

Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter
E. faecium-Isolate an einem südwestdeutschen
Krankenhaus der Maximalversorgung

Katharina Englert



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. (em.) Dr. Dr. habil. Georg Baljer

und

aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. med. Volkhard Kempf

Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter
E. faecium-Isolate an einem südwestdeutschen
Krankenhaus der Maximalversorgung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Katharina Englert

Tierärztin aus Aschaffenburg

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. (em.) Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Prof. Dr. med. Volkhard Kempf

Tag der Disputation: 31.01.2013

Für meine Eltern
und Franziska

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und themenbezogene Literaturübersicht	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Themenbezogene Literaturübersicht	3
1.2.1 Taxonomie und Eigenschaften der Enterokokken	3
1.2.2 Natürliches Vorkommen und Bedeutung der Enterokokken im Lebensmittelbereich	4
1.2.3 Potentielle Pathogenität der Enterokokken	5
1.2.4 Therapie von Enterokokken-Infektionen	6
1.2.5 Glycopeptid-Antibiotika	6
1.2.6 Natürliche und erworbene Resistenzen der Enterokokken	7
1.2.7 Glycopeptid-Resistenz der Enterokokken	8
1.2.8 Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE)	10
1.2.9 VRE in der Nutztierhaltung	13
1.2.10 Risikofaktoren für Kolonisation und Infektion durch VRE beim Menschen	14
1.2.11 Übertragungswege von Enterokokken im Krankenhaus	14
1.2.12 Prävention nosokomialer VRE-Fälle und VRE-Management im Krankenhaus	15
1.2.13 VRE-Management am Durchführungsort der Studie – einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwest- deutschland	18
1.2.14 Wirtschaftliche Bedeutung von Enterokokken-Infektionen	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Bakterienstämme	22
2.1.1.1 Probenmaterial und Enterokokken-Isolate	22
2.1.1.2 Referenzstämme	24
2.1.2 Geräte	25
2.1.3 Verbrauchsmaterial	28
2.1.4 Kulturmedien	31
2.1.5 Chemikalien	33

2.1.6 Enzyme	35
2.1.7 Antibiotika-Testblättchen bzw. Etest [®] -Streifen	36
2.1.8 Lösungen und Puffer	37
2.1.9 Marker und Primer	44
2.1.10 Software	45
2.2 Methoden	46
2.2.1 Stammauswahl	46
2.2.2 Isolierung von Enterokokken-Stämmen aus Probenmaterial	48
2.2.3 Lagerung und Anzüchten der Enterokokken-Isolate	50
2.2.4 Speziesidentifizierung mittels API rapid ID 32 Strep	51
2.2.5 Untersuchung der <i>in vitro</i> -Empfindlichkeit der Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika mittels Agar-diffusionstest	51
2.2.6 DNS-Isolierung	54
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.2.8 Gelelektrophorese	58
2.2.9 Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	58
2.2.10 <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST)	62
2.2.11 Erhebung der zugehörigen klinischen Daten	65
3. Ergebnisse	66
3.1 Isolierung von Enterokokken-Stämmen aus Probenmaterial	66
3.2 Speziesidentifizierung	66
3.3 Ergebnisse der Untersuchung der <i>in vitro</i> -Empfindlichkeit der Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika mittels Agardiffusionstest (Teicoplanin und Vancomycin siehe Punkt 3.4)	69
3.4 Ergebnisse der phäno- und genotypischen Untersuchung der Teicoplanin- und Vancomycin-Resistenz	73
3.4.1 Phänotyp	73
3.4.2 Genotyp	75
3.5 PCR-Detektion des <i>esp</i> (<i>enterococcal surface protein</i>)-Gens	77
3.6 PCR-Detektion des <i>hyl</i> -Gens	78
3.7 Ergebnisse der Untersuchung des <i>E. faecalis</i> -Isolates	79

3.8 Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	79
3.9 Ergebnisse des <i>Multi Locus Sequence Typings</i> (MLST)	83
3.10 Klinische Daten	88
3.10.1 Geschlecht	88
3.10.2 Alter	88
3.10.3 Kliniken	88
3.10.4 Zeitraum zwischen erster Aufnahme des Patienten im Klinikum und erstem bekannten VRE-Nachweis	89
3.10.5 Herkunft bzw. Wohnort der Patienten	90
3.10.6 Grundleiden der Patienten	90
3.10.7 Letzte Informationen, die dem Klinikum über die in die Untersuchung einbezogenen Patienten vorliegen	91
4. Diskussion	93
4.1 Speziesidentifizierung	93
4.2 <i>In vitro</i> -Antibiotika-Empfindlichkeitstests der <i>E. faecium</i> -Isolate	95
4.2.1 Ampicillin	96
4.2.2 Doxycyclin	97
4.2.3 Erythromycin	97
4.2.4 Gentamicin	97
4.2.5 Levofloxacin	98
4.2.6 Nitrofurantoin	99
4.2.7 Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin	99
4.2.8 Rifampicin	101
4.3 Vancomycin- und Teicoplanin-Resistenz der <i>E. faecium</i> -Isolate	101
4.3.1 Phäno- und genotypische Glycopeptid-Resistenz-Bestimmung	101
4.3.2 Epidemiologie der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten	103
4.4 Nachweis des <i>esp</i> -Gens in <i>E. faecium</i>	107
4.5 Nachweis des <i>hyl</i> -Gens in <i>E. faecium</i>	109
4.6 Genotypische Charakterisierung repräsentativer <i>E. faecium</i> -Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der PFGE und MLST – Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse	111

4.6.1 Auswahl der zu untersuchenden Stämme	111
4.6.2 Die Methoden und ihre Ergebnisse im Überblick	113
4.6.3 Kombination genotypischer und epidemiologischer Daten	117
4.6.4 Hospitale Assoziation	118
4.7 Auswertung der erhobenen klinischen Daten	118
4.8 Epidemiologie animaler und humaner VRE-Stämme inklusive Populations-analytischer Aspekte	118
4.9 VRE-Management am Durchführungsort der Studie – einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland	124
5. Zusammenfassung	128
6. Abstract	130
7. Literaturverzeichnis	132
8. Abkürzungsverzeichnis	154
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	158
9.1 Abbildungen	158
9.2 Tabellen	159
10. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge	162
11. Anhang	163
12. Danksagung	164
13. Ehrenwörtliche Erklärung	165

1. Einleitung und themenbezogene Literaturübersicht

1.1 Einleitung

Mit einem Anteil von 12 % stehen Enterokokken heute auf Platz 3 der Rangliste nosokomialer bakterieller Infektionserreger in Deutschland. Derzeit sind 37 Enterokokken-Spezies bekannt, von denen *E. faecalis* und *E. faecium* die größte klinische Bedeutung erlangt haben (RKI 2010).

Enterokokken können aufgrund ihrer hohen Tenazität nicht nur unter extremen Verhältnissen überleben (Neely und Maley 2000, Sherman 1937, Wendt et al. 1998b), sondern besitzen auch eine Vielzahl intrinsischer und aquirierter Antibiotika-Resistenzen. Vor allem Isolate der Spezies *E. faecium* sind oftmals multiresistent (Klare et al. 2005, Werner et al. 2008a). Darüber hinaus gibt es Hospital-assoziierte Stämme, die eine erhöhte Ausbreitungsfähigkeit im Krankenhaus zeigen (Werner et al. 2008a, Willems et al. 2001 und 2005). Enterokokken, die eigentlich als gering pathogen gelten, können bei Menschen mit schweren Grundleiden und Immunsuppression lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen (Vonberg et al. 2007, Wendt et al. 1998a, Werner et al. 2008a).

