 %)	1:6,6
Eichel et al. (2020)	Baden- Württemberg	2016	1:10	ST117 (73,8 %)	0:1
Falgenhauer et al. (2021)	Hessen Rhein-Main	2016-2018	1:3,5	ST117 (92,7 %)	0:1

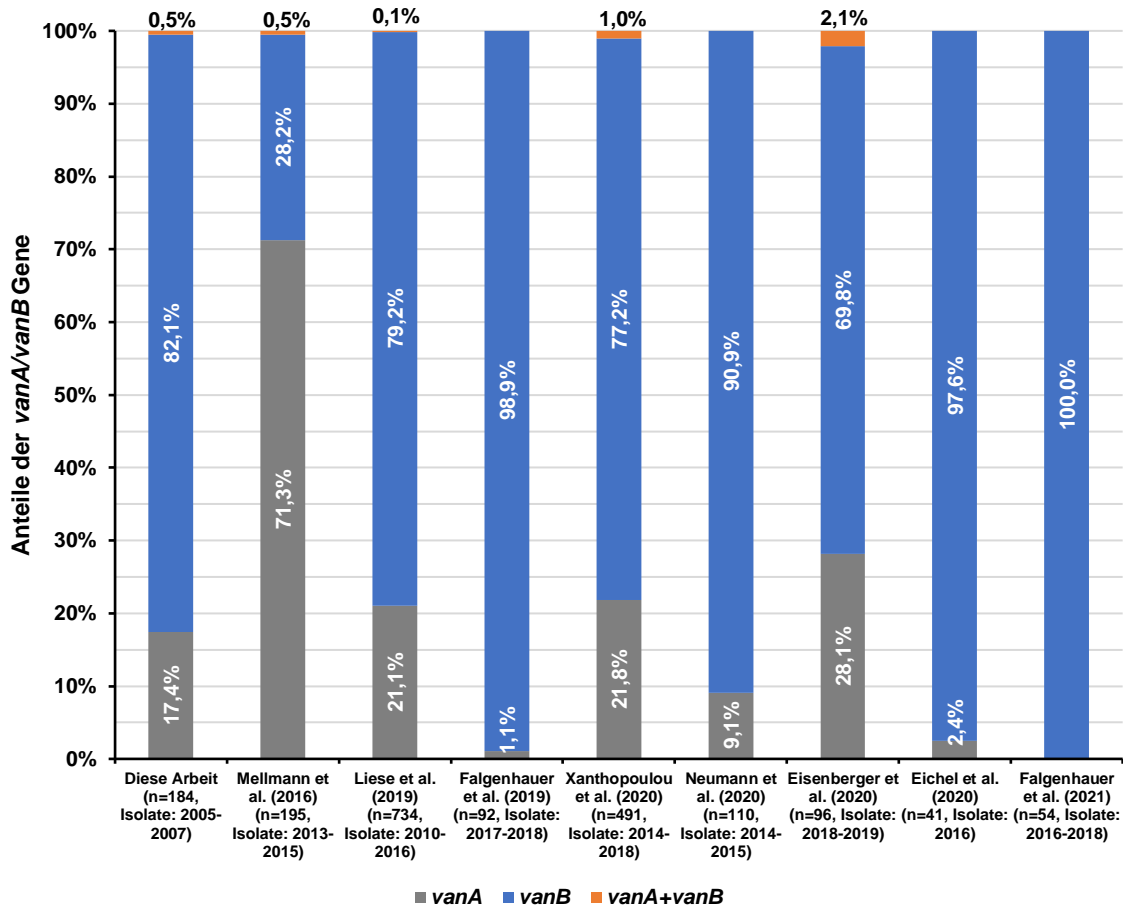


Abbildung 64: Übersicht der vanA/vanB Gesamtanteile nach Studie im Vergleich

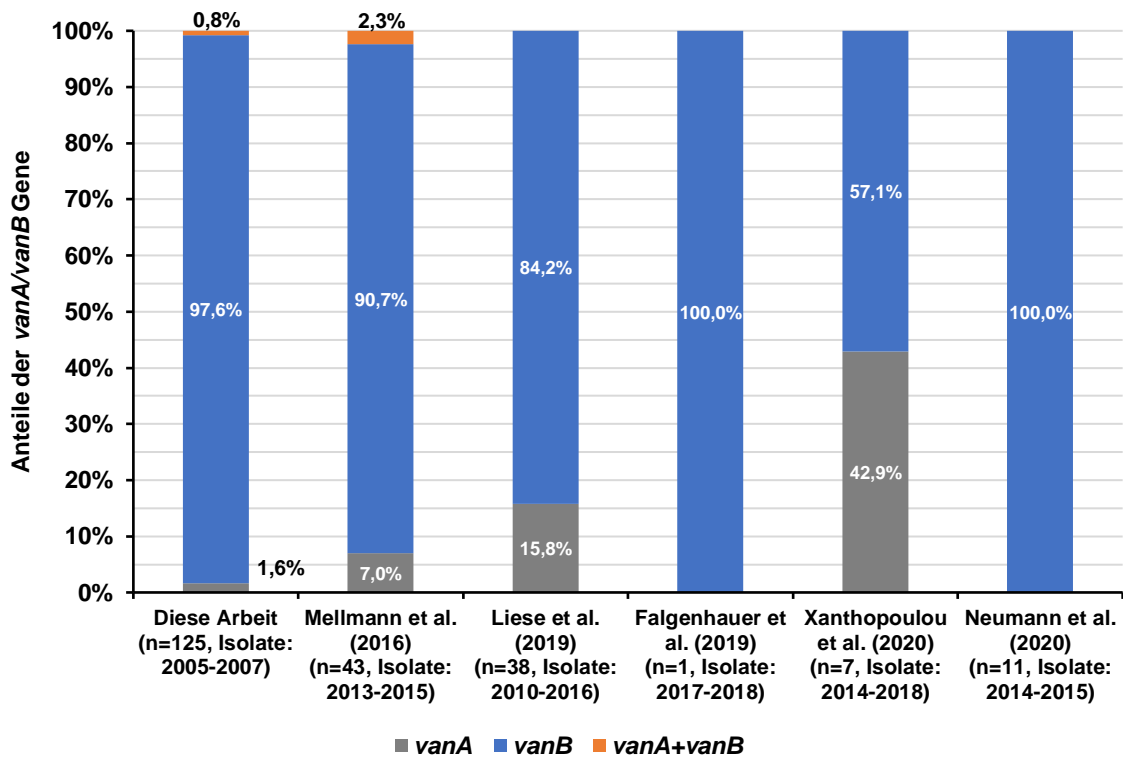


Abbildung 65: Übersicht der vanA/vanB Anteile des ST192 nach Studien im Vergleich

Abbildung 65 und Tabelle 21 veranschaulichen im Detail die *vanA/vanB* Verhältnisse des ST192 als häufigsten Sequenztyp dieser Arbeit, der bereits in den Jahren 2005-2007 für eine *vanB* Dominanz im Rahmen dieser Analyse verantwortlich war, vor dem Hintergrund anderer relevanter Studien aus Deutschland, die ebenso Isolate als ST192 typisierten.

Für alle Isolate des ST192 aus allen berücksichtigten Studien zeigte sich eine *vanB* Dominanz unterschiedlicher Ausprägung. Lag das *vanA/vanB* Verhältnis bei Xanthopolou et al.²⁵ für den ST192 bei 1:1,3 in den Jahren 2014-2018, fanden sich im Rahmen der Untersuchung von Neumann et al.²⁶ mit Isolaten der Jahre 2014-2015 nur *vanB* Träger und weiter zurückreichend im Hinblick auf Isolate dieser Arbeit aus den Jahren 2005-2007 ein *vanA/vanB* Verhältnis von 1:61.

Das einzelne ST192 Isolat von Falgenhauer et al.²² (2019) trug *vanB* und zeigte dabei eine enge Verwandtschaft zu Cluster bildenden Isolaten des ST192 dieser Arbeit wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

Tabelle 21: Übersicht der Anteile der *vanA/vanB* Gene des ST192 nach Studie im Vergleich

Autoren	Ort	Probenjahr	Anteil ST192	<i>vanA/vanB</i> Verhältnis
Diese Arbeit	Hessen Rhein-Main	2005-2007	68 %	1:61
Mellmann et al. (2016)	Münster	2013-2015	21,7 %	1:13
Liese et al. (2019)	Baden- Württemberg	2010-2016	4,9 %	1:5,3
Falgenhauer et al. (2019)	Hessen Rhein-Main	2017-2018	1,1 %	nur <i>vanB</i>
Xanthopoulou et al. (2020)	Deutschland	2014-2018	1,6 %	1:1,3
Neumann et al. (2020)	Süddeutschland	2014-2015	9,9 %	nur <i>vanB</i>

5 Diskussion

5.1 Aufgetretene und erwartete VREfm Sequenztypen

Der im Einführungsteil beschriebene und aktuell im Rhein-Main Gebiet^{22,29} wie bundesweit^{6,24} dominierende Klon ST117/CT71 war nicht unter den untersuchten Isolaten dieser Arbeit. Im Rahmen dieser Untersuchung dominierte dagegen der ST192 (68 %, n=127/187) über alle Jahre.

Die in der umfassenden Abhandlung von Werner et. al.⁶ in dem Untersuchungszeitraum dieser Arbeit von 2005 bis 2007 zu erwartenden dominierenden Sequenztypen ST202 (11,2 %, n=21/187), ST18 (7,0 %, n=13/187), ST17 (2,7 %, n=5/187), ST203 (0,5 %, n=1/187) traten in geringerer Anzahl, in Klammern angegeben, in Erscheinung.

5.2 Einordnung des dominierenden Auftretens des ST192 dieser Arbeit in die Populationsstruktur von VREfm in Deutschland

Im Rahmen dieser Analyse dominierte der ST192 in den Jahren 2005 bis 2007, dessen gehäuftes Auftreten sowie Dominanz erst für das Ende der 2000er Dekade im Rahmen eines Ausbruchs an einer Klinik in Südwest-Deutschland durch Werner et al.⁵⁴ und die Jahre nach 2010 beschrieben und von diesem Sequenztyp aufgrund der begrenzten Zahl der veröffentlichten Ausbruchsuntersuchungen nur vereinzelt berichtet wurde.^{6,55,56}

Darüber hinaus berichtete Bayerl⁵⁷ und Meier⁵⁸ 2018 und 2020 aus dem Universitätsklinikum Regensburg und insbesondere aus benachbarten Lehrkrankenhäusern vom dominierenden Auftreten des ST192 in Isolaten der Jahre 2005 bis 2011. Der Höhenpunkt des Anteils des ST192 an allen Isolaten lag 2007 bis 2008 bei 50 %, der ab 2009 jedoch wieder deutlich fiel.

Bereits bekannt war das vereinzelte Auftreten des ST192 in einigen Kliniken auch durch eine Untersuchung von Klare et al.⁵⁹ aus 2005. Weiterhin berichtete diese von Ausbrüchen aus Baden-Württemberg der Jahre 2003 sowie 2004 und einer weiten Verteilung des ST203, der auch in dieser Arbeit, jedoch in geringere Anzahl s.o. in Erscheinung getreten ist.

Diese Arbeit konnte daher zeigen, dass der ST192 auch an größeren lokalen Ausbruchsgeschehen eines Hauses der Maximalversorgung als dominierender Sequenztyp in den Jahren vor 2016 im Rhein-Main-Gebiet vorzufinden war.

Abseits der *vanB* Dominanz des ST192 dieser Arbeit, konnten keine weiteren Beobachtungen wie besondere Virulenzfaktoren oder andere Antibiotika-Resistenzgene für das gehäufte Auftreten dieses Sequenztyps als Ursache ausfindig gemacht werden.

5.3 Vergleich der *van* Gene des ST192 und Einordnung der Dominanz von *vanB* in dieser Arbeit

Entgegen der in den Jahren vor 2010 zu erwartenden *vanA* Dominanz (*vanA/vanB*, 4:1), siehe Abbildung 66 des RKI und der Abhandlung „Thirty years of VRE in Germany – “expect the unexpected” von Werner et al.^{6,60}, trat in dieser Arbeit eine *vanB* Dominanz in Erscheinung. Der Wechsel *vanA* zu *vanB* (*vanA/vanB* shift, 1:4)⁶ sollte sich eigentlich erst Mitte der 2010er Jahre vollziehen, siehe hierzu Abbildung 66, die diesen *vanA/vanB* shift über die Jahre 2006 bis 2019 veranschaulicht.

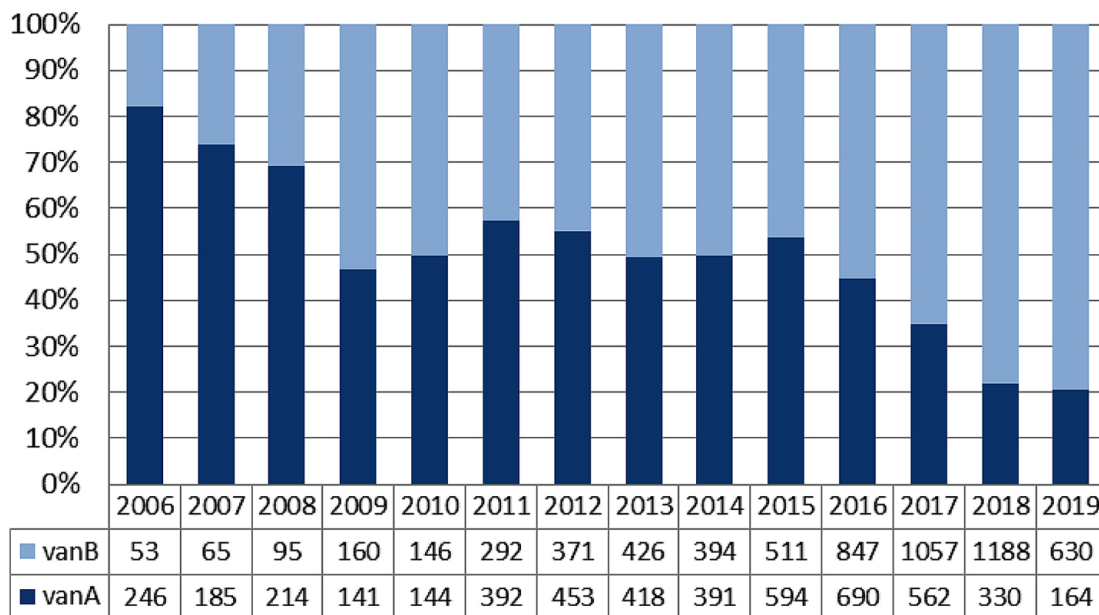


Abbildung 66: „Ratio of *vanA*-type to *vanB*-type *E. faecium* submitted to the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci between 2006 and 2019. The ratio as percentage is given by the color code (light blue = *vanB*; dark blue = *vanA*); the exact numbers of corresponding isolates are shown below. *vanA* and *vanB* positive ($n < 5/\text{year}$) *E. faecium* are not included.“ (Werner et al., 2020, S.5)⁶

Diese für den Zeitraum vor 2010 unerwartete Dominanz des *vanB* Gens war zwar auch auf das gehäufte Auftreten des ST192 (*vanB*: $n=122/125$, 97,6 %) in dieser Arbeit zurückzuführen, jedoch zeigten auch Sequenztypen bzw. Isolate dieser Arbeit mit geringerem Anteil eine *vanB* Dominanz.

Dies waren z.B. der ST262 (*vanB*: $n=10/10$, 100 %), der ST17 (*vanB*: $n=4/5$, 80 %) und geringer in Erscheinung getretene Sequenztypen. Lediglich der ST202 (*vanA*: $n=14/21$, 66,7 %) und ST18 (*vanA*: $n=13/13$, 100 %) zeigten eine Dominanz im Hinblick auf das *vanA* Gen.

Auch Bayerl⁵⁷ berichtete aus dem Universitätsklinikum Regensburg und umliegenden Krankenhäusern für den Zeitraum 2004 bis 2006 von einer Dominanz des *vanB* Gens. Weiterhin setzte sich dieser Trend aus unveröffentlichten Daten von 2004 bis 2010 fort.

Werner et al.^{54,55} und Bender et al. berichteten weiterhin 2012 und 2016 von einer breiteren bundesweiten Verteilung des ST192 und einer klonalen *vanB* Verbreitung für den Beginn der 2010er Jahre, die bis zum Ende der 2010er Dekade wieder fiel.

Ob auch in der hier vorliegenden Arbeit von einer reinen vererbten bzw. klonalen *vanB* Übertragung im Sinne eines vertikalen Gentransfer (VGT) bezüglich der *vanB* Verbreitung ausgegangen werden kann, ist nicht gänzlich sicher, da auch Isolate anderen Sequenztyps mit nicht unerheblichem Anteil *vanB* trugen, wie weiter oben beschrieben.

Des Weiteren sind Vancomycin-Resistenzgene auf mobilen genetischen Elementen (Plasmiden) lokalisiert und damit hätte auch ein möglicher horizontaler Gentransfer (HGT) ursächlich sein können⁶¹.

Sowohl der *vanA* als auch der *vanB* Genotyp sind auf Chromosomen und Plasmiden zu finden¹⁰, jedoch unterscheidet sich die Übertragung zwischen *vanA* und *vanB*.^{61,62}

Für *vanB* ist bekannt, dass dieses eher auf Chromosomen und *vanA* eher auf Plasmiden lokalisiert ist, beide Gene sind jedoch mobil übertragbar, siehe Werner et al.⁶² und Freitas et al.⁶³

Aus den Niederlanden berichtete 2021 Arredondo-Alonso et al.⁶¹ von verwandten VRE-Fällen und der Verbreitung des *vanA* Gens auf Basis einer klonalen Ausbreitung in Kliniken. Dort identifizierte man allerdings auch Ausbrüche mit hoher Verbreitung von Plasmiden, bei denen die Ausbreitung des *van* Gens hauptsächlich durch horizontalen Gentransfer (HGT) vorangetrieben wurde.

Ein möglicher horizontaler Gentransfer (HGT) des *van* Gens könnte daher ebenso ursächlich sein und wurde bereits im Jahr 1999 durch Suppola et al.⁶⁴ im Rahmen einer Untersuchung in Finnland für die Integration des *vanA* und *vanB* Gens in endemische Vancomycin sensible Enterokokken erwogen.

Weitere ganzgenombasierte Studien zum horizontalen Gentransfer (HGT) von Virulenzfaktoren und Resistenzgenen von Enterokokken der darauffolgenden Jahre wie von Palmet et al.⁶⁵ zeigten, dass viele der besonders pathogenen nosokomialen Eigenschaften von *E. faecium* mittels Konjugation übertragen werden und damit über Plasmide.

Die plasmidbasierte Konjugation vermittelt so die effiziente Übertragung von Antibiotika-Resistenzen, aber auch Virulenzfaktoren. So wurde gar 1992 durch Noble et al.⁶⁶ von der konjugativen Übertragung einer Vancomycin-Resistenz von Enterokokken auf Staphylokokken berichtet (Vancomycin resistenter *Staphylococcus aureus* (VRSA)).

Der Erklärungsansatz dürfte daher für die *van* Verbreitung und unerwartete Dominanz in dieser Arbeit gegenüber Vergleichsdaten desselben Zeitraums, sowohl im horizontalen als auch im vertikalen Gentransfer liegen und trotz der Dominanz des ST192-*vanB* in dieser Arbeit, muss nicht unbedingt ein rein klonaler Ausbruch ursächlich sein, obwohl dies auf den ersten Blick naheliegen mag.

Zu berücksichtigen ist auch eine mögliche Untererfassung des *vanB* Gens in dieser Zeit. Die direkte selektive Sammlung von Proben auf Nährmedien mit hoher Vancomycin-Konzentration könnte eine Untererfassung von VREfm Stämmen begünstigt haben, die nur eine geringe Resistenz-Expression aufwiesen, wie das für *vanB* im Vergleich zu *vanA* auch typisch ist, siehe hierzu Courvalin et al.¹⁰.

In den Isolaten dieser Arbeit erfolgte die klinische Sammlung 2005 bis 2007 auf BHI-Platten mit einer Vancomycin-Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und die Kultivierung nach Kryokonservierung auf Agar-Agar Platten im Labor mit einer Vancomycin-Konzentration von $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$.

Werner et al.⁶⁰ berichtete 2008 in einer bereits angeführten Untersuchung der Jahre 2004 bis 2006 von einer horizontalen Verbreitung und Dominanz an VREfm Isolaten mit *vanA*. Eine Beobachtung, die der umfassenden Untersuchung⁶ desselben Autors aus der Abbildung 66 weiter oben stammt, entsprach.

In besagter Studie aus 2008 wurde eine Vorselektion von Isolaten mit einer Empfindlichkeitstestung bei einer Vancomycin-Konzentration von $\geq 16 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ vorgenommen. Daher ist es durchaus möglich, dass in der Zeit aus der die Isolate dieser Arbeit stammten, ein nicht unwesentlicher Teil der Isolate mit *vanB* Gen nicht in der Statistik aus Abbildung 66 erfasst wurden.

Dies hätte eine Verzerrung der *vanA/vanB* Gen Verhältnisse begünstigt bzw. begründet, den Werner et al.⁵⁴ durch eine Untersuchung aus 2012 mit Isolaten der Jahre 2008 und 2009 einer neonatologischen Intensivstation auch selbst erwähnte.

Bayerl führte diese Beobachtung einer Studie des Universitätsklinikums Regensburg zur lokalen VREfm Epidemiologie als möglichen Grund ebenso aus.⁵⁷

5.4 Einordnung des Auftretens des ST202 dieser Arbeit in die Populationsstruktur von VREfm in Deutschland

Der im Rahmen dieser Analyse am zweithäufigsten aufgetretene ST202 (11,2 %, n=21/187) verzeichnete von 2005 bis 2007 einen kontinuierlichen Anstieg und dessen Auftreten wurde durch Werner et al. in Berlin dominierend als *vanA* beschrieben.^{6,67}

Dieser trat bereits in einer Untersuchung aus 2009 gewonnenen Isolaten einer Klinik in Südwestdeutschland in Erscheinung.⁵⁴ Von allen 21 ST202 Isolaten dieser Arbeit trugen 66,7 % (n=14/21) *vanA* und 33,3 % (n=7/21) *vanB*.

Das Auftreten des ST202 im Jahr 2008 wurde auch durch einer Untersuchung von Bayerl⁵⁷ und Meier⁵⁸ in 2018 und 2020 des Universitätsklinikums Regensburg beschrieben.

5.5 Dynamische Populationsstruktur von VREfm in Deutschland

Bereits 2019 wurde keines der Blutstrom-Infektions-Isolate am NRZ für Enterokokken des RKI mehr als ST192 typisiert. Dagegen stieg der Anteil des ST117/CT71, ST80/CT1065 und ST78 an den eingesendeten Isolaten an das NRZ des RKI kontinuierlich in der 2010er Dekade.⁶ Diesen Anstieg zeigten auch die jüngsten regionalen Untersuchungen von Falgenhauer et al.^{22,29} im Rhein-Main-Gebiet und Weber et al.²⁴ aus Berlin.

Die stetige Zunahme der VRE Prävalenz in Deutschland lässt sich sowohl auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit als auch vor dem Hintergrund des Vergleichs mit anderen bundesweiten Studien⁶ als außergewöhnlich charakterisieren. Es war bundesweit zunächst durch das Auftreten und Verschwinden, wie des dominierenden Sequenztyps ST192 dieser Arbeit, von spezifischen Sequenztypen und Complexotypen in verschiedenen Jahren bzw. Quinquennien und Dekaden als Zeiträumen auszugehen, was für eine lebhaftige Dynamik im Hinblick auf die genomische Populationsstruktur von VREfm in Deutschland sprach.

Es zeigt sich heute eine Dominanz des *vanB* Gens über das *vanA* Gen und dazu eine Verbreitung und Dominanz einer klonalen VREfm Linie, nämlich die des ST117/CT71.

Die Fortschritte in der WGS-Technologie bieten nun die Möglichkeit mittels genombasierter Surveillance und genetischen Fingerabdrücken die Persistenz, die sich weiter entwickelnde Prävalenz dieses Sequenztyps, aber auch die Gründe für sein dominierendes Auftreten weiter in zukünftigen Studien und Untersuchungen im Blick zu behalten.

5.6 Limitationen

Als größte Limitation für dieser Arbeit zur Ganzgenomsequenzierung und Typisierung von VREfm Isolaten, müssen fehlende klinische Informationen zu Patienten wie Alter, Geschlecht, Diagnosen, (medikamentöse) Therapie, insbesondere Antibiotika(-vor-)Behandlung, Station und Fachbereich, Liegedauer sowie vorbehandelnde medizinische Kliniken betont werden, um das lokale Ausbruchsgeschehen besser beurteilen zu können.

Die Isolate wurden zwar aus einem bedeutenden Haus der Maximalversorgung mit großem Einzugsgebiet im Rhein-Main Gebiet kollektiert, ein umfassenderes Bild hätten jedoch Isolate aus mehreren Kliniken der damaligen Zeit geliefert.