Die erworbene Glycopeptid-Resistenz gehört zu den bedeutenderen Resistenzen der Enterokokken. In Europa traten die ersten gegen das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin resistenten Stämme 1987 auf (Leclercq et al. 1988, Uttley et al. 1988). 2003/2004 kam es zu einem Anstieg der Inzidenz von Vancomycin-resistenten *E. faecium* in deutschen Krankenhäusern. Während diese vor 2003 bei $\leq 5\%$ lag, wurden 2003/2004 in verschiedenen Kliniken Werte von bis zu 14 % erreicht (Fahr et al. 2004). Bezüglich der Resistenz-Determinanten, die der erworbenen Glycopeptid-Unempfindlichkeit zugrunde liegen, dominiert bei nosokomialen Enterokokken-Stämmen bis heute der *vanA*-Typ (RKI 2010).

Der Umgang mit VRE im Klinikalltag wird durch die oben beschriebenen Eigenschaften erschwert: Die Therapiemöglichkeiten von VRE-Infektionen sind durch die gegenwärtige Resistenzsituation stark limitiert, was häufig den Einsatz von Reserve-Antibiotika indiziert (Mielke et al. 2011, Werner et al. 2008a). Die Ausbreitung des Erregers wird u. a. durch dessen hohe Tenazität begünstigt, die es ihm beispiels-

weise ermöglicht, auf abiotischen bzw. trockenen Oberflächen zu überleben (Kramer et al. 2006, Neely und Maley 2000, Noskin et al. 1995, Wendt et al. 1998b). Darüber hinaus identifizierten verschiedene Studien Enterokokken als die Erreger mit dem höchsten Übertragungspotential bzw. mit der größten Übertragungsdichte in nosokomialen Bereichen (Bärwolff et al. 2005, Grundmann et al. 2005). Desweiteren besteht die Gefahr, dass durch eine Übertragung der Determinanten für die Glycopeptid-Resistenz Vancomycin-resistente MRSA-Stämme generiert werden, wie dies bereits in einigen Fällen geschehen ist (Chang et al. 2003, Miller et al. 2002, Vonberg et al. 2007).

2005 traten erstmals Vancomycin-resistente *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme an dem in dieser Arbeit beschriebenen Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland auf und blieben hier auch in den darauffolgenden Jahren prävalent. Neben VRE-Infektionen einzelner Patienten wurden auch kleinere Ausbrüche dokumentiert. 2007 wurden aufgrund der anhaltenden Problematik ein VRE-Screening für Risikopatienten und Isolierungsmaßnahmen eingeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine repräsentative Auswahl Vancomycin-resistenter Enterokokken-Stämme eines Krankenhauses der Maximalversorgung in Südwestdeutschland hinsichtlich verschiedener Charakteristika, die mutmaßlich relevant für Virulenz und erhöhte Ausbreitungstendenz in *E. faecium* sind, typisiert werden. Ziel war, die hiesige VRE-Population anhand relevanter Merkmale zu beschreiben und eventuelle Veränderungen untersuchter Eigenschaften zwischen 2005 und 2010 aufzuzeigen. Zudem war vorgesehen, Aussagen über die verwandtschaftlichen Beziehungen (verschiedene Infektionsquellen – polyklonales Geschehen/gemeinsame Infektionsquelle) der untersuchten Isolate zu treffen und mögliche Übertragungswege (intra-/interhospitale Ausbreitung) zu identifizieren.

Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen sollten – insofern möglich – sich ergebende Schlüsse für den zukünftigen Umgang mit VRE an dieser Klinik dargestellt werden.

Desweiteren sollte ermittelt werden, ob sich eine Abgrenzung dieser aus Patienten stammenden Isolate von animalen VRE-Stämmen bestätigen lässt. Animale VRE-Stämme waren vor allem während der 90er Jahre in deutschen Nutztierbeständen

prävalent (Klare et al. 1995b) und standen unter Verdacht, mit dem Auftreten nosokomialer Infektionen in Verbindung zu stehen (BgVV 1996a).

1.2 Themenbezogene Literaturübersicht

1.2.1 Taxonomie und Eigenschaften der Enterokokken

Enterokokken gehören laut Bergey's Manual of Systematic Bacteriology zur Klasse der Bacilli, Ordnung der Lactobacillales und Familie der Enterococcaceae (Ludwig et al. 2009).

Sie wurden erstmals im Jahre 1899 von Thiercelin beschrieben (Thiercelin 1899) und zählten vorerst zum Genus *Streptococcus*. Enterokokken exprimieren ein antigen wirksames Zellwandpolysaccharid auf ihrer Oberfläche, die Lipoteichonsäure, anhand dessen sie nach dem Lancefield-Schema den D-Streptokokken zugeordnet wurden (Murray 1990a). Untersuchungen von Schleifer und Kilpper-Bälz führten letztendlich dazu, dass 1984 das Genus *Enterococcus* eingeführt und die Enterokokken endgültig von den Streptokokken abgegrenzt wurden (Schleifer und Kilpper-Bälz 1984).

Heute kennt man 37 verschiedene Enterokokken-Spezies, von größerer klinischer Relevanz sind allerdings nur *E. faecalis* und *E. faecium* (RKI 2010, Werner et al. 2008a).

Enterokokken sind gram-positive Kugelbakterien und erscheinen im mikroskopischen Bild einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten (Schleifer und Kilpper-Bälz 1984). Auf Schafblutagar sind die fakultativ anaeroben Erreger *E. faecalis* und *E. faecium* als runde, glatte, leicht erhabene, gräulich erscheinende Kolonien mit einem Durchmesser von 1-1,5 mm zu erkennen. Während die Kolonien von *E. faecalis* selten von einem Hämolysehof umgeben sind (γ -Hämolyse, bzw. selten β -Hämolyse), kann *E. faecium* eine deutlich vergrünende α -Hämolyse zeigen (Lode et al. 2005a und 2005b, Schleifer und Kilpper-Bälz 1984).

Enterokokken wachsen in einem Temperaturbereich von 10-45°C, bis zu einem pH-Wert von 9,6, in 6,5 %iger Natriumchlorid-Lösung und auch in Anwesenheit von 40 % Galle. Desweiteren überleben sie eine thermische Behandlung bei 60°C 30 Minuten lang (Sherman-Kriterien; Sherman 1937) und können somit bei extremen Verhältnissen überleben.

1.2.2 Natürliches Vorkommen und Bedeutung der Enterokokken im Lebensmittelbereich

Enterokokken sind Bestandteil der normalen Darmflora verschiedener Säugetiere, einschließlich der des Menschen, von Vögeln, Reptilien, Fischen und Insekten (Aarestrup et al. 2002). Desweiteren sind sie ubiquitär in der Umwelt zu finden (Podbielski und Lütticken 2001). Beim gesunden Menschen findet man Enterokokken (v. a. *E. faecalis* und *E. faecium*) nicht nur im Intestinaltrakt, sondern auch in der Urethra, Vagina und Mundhöhle (Murray 1990a, Podbielski und Lütticken 2001). Bei Geflügel, Rind und Schwein zählen *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. hirae* zu den dominierenden Enterokokkenspezies (Devriese et al. 1987). Die Prävalenz von *E. faecalis* ist altersabhängig und sinkt mit zunehmendem Alter (Devriese et al. 1991 und 1992). *E. avium* und *E. gallinarum* konnten bei Geflügel nur vereinzelt nachgewiesen werden (Devriese et al. 1987 und 1991).