Weiterhin stammten die in dieser Arbeit untersuchten Isolate aus den Jahren 2005 bis 2007, also aus einer Zeit, in der die WGS gestützte cgMLST Typisierung noch nicht Standard war und daher keine bzw. kaum Vergleichsarbeiten und ganzgenombasierte Vergleichsdaten in Form von genetischen Fingerabdrücken zur komparativen Analyse vorlagen.

Daher musste im Hinblick auf die allelbasierte bzw. genomische komparative Clusteranalyse bei größerem zeitlichem Abstand auf Arbeiten und Daten der späten 2010er und frühen 2020er Dekaden zurückgegriffen werden, in denen andere ST/CT Typen dominierten. Dies schränkte die Aussagekraft hinsichtlich der Einordnung der Isolate dieser Arbeit in die damalige VREfm Populationsstruktur ein.

Für die Jahre 2005 bis 2007 konnte zur Einordnung und Beurteilung der damaligen Populationsstruktur daher lediglich auf Arbeiten zurückgegriffen werden, die sich der PCR gestützten MLST bedienten und daher im Vergleich deutlich weniger diskriminativ waren.

Nichtsdestotrotz konnte die komparative ganzgenombasierte cgMLST Analyse von Isolaten dieser Arbeit mit Isolaten aus Arbeiten mit größerem zeitlichem Abstand zeigen, dass auch über größere Zeiträume und unterschiedliche Complexotypen hinweg, enge genomische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Isolaten bei wenigen Allelen Unterschied bestehen, was die angeführte Dynamik der Populationsstruktur und Relevanz der WGS unterstreicht.

5.7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Analyse zur breiteren Sub-Differenzierung von Sequenztypen (MLST) in Complexotypen (cgMLST), unter anderem des in dieser Arbeit dominierenden ST192, stellte anhand eines lokalen Ausbruchsgeschehens unter Beweis, dass hochauflösende ganzgenombasierte Typisierungsmethoden mittels cgMLST eine umfassende Diskriminierung in CT-Subtypen erlaubten.

Die so generierten genetischen Fingerabdrücke können dazu dienen, Ausbrüche insbesondere auf lokaler Ebene besser zu analysieren, zu verstehen und überregional einzuordnen und darüber hinaus vermeintliche Verwandtschaftsverhältnisse zwischen MLST-Typen auszuschließen.

Trotzdem sind zur eindeutigen patientenbezogenen Zuordnung von nosokomialen Infektionen einer Klinik weitere Fortschritte in der ganzgenombasierten Typisierung erforderlich, um die cgMLST allelbasierte Typisierung von 1423 Genen⁴¹ im Fall von *E. faecium* auf das gesamte Genom auszuweiten.

Nichtsdestotrotz bringt dies das Potential der hochauflösenden cgMLST Typisierung auf WGS-Basis auch für örtlich und zeitlich auseinander liegende bzw. überregionale Ausbruchsgeschehen zum Ausdruck.

Klare et al. warnte bereits 2017 vor dem bekannten und begrenzten MLST Auflösungsvermögen und dem Risiko von daraus falsch abgeleiteten Rückschlüssen auf die Populationsstruktur und Verwandtschaftsverhältnisse von Sequenztypen und Isolaten in und zwischen Ausbrüchen im Epidemiologischen Bulletin des RKI.⁶⁸

In Folge wurde auch am Nationalen Referenzzentrum für Enterokokken am RKI 2017 angekündigt, für zukünftige phylogenetische Vergleichsanalysen auf Whole-Genome-Sequencing Technologien (WGS) und deren Datenverarbeitung mittels cgMLST vermehrt zu setzen.⁶⁸ Ab 2015 wurden bereits alle *E. faecium* Blutkulturisolat aus invasiven Infektionen mittels WGS analysiert.⁶⁹

Diese Arbeit verdeutlichte darüber hinaus, dass es perspektivisch auch lohnend sein kann, ältere kryokonservierte Isolate von Ausbrüchen, wie am Beispiel der limitierten Zahl an Veröffentlichungen und Daten zu VREfm Ausbrüchen zu Beginn der 2000er, retrospektiv der Ganzgenomsequenzierung zuzuführen und mittels moderner bioinformatischer Tools wie der cgMLST Typisierung nachträglich zu untersuchen.

Dies brachte unerwartete Ergebnisse im Hinblick auf die *van* Gen Verhältnisse zum Vorschein, wie auch diese Arbeit zeigte.

Eine nachträgliche Untersuchung von Isolaten kann auch dabei helfen, die Zeiträume im Hinblick auf das Auftreten und Verschwinden von Sequenz- bzw. Complexotypen besser zu verstehen, um daraus mögliche Prognose für die Zukunft abzuleiten.

Die Generierung von genomischen Fingerabdrücken kann so rückblickend einen Beitrag zum besseren Verständnis von Populationsstruktur, Epidemiologie sowie Entwicklung von Sequenztypen respektive Complexotypen leisten.

Fortschritte sind, auch und insbesondere auf ganzgenombasierten Analysen abseits der allelbasierten Typisierung, noch bezüglich der Ursachenforschung für das Auftreten und die Dominanz spezifischer Sequenz-/Complexotypen wie des aktuell dominierenden ST117/CT71/*vanB* erforderlich. Eine kontinuierliche genombasierte Surveillance ist daher unabdingbar, um die VREfm Epidemiologie neben der Ursachenforschung und damit auch den Erfolg lokaler Hygienemaßnahmen im Blick zu behalten.

„Expect the unexpected“ (Werner et al.⁶) im Hinblick auf VREfm, dem reiht sich das Ergebnis dieser Untersuchung zu einer früheren Etappe einer epidemiologischen Reise ein, deren Ziel weiterhin ungewiss ist.

6 Zusammenfassung

Seit 1990 von ersten Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) Fällen in Deutschland berichtet wurde, ist eine stetige Zunahme des Anteils von Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium* (VREfm) an nosokomialen Infektionen und damit einhergehenden schweren Enterokokken-assoziierten Infektionen zu verzeichnen.

Der ganzgenombasierten Surveillance der Populationsstruktur wird dabei eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Beobachtung der Ausbruchsdynamiken, aber auch bezüglich der geschichtlichen Populationsstruktur auf molekularer Ebene zu Teil.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für 187 VREfm Isolate aus dem Rhein-Main-Gebiet genetische Fingerabdrücke bestimmt werden. Die Isolate stammten aus den Jahren 2005, 2006 sowie 2007 und damit aus einer Zeit, über die bisher wenig im Hinblick auf die lokal dominierenden Sequenz- sowie Complexotypen bekannt war. Durch diese Arbeit konnte damit eine regionale episodische Lücke bezüglich der genombasierten Surveillance von VREfm geschlossen werden. Ergebnis war die Dominanz des ST192 Sequenztyps (68 %) über alle Jahre (2005-2007), dessen gehäuftes Auftreten erst für das Ende der 2000er Dekade und die Jahre nach 2010 beschrieben wurde.

Dies lag vornehmlich an der begrenzten Zahl an ganzgenombasierten veröffentlichten Ausbruchsuntersuchungen aus dem Rhein-Main Gebiet. Der Vergleich der gewonnen genomischen Fingerabdrücke aus 2005-2007 mit aktuellen Ganzgenomdaten zeigte jedoch, dass teilweise nur wenige Allele Unterschied zwischen Isolaten des gleichen ST192 Sequenztyp-/Complexotyps, trotz größeren zeitlichen Abstands zwischen den Probenjahren, bestand. Ein weiteres unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit war eine *vanB* Dominanz entgegen der eigentlich in den Jahren vor 2010 zu erwartenden *vanA* Dominanz (*vanA/vanB*, 4:1).

Bereits 2019 wurde keines der Blutstrom-Infektions-Isolate am NRZ für Enterokokken des RKI mehr als ST192 typisiert. Es ist bundesweit daher durch das Auftreten und Verschwinden von spezifischen Sequenztypen und Complexotypen in verschiedenen Jahren bzw. Quinquennien und Dekaden als Zeiträumen auszugehen, was für eine lebhaftere Dynamik im Hinblick auf die genomische Populationsstruktur von VREfm in Deutschland spricht.

Der aktuell im Fokus stehende und im Rhein-Main Gebiet wie bundesweit dominierende Klon ST117/CT71, war nicht unter den untersuchten Isolaten dieser Arbeit. Die in dem Untersuchungszeitraum dieser Arbeit 2005 bis 2007 zu erwartenden dominierenden Sequenztypen ST202, ST18, ST17, ST203, traten in geringerer Anzahl in Erscheinung.

Die in dieser Arbeit erfolgte Sub-Differenzierung von Sequenztypen (MLST) in Complexotypen (cgMLST), dies waren mit den größten Anteilen die Complexotypen ST192/CT171 und ST192/CT3, stellte unter Beweis, dass hochauflösende Typisierungsmethoden mittels cgMLST eine umfassende Diskriminierung in CT-Subtypen erlaubten.

Die generierten genomischen Fingerabdrücke können dazu dienen Ausbrüche, insbesondere auf lokaler Ebene, besser zu diskriminieren sowie überregional einzuordnen und darüber hinaus vermeintliche Verwandtschaftsverhältnisse zwischen MLST-Typen auszuschließen. Dies bringt das Potential der hochauflösenden cgMLST Typisierung auch für örtlich und zeitlich auseinander liegende bzw. überregionale Ausbruchsgeschehen zum Ausdruck.

Diese Arbeit zeigte zudem, dass es auch lohnend sein kann, ältere Isolate von Ausbrüchen, wie am Beispiel der limitierten Zahl an Veröffentlichungen und Daten zu VREfm Ausbrüchen zu Beginn der 2000er, der Ganzgenomsequenzierung zuzuführen und mittels moderner bioinformatischer Methoden nachträglich zu untersuchen.

Die Generierung von genomischen Fingerabdrücken kann so retrospektiv einen Beitrag zum besseren Verständnis von Populationsstruktur und Epidemiologie leisten.

7 Abstract

Since the first cases of vancomycin-resistant enterococci (VRE) were reported in Germany in 1990, there has been a steady increase in the proportion of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in nosocomial infections and the associated severe enterococci infections. The whole genome-based surveillance of the population structure plays an important role with regard to the observation of the outbreak dynamics and the historical population structure at the molecular level.

In the course of this work, genetic fingerprints for 187 VREfm isolates from the Rhine-Main area were determined. The isolates came from the years 2005, 2006 and 2007 and thus from a time about which little was known about the locally dominant multilocus sequence and complex types. This work closed a regional episodic gap in genome-based surveillance of VREfm.

The result was the dominance of the ST192 sequence type (68%) over all years (2005-2007), whose frequent occurrence was only described for the end of the 2000s decade and the years after 2010. This was primarily due to the limited number of whole-genome-based published outbreak investigations from the Rhine-Main area.

However, the comparison of the obtained genomic fingerprints from 2005-2007 with current whole genome data showed that in some cases only a few alleles differed between isolates of the same ST192 sequence type/complex type, despite a larger time interval between the sample years. Contrary to the *vanA* dominance (*vanA/vanB*, 4:1) to be expected in the years before 2010, a *vanB* dominance appeared in this work.

As early as 2019, none of the bloodstream infection isolates at the NRZ for enterococci from the RKI were typed more than ST192. It can therefore be assumed that specific sequence types and complex types appear and disappear in different years or quinquennia and decades as periods of time nationwide, which speaks for a lively dynamic regarding the genomic population structure of VREfm in Germany.

The clone ST117/CT71, which is currently in focus and dominates in the Rhein-Main area as well as nationwide, was not among the isolates examined in this work. The dominating sequence types ST202, ST18, ST17, ST203 to be expected in the investigation period of this work from 2005 to 2007 appeared in smaller numbers.

The sub-differentiation of sequence types (MLST) into complex types (cgMLST) carried out in this work, these being the complex types ST192/CT171 and ST192/CT3 with the largest proportion, proved that high-resolution typing methods using cgMLST can provide comprehensive discrimination in CT subtypes.

The generated genomic fingerprints can be used to better discriminate outbreaks, especially at the local level, to classify them supra-regionally and to rule out supposed relationships between isolates of identical MLST types. This also expresses the potential of high-resolution cgMLST typing for outbreaks that are different in terms of location and time or are supra-regional.

This work also made it clear that it can also be worthwhile to retrospectively analyze older isolates from outbreaks by whole-genome sequencing, such as the limited number of publications and data on VREfm outbreaks at the beginning of the 2000s and using modern bioinformatic tools such as the cgMLST typing to examine types afterwards.

In retrospect, the generation of genomic fingerprints can contribute to a better understanding of the population structure, the epidemiology and the development of VREfm sequence types and complex types.

8 Abkürzungsverzeichnis

BHI	Brain heart infusion
cgMLST	Core genom Multilocus sequence typing
CT	Complexotypen generiert nach cgMLST Schema
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HGT	Horizontaler Gentransfer
MLST	Multilocus sequence typing
NGS	Next-Generation Sequencing
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken
PFGE	Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese
RKI	Robert Koch-Institut
ST	Sequenztyp generiert nach MLST Schema
vanA	Glykopeptid-Resistenz-Typ A: Vancomycin Resistenz mit Teicoplanin Kreuzresistenz
vanB	Glykopeptid-Resistenz-Typ B: Vancomycin Resistenz
VGT	Vertikaler Gentransfer
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREfm	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
WGS	Whole-Genome Sequencing

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur DNA-Sequenzierung auf Basis der NGS-Plattform der Firma Illumina Inc.	4
Abbildung 2: Workflow zur Generierung genomischer Fingerabdrücke.....	11
Abbildung 3: Übersicht der Arbeitsschritte zur DNA-Aufreinigung nach der PureLink® Spin Column Mini Kit basierten Methode (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc., 2007).	11
Abbildung 4: Workflow zur genombasierten Analyse und Verarbeitung der Ganzgenomsequenzdaten	13
Abbildung 5: Paired-End Sequenzierung (linke Hälfte) in Vorwärts- und Rückwärts-Leserichtung entlang des DNA-Strangs und Alignment (rechte Hälfte) zur Zusammenführung sich wiederholender Regionen bei bekanntem R1-R2-Abstand. ..	13
Abbildung 6: Merging-Schema zur Zusammenführung der 8 FASTQ-Dateien pro Isolat mit 4 FASTQ-Dateien pro Leserichtung (R1 und R2) zur weiteren Datenanalyse.	14
Abbildung 7: Allgemeine Vorgehensweise bzw. Pipeline der Seqsphere+ Software (Ridom GmbH, 2022, erstellt und bearbeitet nach URL: https://www.ridom.de/u/General_Procedure.html) ³¹	15
Abbildung 8: Anteile der cgMLST Good Targets (≥ 95 % grün, ≥ 90 % und <95 % gelb, < 90 % rot).....	19
Abbildung 9: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=187) in Prozent von 2005 bis 2007.....	20
Abbildung 10: Übersicht der absoluten Anzahl der ST (Sequenztypen, n=187) in den Jahren 2005 bis 2007.....	20
Abbildung 11: Entwicklung des Anteils der Sequenztypen (ST) in Prozent in den Jahren 2005, 2006, 2007.	21
Abbildung 12: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) und zugehörigen Complextypen (CT) der Isolate (n=187) in Prozent von 2005 bis 2007.....	22
Abbildung 13: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexypen (ST/CT, n=187) in den Jahren 2005 bis 2007. Legende sortiert nach Häufigkeit.	23
Abbildung 14: Übersicht der Sequenz-/Complexypen (ST/CT) der Isolate (n=187) in den Jahren 2005, 2006, 2007 bestimmt mittels cgMLST-Schemas für <i>E. faecium</i> nach 1423 Kerngenen, siehe de Been 2015. ⁴¹	24
Abbildung 15: Verhältnisse der <i>vanA/vanB</i> VREfm Genotypen über die Jahre 2005 bis 2007.....	25

Abbildung 16: Anteile der ST/CT Typen an den <i>vanA/vanB</i> VREfm Genotypen in den Jahren 2005 bis 2007.....	26
Abbildung 17: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) dieser Arbeit.....	27
Abbildung 18: Entwicklung der prozentualen Anteile der Antibiotikaklassen spezifischen Resistenzgene der Isolate in den Jahren 2005, 2006, 2007.	29
Abbildung 19: Entwicklung der prozentualen Anteile der spezifischen <i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren <i>acm</i> , <i>ecbA</i> , <i>scm</i> , <i>sgrA</i> der Isolate in den Jahren 2005, 2006, 2007..	30
Abbildung 20: Phylogenetische zirkuläre Übersichts-Darstellung aller 187 typisierten Isolate auf Basis eines Neighbor-Joining-Trees.....	31
Abbildung 21: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen in Anlehnung an die Arbeiten von Falgenhauer et al. ^{22,29} definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	32
Abbildung 22: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 1 der Gesamtübersicht aus Abbildung 21 Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	34

Abbildung 23: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 2 der Gesamtübersicht aus Abbildung 20.

Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 35

Abbildung 24: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 8, 9 und 10 der Gesamtübersicht aus Abbildung 21. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 36

Abbildung 25: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen repräsentieren die Allelunterschiede zwischen Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 38

Abbildung 26: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 1 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25.

Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 39

Abbildung 27: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 2 und 3 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 40

Abbildung 28: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 4 und 5 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 41

Abbildung 29: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 6 und 8 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 42

Abbildung 30: Minimum spanning tree (MST) des Clusters 7 der Gesamtübersicht aus Abbildung 25. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die der Linien zugehörigen Zahlen definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland³¹ und Inkscape, Inkscape Project³².

..... 43

Abbildung 31: Gesamtanteile der ST der Isolate (n=198, Probenjahre: 2013-2015) von Mellmann et al. ⁴⁷ (2016) in Prozent.	44
Abbildung 32: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=198, Probenjahre: 2013-2015) der Studie von Mellmann et al. ⁴⁷ (2016).	45
Abbildung 33: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) der Studie von Mellmann et al. ⁴⁷ (2016). Die Isolate stammten aus den Jahren 2013-2015.	47
Abbildung 34: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=772, Probenjahre: 2010-2016) von Liese et al. ²³ (2019) in Prozent.....	48
Abbildung 35: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=772, Probenjahre: 2010-2016) der Studie von Liese et al. (2019) ²³	49
Abbildung 36: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) der Studie von Liese et al. ²³ (2019). Die Isolate stammten aus den Jahren 2010-2016.	50
Abbildung 37: Gesamtanteile der (ST) Sequenztypen der Isolate (n=42, Probenjahr: 2016) von Eichel et al. ²⁷ (2020) in Prozent.	51
Abbildung 38: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=42, Probenjahr: 2016) der Studie von Eichel et al. ²⁷ (2020).	52
Abbildung 39: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den (ST) Sequenztypen der Studie von Eichel et al. (2020). Die Isolate stammten aus dem Jahr 2016.....	53
Abbildung 40: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=111, Probenjahre: 2014-2015) von Neumann et al. ²⁶ (2020) in Prozent.....	54
Abbildung 41: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=111, Probenjahre: 2014-2015) der Studie von Neumann et al. ²⁶ (2020).	55
Abbildung 42: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den (ST) Sequenztypen der Studie von Neumann et al. ²⁶ (2020). Die Isolate stammten aus dem Jahr 2014-2015.	57
Abbildung 43: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=97, Probenjahre: 2018-2019) von Eisenberger et al. ²⁸ (2020) in Prozent.	58
Abbildung 44: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=97, Probenjahre: 2018-2019) der Studie von Eisenberger et al. ²⁸ (2020).	59
Abbildung 45: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den (ST) Sequenztypen der Studie von Eisenberger et al. ²⁸ (2020). Die Isolate stammten aus den Jahren 2018-2019.	60

Abbildung 46: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=94, Probenjahre: 2017-2018) von Falgenhauer et al. ²² (2019) in Prozent.	61
Abbildung 47: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=94, Probenjahre: 2017-2018) der Studie von Falgenhauer et al. ²² (2019).	62
Abbildung 48: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) der Studie von Falgenhauer et al. ²² (2019). Die Isolate stammten aus den Jahren 2017-2018. ...	63
Abbildung 49: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=55, Probenjahre: 2016-2018) von Falgenhauer et al. ²⁹ (2021) in Prozent.	64
Abbildung 50: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=55, Probenjahre: 2016-2018) der Studie von Falgenhauer et al. ²⁹ (2021).	65
Abbildung 51: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) der Studie von Falgenhauer et al. ²⁹ (2021). Die Isolate stammten aus den Jahren 2016-2018. ...	65
Abbildung 52: Gesamtanteile der Sequenztypen (ST) der Isolate (n=636, Probenjahre: 2014-2018) von Xanthopoulou et al. ²⁵ (2020) in Prozent.	66
Abbildung 53: Übersicht der absoluten Anzahl der MLST/cgMLST Typen bzw. Sequenz-/Complexotypen (ST/CT, n=636, Probenjahre: 2014-2018) der Studie von Xanthopoulou et al. ²⁵ (2020).	68
Abbildung 54: Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen an den Sequenztypen (ST) der Studie von Xanthopoulou et al. ²⁵ (2020). Die Isolate stammten aus den Jahren 2014-2018. .	69
Abbildung 55: Minimum spanning tree (MST) der 187 Isolate dieser Arbeit aus 2005-2007 auf Basis von MLST/cgMLST Typisierung im Vergleich zu den Isolatentypen aus 2016-2018 von Falgenhauer et al. ^{22,29} , gestrichelter Rahmen. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom SeqSphere+ definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den ST-Typen nach Legende links. Die farblich schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolatentypen. Allelunterschiede zwischen dieser und der Analyse von Falgenhauer et al. unter Angabe der Alleldifferenz in rot. Ridom SeqSphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	72

Abbildung 56: Vergrößerte Darstellung des Clusters 6 aus der Gesamtdarstellung in Abbildung 55 in Form eines minimum spanning tree (MST) mit ST192/CT10 und ST192/CT294 Isolaten dieser Arbeit aus 2006-2007 im Vergleich zu den Isolaten aus 2017-2018 von Falgenhauer et al. ²² , gestrichelter Rahmen. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom Seqsphere+ definiert. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	73
Abbildung 57: Vergleich der in dieser Studie aufgetretenen Sequenztypen (ST) mit anderen Studien unter Angabe des Publikationsjahrs in Klammern und Probenjahre der Isolate nach Doppelpunkt.	75
Abbildung 58: Vergleich der in dieser Studie und anderen Studien aufgetretenen Complextypen (CT) des jeweiligen Sequenztyps (ST).	78
Abbildung 59: Gesamtdarstellung des minimum spanning trees (MST) mit 2192 Isolaten. 187 Isolate dieser Arbeit aus 2005-2007 und 2005 Isolate aus Deutschland auf Basis von MLST/cgMLST. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen nach Standardeinstellungen von Ridom Seqsphere+ definiert. Die Farben der Kreise entsprechen den Studien nach Legende links. Die coloriert schattierten Farben der Linien, Kreise und Clusterbeschriftungen symbolisieren die zugehörigen Cluster. Die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der zugehörigen Isolate ohne Allelunterschiede wider. Die Länge der Linien und die zugehörige Zahl definieren die Allelunterschiede zwischen den Isolaten. ST und CT in den Kreisen angegeben, jedoch nicht sichtbar. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	83
Abbildung 60: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit jenen Clustern 3, 11 und 18 (umrahmt in gestrichelter Linie), die sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurden. Dazu Angabe der Sequenz- und Complextypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	84
Abbildung 61: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimum spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 3, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complextypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende links. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	85

Abbildung 62: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimus spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 11, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	87
Abbildung 63: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts des minimus spanning trees (MST) von Abbildung 59 mit Cluster 18, das sowohl durch Isolate dieser Arbeit als auch durch Isolate anderer Arbeiten formiert wurde. Dazu Angabe der Sequenz- und Complexotypen des jeweiligen Clusters mit farbiger Markierung der Publikation nach Legende rechts. Angabe der Alleldifferenz auf den Verbindungslinien. Ridom Seqsphere+, Ridom GmbH, Münster, Deutschland ³¹ und Inkscape, Inkscape Project ³²	88
Abbildung 64: Übersicht der <i>vanA/vanB</i> Gesamtanteile nach Studie im Vergleich.....	90
Abbildung 65: Übersicht der <i>vanA/vanB</i> Anteile des ST192 nach Studien im Vergleich	90
Abbildung 66: „Ratio of <i>vanA</i> -type to <i>vanB</i> -type <i>E. faecium</i> submitted to the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci between 2006 and 2019. The ratio as percentage is given by the color code (light blue = <i>vanB</i> ; dark blue = <i>vanA</i>); the exact numbers of corresponding isolates are shown below. <i>vanA</i> and <i>vanB</i> positive ($n < 5$ /year) <i>E. faecium</i> are not included.“ (Werner et al., 2020, S.5) ⁶	93
Abbildung 67: Hochauflösende phylogenetische zirkuläre Darstellung aller 187 typisierten Isolate auf Basis eines Neighbor-Joining-Trees unter Angabe Angabe (innen nach außen) der Isolatenummer, des Jahres, des Sequenztyps (ST), des Complexotyps (CT) sowie der <i>vanA/vanB</i> Gene.	134