Im Lebensmittelbereich kommt den Enterokokken eine unterschiedliche Bedeutung zu: Während Enterokokken im Trinkwasser als Indikatorkeime für eine fäkale Kontamination gelten und hier nicht nachgewiesen werden dürfen (Kleer 2004, TrinkwV, §5 Absatz 2), zählen sie zur regulären Flora einer Vielzahl natürlich fermentierter, sowie pflanzlicher Lebensmittel und verschiedener Käse- und Wurstwaren (Fehlhaber 2004). Enterokokken werden als Probiotika verwendet (Bertolami et al. 1999, BfR 2002) und kommen zudem auch in der Wurst- und Käsereitechnologie als Starter- und Schutzkultur bei der Fermentation von Lebensmitteln zum Einsatz (BfR 2002, Fehlhaber 2004). Enterokokken spielen hier nicht nur wegen ihrer Fermentationsleistungen (Centeno et al. 1996, Sarantinopoulos et al. 2001), sondern auch wegen ihrer Bacteriocinbildung eine Rolle. Letztere inhibiert das Wachstum von Clostridien, Listerien und anderen gram-positiven Pathogenen (Callewaert et al. 2000, Cintas et al. 1997). Im Schlachtprozess kann es zu einer fäkalen Kontamination des Fleisches mit Enterokokken des tierischen Gastrointestinaltraktes kommen (Klare et al. 1995a, Turtura und Lorenzelli 1994). Hierbei steht bei Rind-, Schweine- und Geflügelfleisch *E. faecalis* im Vordergrund (Stiles et al. 1978, Turtura und Lorenzelli 1994).

1.2.3 Potentielle Pathogenität der Enterokokken

Enterokokken verfügen als Opportunisten nur über eine geringe Pathogenität (Kayser 2001, Murray 1990a, Wendt et al. 1998a). Dennoch gehören sie heute zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen weltweit (Cetinkaya et al. 2000, RKI 2010) und können schwere Infektionen bei Menschen mit Grunderkrankungen sowie Immunsuppression hervorrufen (Moellering 1998, Vonberg et al. 2007, Werner et al. 2008a).

Bei einer Enterokokkeninfektion handelt es sich meist um eine endogene Infektion mit Ausgang in der Besiedlung des Intestinaltrakts (Zirakzadeh und Patel 2006). Harnwegsinfekte, perianale und perineale Wundinfektionen, Peritonitiden und Katheter-assoziierte Infektionen sind daher typisch. Sind die Erreger über diese Eintrittspforten in den Körper gelangt, kann es zu sekundären Infektionen und Bakteriämien kommen. Nicht selten entstehen im Rahmen von Bakteriämien Endokarditiden (Murray 1990a, Werner et al. 2008a), Enterokokken werden hier mit 10-20 % am dritthäufigsten nachgewiesen (Mandell et al. 1970). Ein rezidivierendes Auftreten von VRE-Bakteriämien in kolonisierten Patienten ist durchaus möglich (Linden et al. 1996, Montecalvo et al. 1994, Roghmann et al. 1997).

Von dominierender klinischer Bedeutung sind die Spezies *E. faecalis* und *E. faecium*. 80-90 % der klinischen Enterokokken- (Infektions-) Isolate können der Spezies *E. faecalis*, 5-15 % (Gray et al. 1991, Murray 1990a, Ruoff et al. 1990) – heute regional sogar bis zu 35 % – der Spezies *E. faecium* zugeordnet werden (Low et al. 2001, Top et al. 2007, Treitman et al. 2005). Der Anstieg von *E. faecium* wird mit dem vermehrten Auftreten Hospital-assoziiierter Stämme dieser Spezies in medizinischen Einrichtungen in Verbindung gebracht. Das Virulenzpotential von *E. faecium* ist geringer als das von *E. faecalis* (Werner et al. 2008a). *E. faecium* besitzt allerdings verglichen mit *E. faecalis* ein größeres Reservoir an erworbenen Resistenzen. Dies begünstigt eine Ausbreitung unter Antibiotika-Selektionsdruck (Klare et al. 2003, Werner et al. 2008a).

Da Infektionen vor allem bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen zu finden sind, ist es schwierig, ihre direkte Letalität zu ermitteln, da diese nicht ohne Probleme von der Letalität des Grunderkrankens abzugrenzen ist (siehe auch Wendt et al. 1998a). Jedoch liegt die Letalität bei Patienten mit VRE-Sepsis höher als bei Patienten mit VSE-Sepsis: Laut einer amerikanischen Studie zeigten Patienten mit einer VRE-

Sepsis eine Gesamtleblichkeit von 36,6 %, Patienten mit einer VSE-Sepsis eine Gesamtleblichkeitsrate von 16,4 % (CDC 1993).

Auch bei Tieren können Enterokokken zu klinischen Verinderungen fñhren.

E. faecalis scheint eine Rolle bei der amyloiden Arthropathie der Hñhner zu spielen (Petersen et al. 2008). Darñber hinaus werden Enterokokken im Zusammenhang mit Pneumonie, Mastitiden, Infektionen des Urogenitaltrakts, sowie als Erreger von Endokarditiden und Septikämien beschrieben (Valentin-Weigand 2011d).

1.2.4 Therapie von Enterokokken-Infektionen

Bei Enterokokken-Infektionen stellt der Einsatz einer Kombination aus einem Aminopenicillin und einem Aminoglycosid (eventuell auch einer Monotherapie mit Ampicillin) oder die Verwendung eines Glycopeptids die Therapie der Wahl dar (Murray 1990a, Schäfer et al. 2004/2005). Allerdings können aufgrund der häufig vorliegenden Multiresistenz (besonders in *E. faecium*; Klare et al. 2005, Werner et al. 2008a) keine einheitlich wirksamen Empfehlungen gegeben werden. Die Wahl des Antibiotikums sollte unter Berücksichtigung aller vorliegenden Informationen individuell für den jeweiligen Einzelfall getroffen werden (Wendt et al. 1998a). Oft stellen teils recht ungewöhnliche Mehrfachkombinationen verschiedener Antibiotikaklassen im Einzelfall (Linden 2002, Norris et al. 1995) oder moderne Reserve-Antibiotika wie Quinupristin/Dalfopristin, Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin die einzigen Therapieoptionen dar. Resistente Stämme sowie eine nosokomiale Ausbreitung derselben wurden bereits beschrieben (Werner et al. 2008a).

Eine Therapie von Infektionen mit VanB-Typ VRE mittels Teicoplanin (in Kombination) ist möglich (Nicolau et al. 1996), inwiefern aber Infektionen mit *vanB*-VRE, die *in vitro* sehr niedrige MHKs für Vancomycin zeigen, *in vivo* mit hohen Vancomycin-Konzentrationen therapiert werden können, ist nicht bekannt (Werner et al. 2008a).