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Labor-/Datenverarbeitungs-Geräte sowie Hersteller.....	8
Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial sowie Hersteller.	9
Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien sowie Hersteller.....	9
Tabelle 4: Übersicht der Ganzgenom-Sequenzdaten für VREfm in Deutschland aus relevanten Veröffentlichungen, die zur komparativen genombasierten Analyse herangezogen wurden.....	17
Tabelle 5: Übersicht der 162 von 187 Isolaten, die einem Cluster auf Basis von MLST/cgMLST Genotypisierung zugeordnet wurden. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 10 cgMLST Allelen und eine Mindestzahl von 2 Isolaten pro Cluster nach Standardeinstellungen definiert.	33
Tabelle 6: Übersicht der 173 von 187 Isolaten, die einem Cluster auf Basis von MLST/cgMLST Genotypisierung zugeordnet wurden. Zur Berechnung der Cluster wurde ein Schwellenwert von 20 cgMLST Allelen und eine Mindestzahl von 2 Isolaten pro Cluster nach Standardeinstellungen definiert.	37
Tabelle 7: Übersicht der 18 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Mellmann et al. ⁴⁷ unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	45
Tabelle 8: Übersicht der 198 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Mellmann et al. ⁴⁷ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	46
Tabelle 9: Übersicht der 39 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Liese et al. unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.....	49
Tabelle 10: Übersicht der 9 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Neumann et al. unter Angabe der (ST) Sequenztypen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	55
Tabelle 11: Übersicht zu Kapitel 4.8.4 der 111 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Neumann et al. unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	56
Tabelle 12: Übersicht der 37 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Xanthopoulou et al. ²⁵ unter Angabe der Sequenztypen (ST), der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	67

Tabelle 13: Übersicht der Isolate aus Veröffentlichungen, die zur komparativen genom-basierten Analyse herangezogen wurden.	70
Tabelle 14: Übersicht der in dieser Studie aufgetretenen Sequenztypen (ST) im Vergleich zu anderen Studien. Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines Sequenztyps in einer Studie.....	74
Tabelle 15: Übersicht der in dieser Studie und anderen Studien aufgetretenen Complextypen (CT) der jeweiligen Sequenztypen (ST). Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines ST/CT in einer Studie. Nicht vorgekommene ST bzw. deren CT wurden exkludiert.	77
Tabelle 16: Übersicht der Cluster des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs der VREfm Isolate unter Angabe der Clusternummer, Anzahl der Isolate n, Sequenztyp/Complexyp (ST/CT) und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.....	80
Tabelle 17: Übersicht des Clusters 3 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.	86
Tabelle 18: Übersicht des Clusters 10 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.	87
Tabelle 19: Übersicht des Clusters 18 des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs unter Angabe des Sequenztyp/Complexyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.	88
Tabelle 20: Übersicht der <i>vanA/vanB</i> Gesamtverhältnisse, dominierenden Sequenztypen (ST) und deren <i>vanA/vanB</i> Verhältnisse nach Studie im Vergleich.	89
Tabelle 21: Übersicht der Anteile der <i>vanA/vanB</i> Genotypen des ST192 nach Studie im Vergleich	91
Tabelle 22: Übersicht der Antibiotika-Resistenzgene der Isolate mit Nr., Jahr, ST/CT Typ und unter Angabe der zugehörigen Antibiotikaklassen. Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines Gens.	122
Tabelle 23: Übersicht der Virulenzfaktoren/-gene <i>acm</i> , <i>ecbA</i> , <i>scm</i> , <i>sgrA</i> für <i>E. faecium</i> nach VFDB ⁴⁴ der Isolate mit Angabe der Nr., Jahr, ST/CT Typ. Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines Gens. Geordnet nach ST.	126
Tabelle 24: Übersicht zu Kapitel 4.2.2 der 180 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Liese et al. ²³ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.	128

Tabelle 25: Übersicht zu Kapitel 4.2.7 der 293 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl. 130

Tabelle 26: Übersicht zu Kapitel 4.3.4 der übrigen Cluster mit <3 Isolaten des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs der VREfm Isolate unter Angabe der Clusternummer, Anzahl der Isolate n, Sequenztyp/Compelxtyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert..... 133

11 Literaturverzeichnis

1. Gatermann S. Enterokokken und weitere katalasenegative grampositive Kokken. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2020:281-284. doi:10.1007/978-3-662-61385-6_27
2. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*. 2009;155(6):1749-1757. doi:10.1099/mic.0.026385-0
3. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2012;55(11-12):1387-1400. doi:10.1007/s00103-012-1564-6
4. Remschmidt C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7(1):54. doi:10.1186/s13756-018-0353-x
5. Mischnik A, Werner G, Bender J, Mutters N. Enterokokken mit speziellen Resistenzen – Epidemiologie, Hygiene und Therapie. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. 2019;144(08):553-560. doi:10.1055/a-0655-6454
6. Werner G, Neumann B, Weber RE, et al. Thirty years of VRE in Germany – “expect the unexpected”: The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. *Drug Resist Updat*. 2020;53:100732. doi:10.1016/j.drug.2020.100732
7. Gastmeier P, Schroder C, Behnke M, Meyer E, Geffers C. Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1660-1664. doi:10.1093/jac/dku035
8. Kresken M, Klare I, Wichelhaus TA, et al. Glycopeptide resistance in Enterococcus spp. and coagulase-negative staphylococci from hospitalised patients in Germany: occurrence, characteristics and dalbavancin susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;28:102-107. doi:10.1016/j.jgar.2021.12.016
9. Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol Microbiol*. 1996;21(1):33-44. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.00617.x
10. Courvalin P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin Infect Dis*. 2006;42(Supplement_1):S25-S34. doi:10.1086/491711
11. 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(11):943-950. doi:10.1007/BF01967563
12. Höck M. Glykopeptidantibiotika. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2020:971-974. doi:10.1007/978-3-662-61385-6_101

13. Weber RE, Bender JK, Werner G, Noll I, Abu Sin M, Eckmanns T. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2019/2020. Published online July 8, 2021. doi:10.25646/8710
14. Risikobewertung, Bundesinstitut. *Anwendung des Whole Genome Sequencing zur Aufklärung von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen*. Bundesbehörden und Einrichtungen im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL); 2020:vol. 1/2020. doi:10.17590/20200219-132642
15. Sharma-Kuinkel BK, Rude TH, Fowler VG. Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2016;1373:117-130. doi:10.1007/7651_2014_191
16. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013;18(4):20380. doi:10.2807/ese.18.04.20380-en
17. Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):728-736. doi:10.1038/nrmicro3093
18. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003
19. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 2008;24(3):133-141. doi:10.1016/j.tig.2007.12.007
20. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-448. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
21. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6):236. doi:10.1136/archdischild-2013-304340
22. Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, et al. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST117/CT71/vanB –clone in the Rhine-Main metropolitan area of Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):128. doi:10.1186/s13756-019-0573-8
23. Liese J, Schüle L, Oberhettinger P, et al. Expansion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Academic Tertiary Hospital in Southwest Germany: a Large-Scale Whole-Genome-Based Outbreak Investigation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(5):e01978-18. doi:10.1128/AAC.01978-18
24. Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):109. doi:10.1186/s13756-020-00754-1
25. Xanthopoulou K, Peter S, Tobys D, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonizing patients on hospital admission in Germany: prevalence and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(10):2743-2751. doi:10.1093/jac/dkaa271

-
26. Neumann B, Bender JK, Maier BF, et al. Comprehensive integrated NGS-based surveillance and contact-network modeling unravels transmission dynamics of vancomycin-resistant enterococci in a high-risk population within a tertiary care hospital. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235160. doi:10.1371/journal.pone.0235160
 27. Eichel V, Klein S, Bootsvelde C, et al. Challenges in interpretation of WGS and epidemiological data to investigate nosocomial transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an endemic region: incorporation of patient movement network and admission screening. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(7):1716-1721. doi:10.1093/jac/dkaa122
 28. Eisenberger D, Tuschak C, Werner M, et al. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(6):1398-1404. doi:10.1093/jac/dkaa041
 29. Falgenhauer L, Preuser I, Imirzalioglu C, et al. Changing epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Results of a genome-based study at a regional neurological acute hospital with intensive care and early rehabilitation treatment. *Infect Prev Pract*. 2021;3(2):100138. doi:10.1016/j.infpip.2021.100138
 30. Schwengers O, Hoek A, Fritzenwanker M, et al. ASA3P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher-level analysis of closely related bacterial isolates. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(3):e1007134. doi:10.1371/journal.pcbi.1007134
 31. Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol*. 2013;31(4):294-296. doi:10.1038/nbt.2522
 32. Inkscape. Inkscape Project. Published 2022. Accessed October 14, 2022. <https://inkscape.org>
 33. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*. 2007;23(1):127-128. doi:10.1093/bioinformatics/btl529
 34. Ackermann H. BiAS. für Windows.
 35. Telatin A. Merge the four lanes generated by Illumina NextSeq 500 sequencing machines. Assumes default file names and .fastq.gz extension. Github. Published October 15, 2018. Accessed September 30, 2022. <https://gist.github.com/telatin/36ff4fdf69abe79f78e5345eec3d839e>
 36. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Published 2010. Accessed June 22, 2024. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 37. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*. 2018;7:1338. doi:10.12688/f1000research.15931.2
 38. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
-

-
39. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinforma*. 2020;70(1):e102. doi:10.1002/cpbi.102
 40. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):1963-1971. doi:10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002
 41. de Been M, Pinholt M, Top J, et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High-Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3788-3797. doi:10.1128/JCM.01946-15
 42. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. Published online July 1987. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
 43. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(11):e00483-19. doi:10.1128/AAC.00483-19
 44. Chen L, Yang J, Yu J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D325-328. doi:10.1093/nar/gki008
 45. PubMed. PubMed. Published 2022. Accessed October 14, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
 46. Ewels. SRA Explorer. Accessed October 14, 2022. <https://sra-explorer.info/>
 47. Mellmann A, Bletz S, Böking T, et al. Real-Time Genome Sequencing of Resistant Bacteria Provides Precision Infection Control in an Institutional Setting. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):2874-2881. doi:10.1128/JCM.00790-16
 48. Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun*. 2019;10(1):2182. doi:10.1038/s41467-019-10210-3
 49. Foster TJ. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends Microbiol*. 2019;27(11):927-941. doi:10.1016/j.tim.2019.06.007
 50. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol*. 2003;47(6):1733-1747. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x
 51. Hendrickx APA, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, et al. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2009;77(11):5097-5106. doi:10.1128/IAI.00275-09
 52. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct

-
- pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiol Read Engl*. 2008;154(Pt 10):3199-3211. doi:10.1099/mic.0.2008/017319-0
53. Weber A. *Untersuchung der molekularen Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterococcus faecium Stämmen an der Charité - Universitätsmedizin Berlin*. Dissertation. Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2022. Accessed April 12, 2022. https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/32819/Dissertation_A.Weber.pdf?sequence=1&isAllowed=y
54. Werner G, Klare I, Fleige C, et al. Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1:21. doi:10.1186/2047-2994-1-21
55. Bender JK, Kalmbach A, Fleige C, Klare I, Fuchs S, Werner G. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep*. 2016;6:21847. doi:10.1038/srep21847
56. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(12):815-825. doi:10.1007/s10096-005-0056-0
57. Bayerl VA. *Molekulare Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg in den Jahren 2004 bis 2006*. Dissertation. Universität Regensburg; 2018. Accessed April 12, 2022. <https://epub.uni-regensburg.de/38284/1/V.%20Bayerl%20Dissertation%20VRE.pdf>
58. Meier VMK. *Molekulare Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg im Jahr 2008*. Dissertation. Universität Regensburg; 2020.
59. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(12):815-825. doi:10.1007/s10096-005-0056-0
60. Werner G, Klare I, Fleige C, Witte W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(5):515-527. doi:10.1016/j.ijmm.2007.05.008
61. Arredondo-Alonso S, Top J, Corander J, Willems R JL, Schürch AC. Mode and dynamics of vanA-type vancomycin resistance dissemination in Dutch hospitals. *Genome Med*. 2021;13(1):9. doi:10.1186/s13073-020-00825-3
62. Werner G. Das Geheimnis der Vancomycin-resistenten Enterokokken: Wo geht die Reise hin? Presented at: 27. Jahrestagung der Paul Ehrlich Gesellschaft; 2021. https://www.peg-symposien.org/tl_files/symposien/Jahrestagung%202021/Werner%20PEG%202021%20v1.pdf
-

-
63. Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB Enterococcus faecium causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3351-3366. doi:10.1093/jac/dkw312
 64. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. vanA and vanB Incorporate into an Endemic Ampicillin-Resistant Vancomycin-Sensitive Enterococcus faecium Strain: Effect on Interpretation of Clonality. *J Clin Microbiol.* 1999;37(12):3934-3939.
 65. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(5):632-639. doi:10.1016/j.mib.2010.08.004
 66. Noble W c., Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;93(2):195-198. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05089.x
 67. Klare I, Werner G, Witte W. Epidemiologisches Bulletin 23/2008. . *Juni*. Published online 2008:14.
 68. Klare I, Bender J, Werner G. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland Update 2015/2016. Published online November 16, 2017. doi:10.17886/EpiBull-2017-063
 69. Klare I, Bender J, Werner G. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken in Deutschland Update 2017/2018. Published online August 29, 2019. Accessed May 10, 2022. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/35_19.pdf?__blob=publicationFile

Nr.	Jahr	ST	CT	van	Aminoglykoside					Chinolone				
					aac(6)-I aac(6)-Ie aph(2'')-Ia aph(2'')-IIa aph(3')-IIIa ant(6)-Ia	Lincomamide lnu(B) lsa(E)	Makrolide erm(B) msr(C)	Pleuromutilin eat(A)	gyrA_E87G gyrA_S83Y parC_S80I gyrA_E87K gyrA_S83I parC_S80R gyrA_S83R	Streptothricin sat4	Tetracycline tet(L) tet(M)	Trimethoprim dfrG		
498	2007	192	171	vanB										
520	2007	192	171	vanB										
521	2007	192	171	vanB										
530	2007	192	171	vanB										
535	2007	192	171	vanB										
539	2007	192	171	vanB										
540	2007	192	171	vanB										
548	2007	192	171	vanB										
551	2007	192	171	vanB										
556	2007	192	171	vanB										
325	2005	192	164	vanB										
332	2006	192	164	vanB										
337	2006	192	164	vanB										
339	2006	192	164	vanB										
342	2006	192	164	vanB										
358	2006	192	164	vanB										
374	2006	192	164	vanB										
470	2007	192	164	vanB										
400	2006	192	26	vanB										
408	2006	192	26	vanB										
527	2007	192	26	vanB										
534	2007	192	26	vanB										
376	2006	192	10	vanB										
395	2006	192	10	vanB										
476	2007	192	10	vanB										
553	2007	192	10	vanB										
388	2006	192	3	vanB										
392	2006	192	3	vanB										
393	2006	192	3	vanB										
402	2006	192	3	vanB										
404	2006	192	3	vanB										
405	2006	192	3	vanB										
411	2006	192	3	vanB										
417	2006	192	3	vanB										
418	2006	192	3	vanB										
421	2006	192	3	vanB										
425	2006	192	3	vanB										
429	2006	192	3	vanB										
443	2006	192	3	vanB										
445	2006	192	3	vanB										
456	2006	192	3	n.b.										
457	2006	192	3	vanB										
458	2006	192	3	vanB										
460	2006	192	3	vanB										
482	2007	192	3	vanB										
483	2007	192	3	vanB										
487	2007	192	3	vanB										
490	2007	192	3	vanB										
492	2007	192	3	vanB										
493	2007	192	3	vanB										
495	2007	192	3	vanB										
501	2007	192	3	vanB										

Tabelle 23: Übersicht der Virulenzfaktoren/-gene *acm*, *ecbA*, *scm*, *sgrA* für *E. faecium* nach VFDB⁴⁴ der Isolate mit Angabe der Nr., Jahr, ST/CT Typ. Ein schwarzes Kästchen symbolisiert das Vorhandensein eines Gens.

Nr	Jahr	ST	CT	<i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren			Nr	Jahr	ST	CT	<i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren		
				<i>acm</i>	<i>ecbA</i>	<i>sgrA</i>					<i>acm</i>	<i>ecbA</i>	<i>sgrA</i>
307	2005	NEW	171				558	2007	192				
518	2007	NEW	3				422	2006	192	2665			
541	2007	NEW	2665				432	2006	192	1246			
516	2007	780	NEW				500	2007	192	1246			
522	2007	780	NEW				519	2007	192	1217			
423	2006	721	NEW				505	2007	192	294			
407	2006	317	NEW				528	2007	192	294			
350	2006	306	NEW				529	2007	192	294			
349	2006	279	NEW				305	2005	192	171			
469	2007	279	NEW				308	2005	192	171			
311	2005	262	NEW				313	2005	192	171			
322	2005	262	NEW				315	2005	192	171			
323	2005	262	NEW				327	2005	192	171			
324	2005	262	NEW				333	2006	192	171			
334	2006	262	NEW				338	2006	192	171			
340	2006	262	NEW				344	2006	192	171			
341	2006	262	NEW				346	2006	192	171			
343	2006	262	NEW				352	2006	192	171			
356	2006	262	NEW				357	2006	192	171			
359	2006	262	NEW				362	2006	192	171			
406	2006	203	1194				368	2006	192	171			
329	2005	202	NEW				375	2006	192	171			
486	2007	202	NEW				380	2006	192	171			
543	2007	202	NEW				383	2006	192	171			
451	2006	202	5885				387	2006	192	171			
474	2007	202	5885				390	2006	192	171			
481	2007	202	5885				391	2006	192	171			
435	2006	202	2762				394	2006	192	171			
462	2006	202	2762				397	2006	192	171			
471	2007	202	2762				403	2006	192	171			
494	2007	202	2762				412	2006	192	171			
525	2007	202	2762				414	2006	192	171			
561	2007	202	2762				415	2006	192	171			
347	2006	202	2665				419	2006	192	171			
367	2006	202	2665				424	2006	192	171			
436	2006	202	2665				428	2006	192	171			
463	2006	202	2665				437	2006	192	171			
488	2007	202	2665				438	2006	192	171			
426	2006	202	172				439	2006	192	171			
545	2007	202	172				441	2006	192	171			
564	2007	202	172				444	2006	192	171			
508	2007	202	NEW				468	2007	192	171			
309	2005	192	NEW				472	2007	192	171			
312	2005	192	NEW				475	2007	192	171			
318	2005	192	NEW				477	2007	192	171			
363	2006	192	NEW				478	2007	192	171			
504	2007	192	NEW				480	2007	192	171			
557	2007	192	NEW				485	2007	192	171			
489	2007	192	171				490	2007	192	3			
491	2007	192	171				492	2007	192	3			
497	2007	192	171				493	2007	192	3			
498	2007	192	171				495	2007	192	3			
520	2007	192	171				501	2007	192	3			
521	2007	192	171				502	2007	192	3			
530	2007	192	171				509	2007	192	3			
535	2007	192	171				512	2007	192	3			
539	2007	192	171				513	2007	192	3			
540	2007	192	171				514	2007	192	3			

Nr	Jahr	ST	CT	<i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren			Nr	Jahr	ST	CT	<i>E. faecium</i> Virulenzfaktoren		
				<i>acm</i>	<i>ecbA</i>	<i>sgrA</i>					<i>acm</i>	<i>ecbA</i>	<i>sgrA</i>
548	2007	192	171				517	2007	192	3			
551	2007	192	171				526	2007	192	3			
556	2007	192	171				537	2007	192	3			
325	2005	192	164				542	2007	192	3			
332	2006	192	164				546	2007	192	3			
337	2006	192	164				547	2007	192	3			
339	2006	192	164				549	2007	192	3			
342	2006	192	164				552	2007	192	3			
358	2006	192	164				554	2007	192	3			
374	2006	192	164				555	2007	192	3			
470	2007	192	164				559	2007	192	3			
400	2006	192	26				560	2007	192	3			
408	2006	192	26				562	2007	192	3			
527	2007	192	26				336	2006	18	NEW			
534	2007	192	26				384	2006	18	NEW			
376	2006	192	10				386	2006	18	NEW			
395	2006	192	10				416	2006	18	NEW			
476	2007	192	10				310	2005	18	5			
553	2007	192	10				314	2005	18	5			
388	2006	192	3				328	2005	18	5			
392	2006	192	3				335	2006	18	5			
393	2006	192	3				351	2006	18	5			
402	2006	192	3				364	2006	18	5			
404	2006	192	3				401	2006	18	5			
405	2006	192	3				446	2006	18	5			
411	2006	192	3				448	2006	18	5			
417	2006	192	3				389	2006	17	NEW			
418	2006	192	3				385	2006	17	3259			
421	2006	192	3				399	2006	17	3259			
425	2006	192	3				413	2006	17	3259			
429	2006	192	3				379	2006	17	3256			
443	2006	192	3										
445	2006	192	3										
456	2006	192	3										
457	2006	192	3										
458	2006	192	3										
460	2006	192	3										
482	2007	192	3										
483	2007	192	3										
487	2007	192	3										

Tabelle 24: Übersicht zu Kapitel 4.2.2 der 180 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Liese et al.²³ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
STNEW/CT2808	7	0,9 %	ST17/CT2802	2	0,3 %
ST80/CT315	6	0,8 %	ST17/CT2805	2	0,3 %
ST117/CT2768	5	0,6 %	ST18/CT1492	2	0,3 %
ST117/CT2773	3	0,4 %	ST18/CT2818	2	0,3 %
ST117/CT2775	3	0,4 %	ST192/CT3	2	0,3 %
ST132/CT1493	3	0,4 %	ST203/CT2561	2	0,3 %
ST17/CT1490	3	0,4 %	ST203/CT2801	2	0,3 %
ST18/CT253	3	0,4 %	ST64/CT2774	2	0,3 %
ST192/CT155	3	0,4 %	ST78/CT894	2	0,3 %
ST192/CT2771	3	0,4 %	ST80/CT1570	2	0,3 %
ST80/CTNEW	3	0,4 %	ST80/CT2610	2	0,3 %
ST80/CT1495	3	0,4 %	STNEW/CT469	2	0,3 %
ST80/CT2077	3	0,4 %	STNEW/CT1065	2	0,3 %
ST80/CT2804	3	0,4 %	STNEW/CT2803	2	0,3 %
ST925/CT2785	3	0,4 %	STNEW/CT2797	2	0,3 %
ST925/CT2816	3	0,4 %	ST104/CT2778	1	0,1 %
STNEW/CT892	3	0,4 %	ST117/CT1522	1	0,1 %
STNEW/CTNEW	3	0,4 %	ST117/CT2606	1	0,1 %
ST117/CTNEW	2	0,3 %	ST117/CT2777	1	0,1 %
ST117/CT1020	2	0,3 %	ST117/CT2794	1	0,1 %
ST117/CT35	2	0,3 %	ST117/CT2798	1	0,1 %
ST117/CT36	2	0,3 %	ST117/CT2823	1	0,1 %
ST117/CT929	2	0,3 %	ST1201/CT469	1	0,1 %
ST132/CT2810	2	0,3 %	ST125/CT2772	1	0,1 %
ST1595/CT26	2	0,3 %	ST125/CT2788	1	0,1 %
ST17/CT2799	2	0,3 %	ST1299/CT1146	1	0,1 %
ST1595/CTNEW	1	0,1 %	ST78/CT2827	1	0,1 %
ST17/CT2779	1	0,1 %	ST780/CT2790	1	0,1 %
ST17/CT2792	1	0,1 %	ST80/CT2781	1	0,1 %
ST17/CT2809	1	0,1 %	ST80/CT2789	1	0,1 %
ST17/CT2814	1	0,1 %	ST80/CT2791	1	0,1 %
ST17/CT2815	1	0,1 %	ST80/CT2796	1	0,1 %

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST17/CT2817	1	0,1 %	ST80/CT2807	1	0,1 %
ST17/CT3031	1	0,1 %	ST80/CT2811	1	0,1 %
ST18/CT222	1	0,1 %	ST80/CT2813	1	0,1 %
ST18/CT2787	1	0,1 %	ST80/CT2822	1	0,1 %
ST18/CT2820	1	0,1 %	ST80/CT2825	1	0,1 %
ST192/CTNEW	1	0,1 %	ST80/CT847	1	0,1 %
ST192/CT10	1	0,1 %	ST80/CT888	1	0,1 %
ST192/CT2806	1	0,1 %	ST83/CT2812	1	0,1 %
ST192/CT2824	1	0,1 %	ST885/CT2821	1	0,1 %
ST202/CT2762	1	0,1 %	ST89/CT301	1	0,1 %
ST202/CT2770	1	0,1 %	ST925/CT61	1	0,1 %
ST203/CT28	1	0,1 %	STNEW/CT20	1	0,1 %
ST203/CT58	1	0,1 %	STNEW/CT43	1	0,1 %
ST262/CT2784	1	0,1 %	STNEW/CT1134	1	0,1 %
ST280/CT2764	1	0,1 %	STNEW/CT2780	1	0,1 %
ST280/CT2793	1	0,1 %	STNEW/CT2783	1	0,1 %
ST323/CT45	1	0,1 %	STNEW/CT2795	1	0,1 %
ST323/CT1494	1	0,1 %	STNEW/CT2819	1	0,1 %
ST412/CTNEW	1	0,1 %	STNEW/CT2765	1	0,1 %
ST427/CT2800	1	0,1 %	STNEW/CT2766	1	0,1 %
ST612/CT2786	1	0,1 %	STNEW/CT2776	1	0,1 %
ST721/CT2769	1	0,1 %	STNEW/CT2826	1	0,1 %
ST78/CT2767	1	0,1 %			
ST80/CT106	1	0,1 %			
ST80/CT14	1	0,1 %			
ST80/CT1497	1	0,1 %			
ST80/CT202	1	0,1 %			

Tabelle 25: Übersicht zu Kapitel 4.2.7 der 293 Isolate der Gruppe Sonstige der Studie von Xanthopoulou et al.²⁵ unter Angabe der ST/CT Typen, der absoluten Anzahl und Gesamtanteile. Absteigend sortiert nach Anzahl.