Zuletzt sei betont, dass alleine eine VRE-Infektion therapiert wird, eine intestinale Besiedlung hingegen nicht, da eine Sanierung kaum möglich ist (Kauffman 2003, Vonberg et al. 2007).

1.2.5 Glycopeptid-Antibiotika

Vancomycin (aus *Streptomyces orientalis*) und Teicoplanin (aus *Actinoplanes teichomyceticus*) sind Vertreter der Gruppe der Glycopeptidantibiotika (Klare et al.

2004/2005). Glycopeptide hemmen die bakterielle Zellwandsynthese, indem sie über Wasserstoffbrückenbindungen an die terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Reste der Pentapeptide binden und diese vollständig umlagern. Die an der Zellwandsynthese beteiligten Enzyme können somit ihre Zielsequenzen nicht erreichen und die – normalerweise im Rahmen der Mureinsynthese ablaufende – Transglycosilierung der Pentapeptide wird inhibiert (Klare et al. 2004/2005, Werner et al. 2008a). Durch die gestörte Peptidoglycansynthese kommt es zu einem fehlerhaften Mureingerüst. Aufgrund ihrer großräumigen Molekülstruktur können Glycopeptide die äußere Membran gram-negativer Bakterien nicht durchdringen, was ihr Wirkspektrum auf gram-positive Erreger beschränkt. Glycopeptide wirken schwach bakterizid. Sie werden in der Humanmedizin zur Behandlung schwerer Infektionen mit gram-positiven multiresistenten Erregern eingesetzt. Sie zeigen eine sehr gute Wirkung gegen Staphylokokken inklusive MRSA, Enterokokken (exklusive Glycopeptid-resistente Enterokokken), Streptokokken, gram-positive anaerobe Kokken, Listerien, Clostridien und Corynebakterien (Klare et al. 2004/2005). Aufgrund der derzeitigen Resistenzsituation bei Enterokokken und auch Staphylokokken sollte die Indikationsstellung bezüglich der Glycopeptidgabe kritisch erfolgen (Groß 2006).

1.2.6 Natürliche und erworbene Resistenzen der Enterokokken

Enterokokken besitzen eine Vielzahl natürlicher Resistenzen gegen Antibiotika. Zudem können sie weitere Resistenzen erwerben (Tabelle 1a). Dies geschieht entweder durch Mutation (z. B. Ampicillin) oder indem sie genetische Elemente aquirieren, die Antibiotika-Resistenzen kodieren (z. B. erworbene Glycopeptid-Resistenz; Courvalin 2006, Murray 1990a, Rybkine et al. 1998). Die Antibiotika-Unempfindlichkeit ist ein Faktor, der für die wachsende Bedeutung von Enterokokken als Erreger nosokomialer Infektionen verantwortlich ist (Werner et al. 2008a).

Tabelle 1a: Natürliche und erworbene Resistenzen bei Enterokokken

(Werner et al. 2008a)

Natürliche (intrinsische) Resistenzen	Erworbene Resistenzen
Cephalosporine	Tetracycline
Monobactame	Makrolide
Isoxazolylpenicilline	Aminoglycoside (<i>high level</i>)
Aminoglycoside (<i>low level</i>)	Chloramphenicol
Lincosamide (<i>E. faecalis</i>)	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
Streptogramine (<i>E. faecalis</i>)	Fluorchinolone
Mupirocin (<i>E. faecalis</i>)	Glycopeptide (vor allem <i>E. faecium</i>)
Vancomycin (<i>low level</i> ; <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i>)	Ampicillin (vor allem <i>E. faecium</i>)
	Streptogramine (<i>E. faecium</i>)
	Oxazolidinone (Linezolid)
	Glycylcycline (Tigecyclin)
	Lipopeptide (Daptomycin)

1.2.7 Glycopeptid-Resistenz der Enterokokken

Bei der Glycopeptid-Resistenz der Enterokokken unterscheidet man zwischen der natürlichen und der erworbenen Resistenz. In beiden Fällen wird der Angriffspunkt der Glycopeptide modifiziert (Courvalin 2006).

Eine intrinsische Glycopeptid-Resistenz liegt bei *E. casseliflavus/flavescens* und *E. gallinarum* vor. Sie ist *vanC*-kodiert und zeigt sich phänotypisch in einer *low level*-Vancomycin-Resistenz (MHK 2-32 µg/ml; Courvalin 2006, Werner et al. 2008a). Medizinisch sind diese Spezies weniger relevant (Werner et al. 2008a).

Die erworbene Glycopeptid-Resistenz der Enterokokken kann man geno- und phänotypisch in verschiedene Formen unterteilen. Derzeit ist das *vanA*-, *vanB*-, *vanD*-, *vanG*- und *vanE*- (Courvalin 2006), sowie das *vanL*- (Boyd et al. 2008), *vanM*- (Xu et al. 2010) und *vanN*-Gencluster bekannt (Lebreton et al. 2011). Allerdings sind nur *vanA* und *vanB* medizinisch bedeutsam (Werner et al. 2008a). Die *van*-Gene kodieren verschiedene Ligasen, die eine erweiterte Substratspezifität aufweisen und daher auch andere Substrate als Alanin binden können. Somit entstehen modifizierte Peptidketten, die im Falle von *vanA*, *vanB*, *vanD* (Courvalin 2006, Werner et al. 2008a) sowie *vanM* (Xu et al. 2010) terminal D-Alanin-D-Lactat und im Falle von *vanE*, *vanG* (und der intrinsischen *vanC*-kodierten Resistenz; Courvalin 2006,

Werner et al. 2008a) sowie *vanL* (Boyd et al. 2008) und *vanN* (Lebreton et al. 2011) D-Alanin-D-Serin statt D-Alanin-D-Alanin tragen. Die Bindungsaffinität und das Bindungsvermögen der Glycopeptide gegenüber diesen modifizierten Peptidketten sind im Vergleich zu den nicht-modifizierten Peptidketten (D-Alanin-D-Alanin) nur gering. Ein weiterer ergänzender Mechanismus, auf dem die Glycopeptid-Resistenz beruht, ist die Elimination der nicht-modifizierten Peptidketten, zu denen Glycopeptide eine hohe Affinität zeigen (Courvalin 2006).

Sowohl die *vanA*- als auch die *vanB*-vermittelte Resistenz ist induzierbar. Die *vanA*-Kodierte durch Vancomycin und Teicoplanin, die *vanB*-Kodierte allein durch Vancomycin (Courvalin 2006, Werner et al. 2008a). Die Induktion bzw. Regulation der *vanA*-vermittelten Resistenz erfolgt, indem ein membranständiger Sensor VanS (durch *vanS* kodiert) die Glycopeptid-Wirkung auf die Zellwand-Biosynthese misst. Bei Glycopeptidanwesenheit kommt es durch eine Autophosphorylierung zur Aktivierung einer Histidinkinasefunktion. Der Phosphatrest wird auf einen sich im Zytoplasma befindenden, *vanR* kodierten Regulator VanR übertragen, der dadurch ebenfalls aktiviert wird (Arthur und Quintiliani 2001). Er bindet an zwei Promotoren in Tn1546 und bewirkt dort die Expression von *vanRS* und *vanHAXYZ*: Er wirkt als Transskriptionsfaktor. Besteht kein Selektionsdruck durch Glycopeptide wird VanR durch VanS dephosphoryliert und damit inaktiviert (Arthur et al. 1997). Soweit bekannt ähneln Aufbau und Funktion der anderen *van*-Cluster dem *vanA*-Gencluster, Unterschiede bestehen (Courvalin 2006, Werner et al. 2008a).

Phänotypisch zeigt sich der VanA-Resistenztyp als *high level*-Resistenz gegen Vancomycin (MHK 16-1000 µg/ml) und Teicoplanin (MHK 4-512 µg/ml), der VanB-Typ als Resistenz allein gegen Vancomycin (MHK 2-32 µg/ml; Courvalin 2006, Werner et al. 2007), wobei die *in vitro* gemessenen MHKs für Vancomycin bei der *vanA*-kodierten Resistenz meist einige Stufen über denen des VanB-Resistenztyps liegen (Werner et al. 2007).

Während das *vanA*-Gencluster meist Plasmid-kodiert ist und durch Konjugation übertragen werden kann (Werner et al. 1997 und 1999), ist das *vanB*-Gencluster meist chromosomal kodiert und nur teilweise übertragbar (Carias et al. 1998, Quintiliani und Courvalin 1996, Rice et al. 1998). Die *vanA*- und *vanB*-Gencluster liegen auf Transposons, *vanA* auf Tn1546, *vanB* auf Tn1547, Tn1549 oder Tn5382 (Arthur et al. 1993, Dahl et al. 2000 und 2003, Quintiliani und Courvalin 1996, Rice et al. 1998).

1.2.8 Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE)

Die ersten *vanA*-tragenden VRE in Europa wurden 1987 beschrieben (Leclercq et al. 1988, Uttley et al. 1988). Die Inzidenz von VRE in europäischen Krankenhäusern blieb während der 90er Jahre zunächst auf einem niedrigen Niveau (Schouten et al. 2000). In den USA hingegen kam es zu einem stetigen Anstieg von VRE. Laut Daten der National Nosocomial Infections Surveillance betrug der Anteil Vancomycin-resistenter Enterokokken assoziiert mit nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen 1999 knapp 26 % – ein Anstieg um 47 % verglichen mit der durchschnittlichen Resistenzrate von 1994-1998 (NNIS 1999). In den letzten Jahren nahm der Anteil Vancomycin-resistenter Enterokokken jedoch auch in verschiedenen Ländern Europas zu (ECDC 2008 und 2009). Während Länder wie Frankreich, Dänemark oder die Niederlande 2008 weniger als 1 % Vancomycin-Resistenz bei invasiven *E.faecium* aufwiesen, erreichten andere europäische Länder diesbezüglich weitaus höhere Raten: Vereinigtes Königreich 28 %, Irland 35 %, Griechenland 28 %. Zugleich ließen sich auch unterschiedliche Trends beobachten: Während es in Slowenien 2005-2008 hinsichtlich der Vancomycin-Resistenz in *E.faecium* zu einem signifikanten Anstieg kam (0 %→13 %), kam es im gleichen Zeitraum in Frankreich (2 %→0,6 %), Griechenland (37 %→28 %), Italien (19 %→6 %) und Israel (46 % →20 %) zu einer signifikanten Abnahme derselben (ECDC 2008). Deutschland belegte laut EARSS/EARS-Net-Daten 2008 und 2009 bezüglich des Auftretens invasiver Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme einen der mittleren Ränge (ECDC 2008 und 2009).

Tabelle 1b: Daten des EARSS/EARS-Net sowie verschiedener PEG-Studien zum Auftreten Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme in Deutschland*

Jahr	Anteil Vancomycin-resistenter <i>E. faecium</i> in %	
	EARSS/EARS-Net-Daten ¹	Daten der PEG-Studien 2001/04/07 ²
2001	1	3
2002	4	
2003	3	
2004	11	14
2005	10	
2006	8	
2007	15	11
2008	6	
2009	6	

*PEG-Studien enthalten auch Daten aus Österreich und der Schweiz.

¹Datengrundlage: invasive *E. faecium*-Isolate (ECDC 2008 und 2009).

²Datengrundlage: *E. faecium*-Infektionsisolate (PEG: PEG-Studie 2001/2004/2007).

Vor 2003 lag die Inzidenz Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Isolate in deutschen Krankenhäusern bei ≤ 5 %. 2003/2004 kam es – deutschlandweit betrachtet – zu einem Anstieg der Inzidenz auf > 10 % (Tabelle 1b), in verschiedenen Krankenhäusern in Südwestdeutschland zu einem Anstieg auf bis zu 14 % (Fahr et al. 2004).

Die Zunahme von VRE in Deutschland und anderen europäischen Ländern ist bedingt durch ein vermehrtes Auftreten Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme. Vancomycin- und/oder Ampicillin-resistente *E. faecalis*-Stämme findet man nur selten (Werner et al. 2008a). Der Anteil Vancomycin-resistenter *E. faecalis*-Isolate lag für Deutschland und die meisten anderen europäischen Länder 2001-2009 bei < 1 % (ECDC 2008 und 2009, PEG: PEG-Studie 2001/2004/2007). Der Ausbreitung Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme in deutschen Kliniken liegt zum einen die klonale Ausbreitung Vancomycin-resistenter *E. faecium*, zum anderen der horizontale Transfer von Glycopeptid-Resistenz-Determinanten zwischen unterschiedlichen klonalen Typen zugrunde (Werner et al. 2008a). Die seit 2003 in deutschen Krankenhäusern gehäuft auftretenden Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämme gehören größtenteils dem klonalen Komplex 17 (CC17) an (Klare et al. 2005, RKI

2008, Werner et al. 2008a). Die meist Ampicillin-resistenten und zum Teil Fluorchinolon-hochresistenten CC17-Stämme zeichnen sich durch den Besitz von Virulenzfaktoren wie *esp* (kodiert ein Enterokokken-Oberflächenprotein „*enterococcal surface protein*“) und *hyl* (kodiert eine vermeintliche Hyaluronidase) aus. Diese Stämme sind Hospital-assoziiert und besitzen ein erhöhtes Ausbreitungspotential im nosokomialen Milieu. Der Besitz der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten ist hierfür keine Voraussetzung (Klare et al. 2005, Leavis et al. 2003 und 2006, Rice et al. 2003, Werner et al. 2008a, Willems et al. 2001 und 2005). *E. faecium*-Stämme des CC17 sind heute in Krankenhäusern in ganz Deutschland zu finden (RKI 2008).

Den Daten verschiedener Surveillance-Systeme bzw. -Studien zufolge scheint sich die Rate Vancomycin-resistenter *E. faecium* innerhalb Deutschlands in den letzten Jahren zu stabilisieren (ECDC 2008 und 2009, PEG: PEG-Studie 2004/2007, RKI: Antibiotika-Resistenz-Surveillance ARS 2008-2010). Gestiegene Einsendungszahlen Vancomycin-resistenter *E. faecium* an das Referenzlabor des Robert Koch-Instituts Wernigerode 2010 und 2011 zeigen dennoch Ausbrüche und Häufungen in vielen deutschen Kliniken (I. Klare und G. Werner, Robert Koch-Institut Wernigerode, persönliche Mitteilung, 20.12.2011).