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST17/CT1482	6	0,9 %	ST117/CT2080	2	0,3 %
ST262/CT1016	6	0,9 %	ST117/CT2270	2	0,3 %
ST1595/CT26	5	0,8 %	ST117/CT2649	2	0,3 %
ST17/CT29	5	0,8 %	ST117/CT2650	2	0,3 %
ST17/CT900	5	0,8 %	ST117/CT35	2	0,3 %
ST18/CT163	5	0,8 %	ST117/CTNEW	2	0,3 %
ST203/CT1010	5	0,8 %	ST17/CT53	2	0,3 %
ST262/CT1561	5	0,8 %	ST18/CT222	2	0,3 %
ST78/CT1121	5	0,8 %	ST192/CT26	2	0,3 %
ST80/CT1013	5	0,8 %	ST192/CT46	2	0,3 %
ST80/CT1066	5	0,8 %	ST203/CT1015	2	0,3 %
ST117/CT1177	4	0,6 %	ST203/CT1028	2	0,3 %
ST117/CT1526	4	0,6 %	ST203/CT1609	2	0,3 %
ST117/CT1612	4	0,6 %	ST203/CT859	2	0,3 %
ST80/CT1128	4	0,6 %	ST262/CT2646	2	0,3 %
ST80/CT315	4	0,6 %	ST262/CT2841	2	0,3 %
ST117/CT1062	3	0,5 %	ST361/CT1901	2	0,3 %
ST117/CT1169	3	0,5 %	ST80/CT1008	2	0,3 %
ST117/CT1686	3	0,5 %	ST80/CT106	2	0,3 %
ST117/CT2690	3	0,5 %	ST80/CT1083	2	0,3 %
ST117/CT991	3	0,5 %	ST80/CT1565	2	0,3 %
ST203/CT1689	3	0,5 %	ST80/CT2632	2	0,3 %
ST612/CT2688	3	0,5 %	ST80/CT2687	2	0,3 %
ST78/CT2116	3	0,5 %	ST80/CT2944	2	0,3 %
ST80/CT1046	3	0,5 %	ST80/CT32	2	0,3 %
ST80/CT2077	3	0,5 %	ST80/CTNEW	2	0,3 %
ST80/CT467	3	0,5 %	STNEW/CT2842	2	0,3 %
ST117/CT1682	2	0,3 %	ST1055/CT2839	1	0,2 %
ST117/CT1047	1	0,2 %	ST1478/CT1153	1	0,2 %
ST117/CT118	1	0,2 %	ST1478/CT71	1	0,2 %
ST117/CT1528	1	0,2 %	ST1489/CT20	1	0,2 %
ST117/CT1566	1	0,2 %	ST154/CT2115	1	0,2 %

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST117/CT1567	1	0,2 %	ST1595/CT2651	1	0,2 %
ST117/CT1615	1	0,2 %	ST17/CT154	1	0,2 %
ST117/CT1683	1	0,2 %	ST17/CT2584	1	0,2 %
ST117/CT1769	1	0,2 %	ST17/CT3093	1	0,2 %
ST117/CT1771	1	0,2 %	ST18/CT194	1	0,2 %
ST117/CT178	1	0,2 %	ST18/CT2307	1	0,2 %
ST117/CT1785	1	0,2 %	ST192/CT1079	1	0,2 %
ST117/CT1786	1	0,2 %	ST192/CT1529	1	0,2 %
ST117/CT1795	1	0,2 %	ST192/CT1617	1	0,2 %
ST117/CT1905	1	0,2 %	ST192/CT171	1	0,2 %
ST117/CT2094	1	0,2 %	ST192/CT2546	1	0,2 %
ST117/CT2308	1	0,2 %	ST192/CT54	1	0,2 %
ST117/CT2333	1	0,2 %	ST203/CT1035	1	0,2 %
ST117/CT2490	1	0,2 %	ST203/CT1077	1	0,2 %
ST117/CT2505	1	0,2 %	ST203/CT1611	1	0,2 %
ST117/CT2509	1	0,2 %	ST203/CT1800	1	0,2 %
ST117/CT2517	1	0,2 %	ST203/CT2322	1	0,2 %
ST117/CT2538	1	0,2 %	ST203/CT2586	1	0,2 %
ST117/CT2583	1	0,2 %	ST203/CT2733	1	0,2 %
ST117/CT2637	1	0,2 %	ST203/CT2735	1	0,2 %
ST117/CT2640	1	0,2 %	ST203/CT2750	1	0,2 %
ST117/CT2647	1	0,2 %	ST203/CT474	1	0,2 %
ST117/CT2734	1	0,2 %	ST203/CTNEW	1	0,2 %
ST117/CT2831	1	0,2 %	ST2170/CT2113	1	0,2 %
ST117/CT2846	1	0,2 %	ST2363/CT2112	1	0,2 %
ST117/CT2907	1	0,2 %	ST253/CT2114	1	0,2 %
ST1186/CT32	1	0,2 %	ST262/CT1007	1	0,2 %
ST262/CT2892	1	0,2 %	ST80/CT2298	1	0,2 %
ST262/CTNEW	1	0,2 %	ST80/CT2323	1	0,2 %
ST280/CT2585	1	0,2 %	ST80/CT2324	1	0,2 %
ST296/CT2886	1	0,2 %	ST80/CT2331	1	0,2 %
ST32/CT1068	1	0,2 %	ST80/CT2406	1	0,2 %
ST32/CT2874	1	0,2 %	ST80/CT2491	1	0,2 %
ST323/CT561	1	0,2 %	ST80/CT2638	1	0,2 %

ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil	ST/CT	Anzahl	Gesamtanteil
ST329/CT3101	1	0,2 %	ST80/CT2645	1	0,2 %
ST5/CT92	1	0,2 %	ST80/CT2682	1	0,2 %
ST535/CT2639	1	0,2 %	ST80/CT2691	1	0,2 %
ST56/CT3094	1	0,2 %	ST80/CT2696	1	0,2 %
ST612/CT1026	1	0,2 %	ST80/CT2700	1	0,2 %
ST612/CT2332	1	0,2 %	ST80/CT2752	1	0,2 %
ST78/CT1187	1	0,2 %	ST80/CT2843	1	0,2 %
ST78/CT1754	1	0,2 %	ST80/CT2844	1	0,2 %
ST78/CT1761	1	0,2 %	ST80/CT2845	1	0,2 %
ST78/CT2297	1	0,2 %	ST80/CT2869	1	0,2 %
ST78/CT2652	1	0,2 %	ST80/CT2873	1	0,2 %
ST78/CT2669	1	0,2 %	ST80/CT2875	1	0,2 %
ST78/CT2885	1	0,2 %	ST80/CT2876	1	0,2 %
ST78/CTNEW	1	0,2 %	ST80/CT2879	1	0,2 %
ST80/CT1152	1	0,2 %	ST80/CT2881	1	0,2 %
ST80/CT1185	1	0,2 %	ST80/CT2906	1	0,2 %
ST80/CT1527	1	0,2 %	ST80/CT3085	1	0,2 %
ST80/CT1588	1	0,2 %	ST80/CT3095	1	0,2 %
ST80/CT1616	1	0,2 %	ST80/CT3102	1	0,2 %
ST80/CT1755	1	0,2 %	ST80/CT475	1	0,2 %
ST80/CT1762	1	0,2 %	ST80/CT899	1	0,2 %
ST80/CT1770	1	0,2 %	ST89/CT301	1	0,2 %
ST80/CT1798	1	0,2 %	ST992/CT2751	1	0,2 %
ST80/CT1888	1	0,2 %	STNEW/CT1566	1	0,2 %
STNEW/CT2112	1	0,2 %	STNEW/CT2868	1	0,2 %

Tabelle 26: Übersicht zu Kapitel 4.3.4 der übrigen Cluster mit <3 Isolaten des deutschlandweiten allelbasierten Vergleichs der VREfm Isolate unter Angabe der Clusternummer, Anzahl der Isolate n, Sequenztyp/Compelxtyp und Vorkommen in den berücksichtigten Studien, in der Tabelle schwarz markiert.

Cluster	n	ST/CT	Studie									
			Diese Arbeit	Mellmann et al. (2016)	Falgenhauer et al. (2019)	Liese et al. 2019	Eichel et al. (2020)	Xanthopoulou et al. (2020)	Neumann et al. (2020)	Eisenberger et al. (2020)	Falgenhauer et al. (2021)	
Cluster 79	2	ST80/CT1570										
Cluster 80	2	ST132/CT2810										
Cluster 81	2	STNEW/CT2803										
Cluster 82	2	STNEW/CT2792										
Cluster 83	2	ST80/CT1185										
Cluster 84	2	ST80/CT2610										
Cluster 85	2	ST80/CT2687										
Cluster 86	2	STNEW/CT2842										
Cluster 87	2	ST80/CT2632										
Cluster 88	2	ST80/CT847										
Cluster 89	2	ST80/CT2944										
Cluster 90	2	ST262/CT2646										
Cluster 91	2	ST18/CT2818										
Cluster 92	2	ST18/CT1492										
Cluster 93	2	ST80/CT888										
Cluster 94	2	ST117/CT1682										
Cluster 95	2	ST117/CT2650										
Cluster 96	2	ST117/CT1020										
Cluster 97	2	ST117/CTNEW										
Cluster 98	2	ST117/CT118										
		ST117/CT2846										
Cluster 99	2	ST203/CT39										
Cluster 100	2	ST203/CT859										
Cluster 101	2	ST203/CT1609										
Cluster 102	2	ST203/CT1015										
Cluster 103	2	ST78/CT55										
Cluster 104	2	ST18/CTNEW										
Cluster 105	2	ST117/CT2649										
Cluster 106	2	ST80/CT1565										
Cluster 107	2	ST17/CT53										
Cluster 108	2	ST279/CTNEW										
Cluster 109	2	ST117/CT2080										
Cluster 110	2	ST361/CT1901										
Cluster 111	2	ST117/CT30										
Cluster 112	2	ST117/CT887										
Cluster 113	2	ST117/CT2270										
Cluster 114	2	ST203/CT2561										
Cluster 115	2	ST64/CT2774										
Cluster 116	2	ST18/CTNEW										
Cluster 117	2	ST769/CT25										
		STNEW/CT25										
Cluster 118	2	ST2363/CT2112										
		STNEW/CT2112										