E. faecium gilt als Reservoir der übertragbaren *vanA*- und *vanB*-vermittelten Vancomycin-Resistenz (Werner et al. 2008a), deren geografische Verteilung sich teilweise recht unterschiedlich darstellt. Während in Deutschland (Klare et al. 2003 und 2005, Knoll et al. 2005, Wendt et al. 1999) und den restlichen Ländern Europas (Aarestrup et al. 2000a, Henard et al. 2011, Kühn et al. 2005), den USA (Harwood et al. 2001, Poole et al. 2005, Zirakzadeh und Patel 2005), Lateinamerika (Corso et al. 2007, Zanella et al. 2003) und Asien (Ko et al. 2005, Seo et al. 2005) der *vanA*-vermittelte Resistenztyp häufiger zu finden ist, überwiegt in Australien die *vanB*-kodierte Resistenz (Christiansen et al. 2004, Pearman 2006). In den letzten Jahren zeigen sich allerdings in verschiedenen Ländern Europas inklusive Deutschland verstärkt Häufungen und Ausbrüche mit Vancomycin-resistenten Enterokokken des VanB-Typs (Bourdon et al. 2011, RKI 2010, Söderblom et al. 2010; I. Klare und G. Werner, Robert Koch-Institut Wernigerode, persönliche Mitteilung, 20.12.2011).

1.2.9 VRE in der Nutztierhaltung

In Europa findet man Vancomycin-resistente *E. faecium*-Stämme nicht nur bei hospitalisierten Patienten, sondern auch bei gesunden Menschen außerhalb des Krankenhauses und bei Nutztieren (Klare et al. 1995a, 1995b und 2005, Werner et al. 2008b; siehe auch Punkt 4.8). Das vermehrte Auftreten Vancomycin-resistenter, hauptsächlich *vanA*-positiver, Enterokokken in der Nutztierhaltung lässt sich höchstwahrscheinlich auf den Einsatz von Avoparcin als Leistungsförderer zurückführen (Aarestrup et al. 2001, Klare et al. 1995b, Witte 1997). Avoparcin gehört zur Gruppe der Glycopeptid-Antibiotika. Es war in Deutschland als Futterzusatzstoff zugelassen und wurde bei Geflügel, Schwein, Rind als Leistungsförderer eingesetzt (BgVV 1996a). Seit Januar 1996 ist der Einsatz von Avoparcin in der Tierernährung auf nationaler Ebene verboten. Grundlage hierfür ist eine Dringlichkeitsverordnung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Seit April 1997 gilt dieses Verbot EU-weit. Die Begründung dieses Verbots liegt in dem Verdacht, dass der Einsatz von Avoparcin in der Nutztierhaltung die Therapiemöglichkeiten in der Humanmedizin durch eine Ausbreitung der Resistenz gegen Glycopeptide einschränkt (BgVV 1996b), da eine Kreuzresistenz zwischen Avoparcin und den in der Humanmedizin verwendeten Glycopeptid-Antibiotika Teicoplanin und Vancomycin besteht (VanA-Resistenztyp; Klare et al. 1995b). Eine Übertragung zwischen Tier und Mensch scheint über die Nahrungskette zu erfolgen. Hierfür sprechen Studien von Klein und Klare et al. Letztere konnten *vanA*-positive *E. faecium*-Stämme auf rohem Geflügelfleisch und Schweinehackfleisch nachweisen (Klare et al. 1995a). Klein et al. detektierten ebenfalls Vancomycin-resistente Enterokokken bei der Untersuchung von Rind- und Schweinehackfleisch (Klein et al. 1998). Desweiteren fanden Klare et al. *vanA*-positive *E. faecium*-Stämme in Stuhlproben von gesunden Menschen ohne Krankenhauskontakt (12 % von 100 untersuchten Personen; Klare et al. 1995a). Zusätzlich konnte man in *vanA*-positiven Enterokokken unterschiedlichen ökologischen Ursprungs (beispielsweise Isolate aus animalen Kotproben und Proben von gesunden Menschen ohne Krankenhauskontakt) identische *vanA*-Gencluster nachweisen (Werner et al. 1997; siehe auch Diskussion). Lester et al. bestätigten durch ihre Untersuchungen, dass eine Übertragung des *vanA*-Gens von animalen Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen auf humane Vancomycin-sensible *E. faecium*-Stämme im menschlichen Intestinaltrakt stattfinden kann (Lester et al. 2006).

1.2.10 Risikofaktoren für Kolonisation und Infektion durch VRE beim Menschen

Es existieren eine Reihe von Risikofaktoren für eine Kolonisierung und Infektion mit VRE. Einen signifikanten Faktor stellt eine vorangegangene Antibiotika-Therapie dar, v. a. wenn Antibiotika zum Einsatz kamen, die Vancomycin-resistenten Enterokokken einen Selektionsvorteil bieten (Simon et al. 2004, Wendt et al. 1998a). In einem Modell versuchte man den Einfluss von VRE-Prävalenz und Antibiotika-Therapie auf die VRE-Kolonisierung eines Patienten darzustellen. Man kam zu dem Ergebnis, dass bei niedriger VRE-Prävalenz in der Umgebung des Patienten, die Zeitspanne bis zur Aquirierung von VRE verkürzt wird, je mehr Antibiotika man ihm verabreicht. Bei hoher VRE-Prävalenz hatte dies jedoch nur einen geringen Einfluss (Bonten et al. 1996). Die VRE-Prävalenz in der räumlichen und pflegerischen Nähe des Patienten, sowie die Dauer seines Krankenhausaufenthaltes spielen ebenfalls eine Rolle (Simon et al. 2004, Wendt et al. 1998a). Während für eine VRE-Kolonisation patienteneigene Faktoren kaum von Bedeutung sind, stellen sie wichtige Risikofaktoren für VRE-Infektionen dar. Hier sind neben einer VRE-Kolonisierung (Wendt et al. 1998a), ein schlechter Allgemeinzustand (schweres Grundleiden) und Immunsuppression des Patienten zu nennen (Simon et al. 2004, Wendt et al. 1998a). Somit konzentriert sich das Auftreten dieser Infektionen auf bestimmte klinische Bereiche, wie Intensivstationen, Fachgebiete für Hämatologie/Onkologie und Organtransplantation (Werner et al. 2008a).

1.2.11 Übertragungswege von Enterokokken im Krankenhaus

Die Übertragungswege von VRE im klinischen Bereich sind vielfältig. Ausgehend von dem kolonisierten bzw. infizierten Patienten kommt es zu einer Kontamination der Patientenumgebung (Falk et al. 2000, Lemmen et al. 2004). Kontaminierte rektale Thermometer und Schwestern-Klingelknöpfe konnten beispielsweise als Quelle von VRE-Ausbrüchen identifiziert werden (Lior et al. 1996, Livornese et al. 1992). Bei Patienten mit Diarrhoe lässt sich eine vielfach größere Kontamination ihrer Umgebung beobachten (Boyce et al. 1994). Problematisch hierbei ist vor allem, dass Enterokokken auf unbelebten Oberflächen ohne Desinfektion Monate überleben können und somit eine stetige Weiterverbreitung der Erreger, verbunden mit Kolonisation und Infektion weiterer Personen – Personal, Mitpatienten, Besucher – stattfinden kann (Kramer et al. 2006). Doch nicht nur die unbelebte Umwelt spielt

eine Rolle bei der Übertragung von VRE. Die Hände behandelnder Ärzte, des Pflegepersonals und sonstiger Personen können durch den direkten Kontakt zum VRE-Patienten oder indirekt durch Berührung der verunreinigten Patientenumgebung kontaminiert werden und somit zur Verbreitung der Erreger beitragen (von Baum et al. 2006, Lemmen et al. 2004, Vonberg et al. 2007). Verschiedene Studien identifizierten Enterokokken als die Erreger mit dem höchsten Übertragungspotential bzw. mit der größten Übertragungsdichte in nosokomialen Bereichen (Bärwolff et al. 2005, Grundmann et al. 2005).