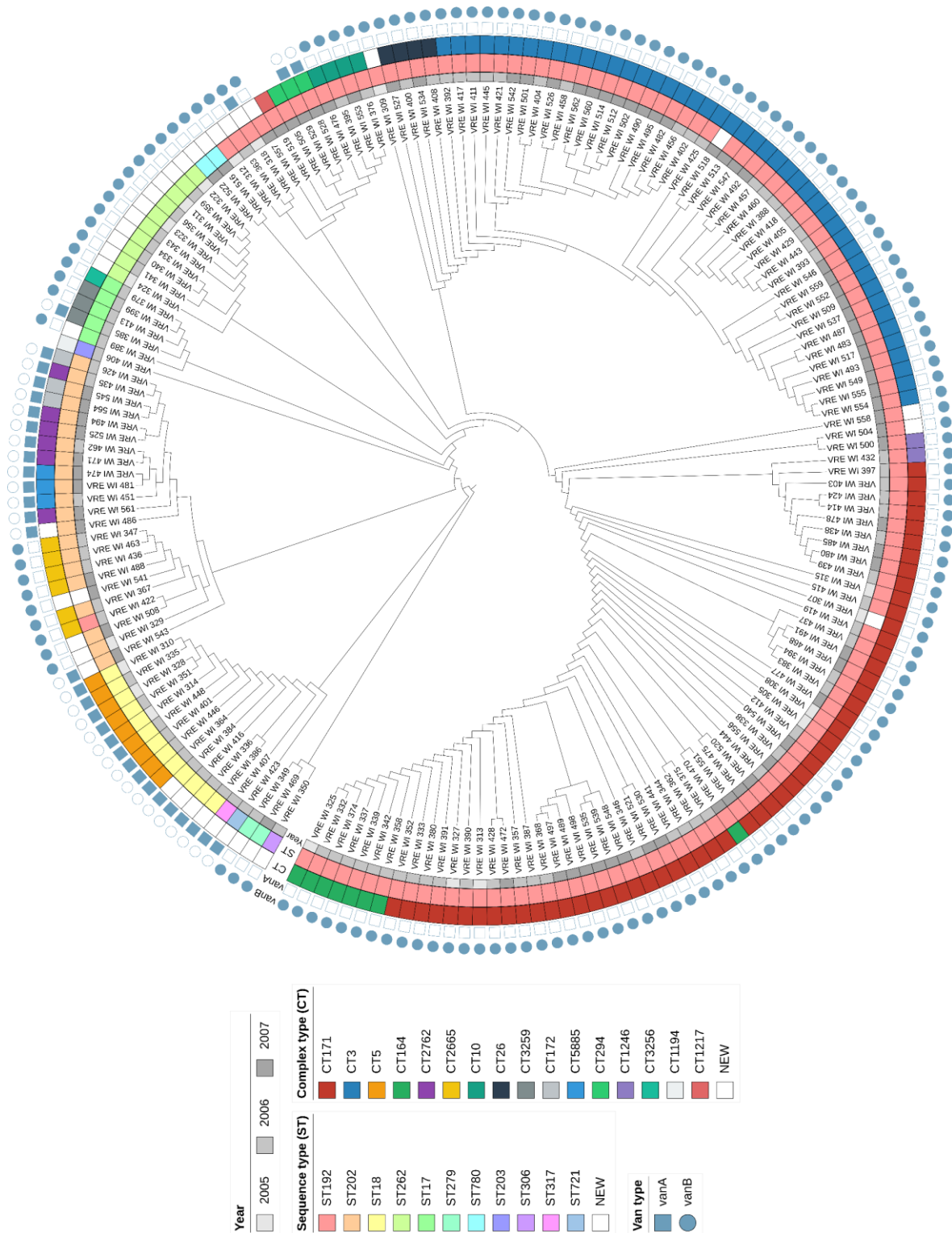


Abbildung 67: Hochauflösende phylogenetische zirkuläre Darstellung aller 187 typisierten Isolate auf Basis eines Neighbor-Joining-Trees unter Angabe Angabe (innen nach außen) der Isolatenummer, des Jahres, des Sequenztyps (ST), des Complextyps (CT) sowie der *vanA/vanB* Gene.

13 Publikationsverzeichnis

Abstract & Poster(-session)

Kurjak T*, Falgenhauer L, Jahn-Mühl B, Schindel C, Imirzalioglu C, Comparative genomic analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Germany with a focus on the Rhine-Main area reveals an unexpected *vanA/vanB* ratio, DZIF Annual Meeting 25 – 26 September 2023, Hannover, Germany.



Comparative genomic analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Germany with a focus on the Rhine-Main area reveals an unexpected *vanA/vanB* ratio

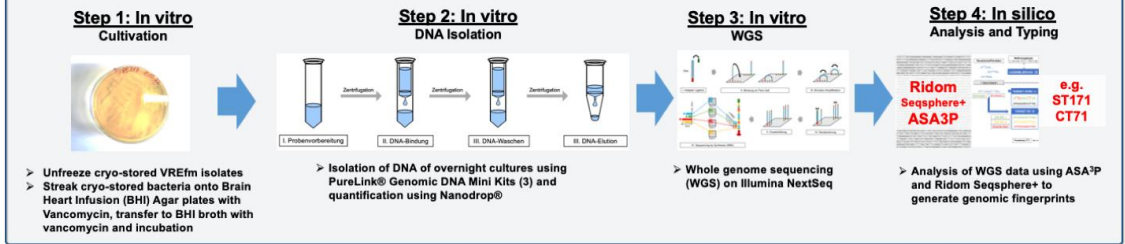


Tom Kurjak^{1,2,*}, Linda Falgenhauer^{1,2}, Bernhard Jahn-Mühl³, Christine Schindel⁴, Can Imirzalioglu^{2,5}

¹ Institute for Hygiene and Environmental Medicine 1, Justus Liebig University Gießen, Germany
² German Center for Infection Research (DZIF), Partner site Gießen-Marburg-Langen, Gießen, Germany
³ AGAPLESION HYGIENE, Institute for Hygiene and Environmental Medicine, AGAPLESION Frankfurter Diakonie Kliniken, Frankfurt, Germany
⁴ Institute for Laboratory Diagnostics and Hygiene, Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden
⁵ Institute of Medical Microbiology, Justus Liebig University Gießen, Germany
 *presenting author: tom.kurjak@stud.uni-frankfurt.de

Introduction and Purpose During the last decades vancomycin-resistant Enterococci (VRE) have established as relevant pathogen in the Rhine Main area. However, no comprehensive studies and published whole-genome sequencing (WGS) data on the population structure of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) types in the Rhine-Main area before 2016 are available. The question therefore arose as to which VREfm types occurred in the Rhine-Main area before 2016 and if the ST117/CT71 type previously reported (1,2) as currently dominant in the Rhine-Main area already appeared in this timeframe.

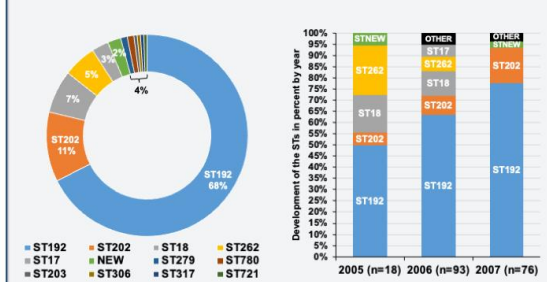
Materials and Methods 237 cryo-stored VREfm isolated from 2005 to 2007 in a tertiary care hospital in the Rhine-Main area were subjected to WGS. All identified VREfm isolates underwent in silico analyses using Ridom SeqSphere+ to determine antibiotic resistance genes, the multilocus sequence types (ST) and the core-genome multilocus sequence (cgMLST) types (CT). In addition, cgMLST-allele-based phylogenetic relationships between isolates from this study and nationwide studies with WGS data available at the time of the study were examined.



Results

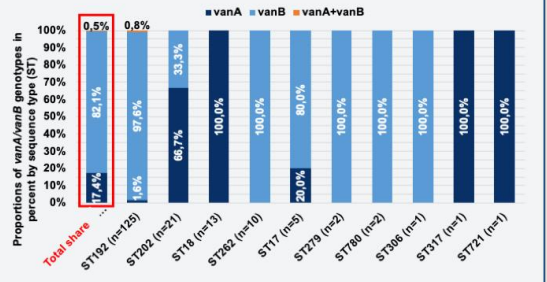
1) Sequence types (ST) of the isolates according to MLST

The ST117/CT71 clone currently predominant in the Rhine-Main area did not appear in our study. Instead, ST192 dominated with 68% in the investigation period. Other STs to be expected during the investigation period of this study, such as ST202, ST18, ST17, ST203, occurred in smaller numbers (Figure 1+2).



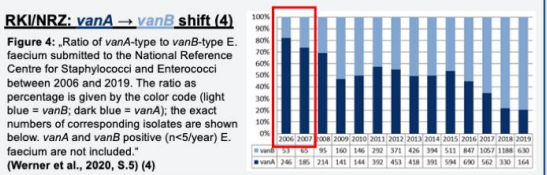
2) Comparison of VREfm *vanA/vanB* genotypes

Contrary to results reported by the National Reference Center for Staphylococci and Enterococci claiming that *vanA* dominated in VREfm in the time before 2010 with a *vanA/vanB* ratio of 4:1 (Figure 4), we observed an unexpected *vanB* dominance with a *vanA/vanB* ratio of 1:5 in our study.



The comparison of the obtained genomic fingerprints with current WGS data showed in some cases only a few cgMLST alleles difference between ST192 isolates, despite a larger time between the sampling years.

Apart from the high *vanB* proportion in ST192 (*vanA/vanB* ratio: 1:61) in this work, no further observations such as special virulence factors or other antibiotic resistance genes for the frequent occurrence of this ST could be found as a possible cause for the dominance of ST192.



Conclusions The predominance of ST192 in this study mirrors the reported nationwide (clonal) distribution of ST192 and *vanB* in the early 2010s. It is not clear whether in the present work a purely clonal *vanB* transmission regarding the unexpected *vanB* dominance can be assumed, as other STs in this study also harbored *vanB*. Despite the dominance of ST192-*vanB* in this work, a purely clonal outbreak does not necessarily have to be the cause, although this may seem obvious at first glance. Continuous genome-based surveillance is essential to keep an eye on the unexpected VREfm epidemiology in addition to research into the causes and thus also the success of local hygiene measures.

References & Acknowledgments We thank Christina Gerstmann and Maria Wille for excellent technical assistance. We thank all contributing sites. This work was supported by grants from the Bundesministerium fuer Bildung und Forschung (BMBF, Germany) within the German Center for Infection research.

(1) Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, et al. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST117/CT71-*vanB*-clone in the Rhine-Main metropolitan area of Germany. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):128. doi:10.1186/s13756-019-0573-8

(2) Falgenhauer L, Preuser I, Imirzalioglu C, et al. Changing epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Results of a genome-based study at a regional neurological acute hospital with intensive care and early rehabilitation treatment. *Infect Prev Pract*. 2021;3(2):100138. doi:10.1016/j.infp.2021.100138

(3) Overview of the work steps for DNA purification using the PureLink® Spin Column Mini Kit based method (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc., 2007. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/K182000>)

(4) Werner G, Neumann B, Weber RE, et al. Thirty years of VRE in Germany – “expect the unexpected”: The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. *Drug Resist Update*. 2020;53:100732. doi:10.1016/j.drug.2020.100732

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, 24.01.2025

Tom Kurjak

15 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Linda Falgenhauer, die Leiterin der AG Genombasierte Surveillance und Epidemiologie am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, das Vertrauen in meine Person und die damit verbundene aufwendige Betreuung und Organisation. Sie stand mir von Beginn an der Planungsphase jederzeit mit ausgezeichnetem fachlichem sowie methodischem Rat, aber auch höchstem menschlichem Engagement zur Seite. Bedanken möchte ich mich hier insbesondere für die Integration und Einblicke in die Arbeitsweise und Organisation des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF), die ich im Kontext dieser Arbeit durch zahlreiche Veranstaltungen erhalten durfte. Diese Erfahrungen sind für mich als klinisch geprägten Mediziner einmalig und von besonderer ideeller Bedeutung.

Bei Herrn PD Dr. Can Imirzalioglu, kommissarischer Institutsleiter für den Bereich Krankenversorgung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, möchte ich mich für die Ebnung des Weges in das Medizindoktoranden-Programm des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung, die Überlassung von Laborgeräten und IT-Hardware/-Software aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und die gutachterliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. med. B. Jahn-Mühl danke ich vielmals für die Überlassung der kryokonservierten VREfm Isolate, die am Institut für Hygiene und Umweltmedizin eingelagert wurden. Ohne Isolate und die damit verbundene Vorarbeit wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ebenso möchte ich meinen Dank Christina Gerstmann, Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie, für die Library Präparation zur Ganzgenom Sequenzierung aussprechen.

Mein Dank gilt auch Dr. Jane Falgenhauer, Studienkoordinatorin am Institut für Medizinische Mikrobiologie, für die Bereitstellung von bioinformationstechnischer Analysesoftware/-hardware.

Weiterhin möchte ich mich bei Maria Wille, Doktorandin am Institut für Hygiene und Umweltmedizin, für die praktische Einarbeitung in die Laborarbeit und die Einweisung an allen Laborgeräten bedanken. Sie hat durch Teilen ihrer praktischen Erfahrungen im Labor, ebenso zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Thomas, danke für alles.

16 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der publizierten Version dieser Arbeit entfernt.