1.2.12 Prävention nosokomialer VRE-Fälle und VRE-Management im Krankenhaus

Um die nosokomiale Ausbreitung von VRE einzudämmen, ist ein Zusammenspiel verschiedener Maßnahmen von Nöten, deren Erfolg im Einzelnen oft nicht zu bestimmen ist (Simon et al. 2004, Werner et al. 2008a). Diese umfassen Präventionsmaßnahmen, die das Auftreten Vancomycin-resistenter Enterokokken-Stämme reduzieren sollen, sowie Hygienemaßnahmen, die helfen sollen, die Ausbreitung bereits aufgetretener VRE zu minimieren. Hierzu gibt es eine Vielzahl von Empfehlungen und einige Punkte werden kontrovers diskutiert. Der Umfang dieser Maßnahmen sollte individuell der jeweiligen lokalen epidemiologischen Situation angepasst werden (von Baum et al. 2006). Folgende Punkte müssen hierbei bedacht werden:

- Innerhalb eines Krankenhauses gibt es Bereiche und Patienten, die mit einem erhöhten Risiko für VRE-Besiedlung und -Infektion behaftet sind (von Baum et al. 2006, HICPAC 1995, Mascini und Bonten 2005, Vonberg et al. 2007, Werner et al. 2008a).
- Eine spontane Dekolonisierung des Intestinaltrakts ist nicht zu erwarten (Baden et al. 2001, Montecalvo et al. 1995, Roghmann et al. 1997, Vonberg et al. 2007) und eine selektive Dekontamination von Patienten mit intestinaler Besiedlung durch orale Antibiotikagabe blieb langfristig erfolglos (Kauffman 2003, Werner et al. 2008a).
- VRE-Ausbrüche sind nicht selbstlimitierend, ohne entsprechende Reaktion erfolgt keine Eindämmung der Ausbreitung (Bonten et al. 1998 und 2001, Christiansen et al. 2004, HICPAC 1995, Mascini und Bonten 2005, Pearman 2006, Schmidt-Hieber et al. 2007, Werner et al. 2008a).

Einige der Empfehlungen zu Prävention und VRE-Management werden im Folgenden aufgeführt:

- Vancomycin-Verbrauch

Ein gezielter, restriktiver Einsatz von Vancomycin kann helfen, die Ausbreitung der Vancomycin-Resistenz im Krankenhaus einzudämmen (HICPAC 1995). Quale et al. reduzierten den Vancomycin- und Clindamycineinsatz und verwendeten Ampicillin/Sulbactam und Tazobactam/Piperacillin anstelle von Cephalosporinen der dritten Generation, wodurch die Prävalenz der VRE-Besiedlung von 47 auf 15 % sank (Quale et al. 1996). Die Anwendung von Vancomycin sollte daher kritisch überdacht und auf bestimmte Indikationen beschränkt werden (HICPAC 1995). Dass dies in der Praxis häufig nicht der Fall ist, verdeutlichen folgende Studien: Laut Evans und Kortas war der Einsatz von Vancomycin bei 2/3 der Patienten ihrer Studie nicht indiziert (Evans und Kortas 1996). Logsdon et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Hier bestand in 54 % der untersuchten Fälle keine Indikation für eine Vancomycin-Anwendung (Logsdon et al. 1997).

- Identifikation von VRE-Trägern, Isolierungsmaßnahmen und ambulante Betreuung

Eine grundlegende Voraussetzung für alle anderen Barriere-Maßnahmen ist die Identifizierung von VRE-Trägern. Dies kann vor allem bei besiedelten asymptomatischen Patienten problematisch sein (DeLisle und Perl 2003, Wendt et al. 1998a). Die Durchführung eines VRE-Screenings kann hier helfen. Wie umfangreich ein solches Screening ausgelegt sein muss, ist umstritten. Das Vorgehen sollte jedoch epidemiologische und räumliche Gegebenheiten, sowie personelle, organisatorische und finanzielle Möglichkeiten berücksichtigen (Werner et al. 2008a). Orientieren kann man sich beispielsweise an Empfehlungen der HICPAC (HICPAC 1995) und an den Konsensusempfehlungen für den Umgang mit VRE-Trägern von 2006. Letztere stellen Basisanforderungen an ein VRE-Screening dar und umfassen neben weiteren Kontrollen bei Indexpatienten das Screenen von Kontaktpatienten, ein Aufnahme-Screening bei Transplantationspatienten sowie Patienten mit anamnestischem VRE-Nachweis und ein wöchentliches Screening im Rahmen von Ausbrüchen (von Baum et al. 2006).

Die Verantwortung der standardisierten und qualitätsgesicherten Identifizierung der VRE-Isolate liegt bei dem zuständigen mikrobiologischen Labor.

Ist ein Patient mit VRE kolonisiert, sollte in Betracht gezogen werden, diesen ambulant zu behandeln (Simon et al. 2004). Ist eine stationäre Behandlung nicht zu vermeiden, empfiehlt es sich, einen VRE-Träger in einem Einzelzimmer mit eigenen sanitären Anlagen zu isolieren. Eine Kohortenisolierung kann erfolgen (von Baum et al. 2006, HICPAC 1995), allerdings ist auf eine Trennung zu MRSA-Patienten zu achten, da es sonst zu einer Übertragung der *van*-vermittelten Resistenz auf *Staphylococcus aureus* kommen kann (von Baum et al. 2006, Chang et al. 2003, Miller et al. 2002, Vonberg et al. 2007). Eine patientenbezogene Betreuung ist sinnvoll (von Baum et al. 2006), wobei der Personalschlüssel der jeweiligen Arbeitsbelastung angepasst werden muss, um den Hygienestandard einzuhalten (Simon et al. 2004). Intrahospitale Transporte des VRE-Trägers sollten weitestgehend vermieden werden (von Baum et al. 2006, HICPAC 1995).

Die ambulante Betreuung von VRE-Trägern sollte zeitlich getrennt zu Patienten ohne VRE erfolgen, bestmöglich am Ende der Sprechzeiten. Nach Behandlung muss eine Wischdesinfektion verwendeter Hilfsmittel sowie der Untersuchungsliege erfolgen (von Baum et al. 2006).

- Händedesinfektion, Schutzkleidung und Umgebungsdesinfektion

Laut von Baum et al. stellt die Händedesinfektion die wichtigste Maßnahme zur Kontrolle der Ausbreitung von VRE im Krankenhaus dar (von Baum et al. 2006). Man konnte zeigen, dass VRE auf den Händen freiwilliger Probanden länger als 30 Minuten überleben können – 30 Minuten, in denen es zu Kontamination, Übertragung und Ausbreitung der Erreger durch die Hände betroffener Personen kommen kann (Noskin et al. 1995, Wade et al. 1991). Daher sollte auf eine angemessene Händehygiene größten Wert gelegt werden (von Baum et al. 2006, Noskin et al. 1995). Der Gebrauch von Einmalhandschuhen ist sinnvoll – er kann die Kontaminationsrate der Hände mit VRE um 70 % senken (Tenorio et al. 2001). Nach Ablegen der Handschuhe sollten die Hände gründlich desinfiziert werden (von Baum et al. 2006).

Auch durch das Tragen eines patientenbezogenen Schutzkittels während des Aufenthaltes im Patientenzimmer kann die nosokomiale Ausbreitung von VRE vermindert werden (von Baum et al. 2006). Man konnte zeigen, dass die Inzidenzdichte der

VRE-Besiedlung auf einer internistischen Intensivstation ohne Schutzkittel mehr als doppelt so hoch war wie mit Schutzkittel (Puzniak et al. 2004).

Im Rahmen der laufenden Desinfektion sollten patientennahe Flächen und der Fußboden mindestens einmal täglich desinfiziert werden (von Baum et al. 2006). Utensilien zur Untersuchung bzw. Pflege sollten patientenbezogen verwendet und nach Gebrauch gründlich desinfiziert werden (von Baum et al. 2006, Simon et al. 2004). Vor andersweiter Nutzung des Patientenzimmers sollte eine Schlussdesinfektion aller Kontaktflächen mit hierfür gutachterlich getesteten Desinfektionsmitteln stattfinden (von Baum et al. 2006).

- Information, Dokumentation und Meldepflicht

Umgehend nach Bekanntwerden von VRE-Besiedlungen/-Infektionen sollten alle an der Betreuung des Patienten beteiligten Personen sowie Angehörige über dessen Status bzw. erforderliche Maßnahmen informiert werden (AWMF 2009, von Baum et al. 2006, Simon et al. 2004). Vor- und weiterbehandelnde Personen und Einrichtungen müssen in Kenntnis gesetzt werden (AWMF 2009).

In Krankenhäusern und Einrichtungen für ambulantes Operieren muss das Auftreten nosokomialer Infektionen, sofern sie vom Robert Koch-Institut nach §4 des Infektionsschutzgesetzes festgelegt wurden, sowie das Auftreten von Erregern, die bestimmte Resistenzen zeigen, in einer Liste fortlaufend dokumentiert und bewertet werden (IfSG, §23 Absatz 4 und §4 Absatz 2 Nummer 2 Buchstabe b). So können Ausbrüche nosokomialer Infektionen rechtzeitig erkannt und Hygienemaßnahmen eingeleitet werden (Groß 2006). §6 Absatz 3 des Infektionsschutzgesetzes gibt vor, dass ein gehäuftes Auftreten nosokomialer Infektionen, sofern ein epidemischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder zumindest vermutet wird, dem zuständigen Gesundheitsamt unverzüglich nichtnamentlich als Ausbruch zu melden ist (IfSG, §6 Absatz 3).

1.2.13 VRE-Management am Durchführungsort der Studie – einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland

Die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten Studie erfolgte in einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland, das 25 medizinische Kliniken und Institute mit rund 4.000 Mitarbeitern umfasst. Neben 1169 stationären (Plan-) Betten stehen 78 Behandlungsplätze in den Tageskliniken und für Dialyse zur

Verfügung. Die Leistungsdaten für 2009 liegen bezüglich der Anzahl stationärer Patienten bei knapp 50.000, der ambulanter Patienten bei 220.000. Der Casemix-Index, der den durchschnittlichen Schweregrad der Patientenfälle beschreibt, beträgt 1,54. Alle Angaben beziehen sich auf das Jahr 2009 (KGU 2009).

2007 wurden in diesem Krankenhaus ein VRE-Screening und Isolierungsmaßnahmen nach Hygieneplan eingeführt (zuvor erfolgte die Regelung des Umgangs mit VRE Hausintern). Ziel des Screenings ist es, Patienten mit VRE frühzeitig zu erkennen, um eine weitere Ausbreitung zu verhindern und im Falle einer Infektion sofort eine adäquate Therapie einleiten zu können. Das Screening zählt zu den epidemiologisch-krankenhaushygienisch indizierten Untersuchungen, klinisch indizierte Untersuchungen, z. B. bei Patienten mit Verdacht auf eine VRE-Infektion, sind nicht Gegenstand der im Hygieneplan beschriebenen Maßnahmen.

Das Probenmaterial wird mittels steriler Abstrichtupfer entnommen und anschließend in das zugehörige Transportmedium gegeben. Bei jedem zu screenenden Patienten wird ein Rektalabstrich durchgeführt. Alternativ kann auch Stuhl zur Untersuchung eingeschickt werden. Bei intubierten und tracheotomierten Patienten wird zusätzlich ein Trachealabstrich genommen, bei solchen mit offenen Wunden oder krankhaft veränderten Hautstellen werden diese mit einem Tupfer abgestrichen, wobei für jede veränderte Stelle oder Wunde ein neuer Abstrichtupfer verwendet wird. Das Patientenkollektiv für routinemäßige Screeningabstriche setzte sich wie in Tabelle 1c dargestellt zusammen. Auf einigen Stationen erfolgten nach einem Eingangsscheck weitere Untersuchungen einmal wöchentlich. Einige Kliniken gingen über dieses Schema hinaus und screenen zusätzlich weitere Patientengruppen.

Tabelle 1c: Patientenkollektiv für routinemäßige Screeningabstriche in dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus

Patientenkollektiv
Kontaktpatienten ¹
Auf der Intensivstation aufgenommener Patient, wenn mit einem Intensivstation-Aufenthalt ≥ 24 h gerechnet wird
Patienten mit Kontakt zum ausländischen Gesundheitswesen ²

¹ Patienten, die länger als 12 Stunden mit einem Indexpatienten (Patienten mit nachgewiesener VRE-Besiedlung/-Infektion) auf einem Zimmer waren.

² Nur bei Kontakt zu Ländern mit einer höheren VRE-Prävalenz als in Deutschland.

Eine regelmäßige Kontrolle des VRE-Status von Indexpatienten wurde angestrebt. Um eine weitere Ausbreitung der VRE zu verhindern, wurden Isolierungsmaßnahmen durchgeführt. Die Isolierung erfolgte als Einzel- bzw. Kohortenisolierung und wurde aufgehoben, wenn drei negative Abstriche im Mindestabstand von einer Woche vorlagen. Isoliert wurden jedoch nicht nur Indexpatienten, sondern auch Patienten aus ausländischen Krankenhäusern vom Zeitpunkt ihrer Aufnahme bis zum Vorliegen eines negativen VRE-Befundes.

Diese Maßnahmen, wie eben beschrieben, wurden von 2007 bis Ende 2009 durchgeführt. 2010 erfolgte im VRE-Management die Umstellung auf Standardhygiene, bei Transplantationspatienten werden weiterhin ein VRE-Screening und Isolierungsmaßnahmen durchgeführt (Hygieneplan des beschriebenen südwestdeutschen Krankenhauses, Version 001/12.2009 sowie ältere Versionen; C. Brandt, Leiter des Bereiches Krankenhaushygiene am beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus, persönliche Mitteilung, 19.10.2011).

1.2.14 Wirtschaftliche Bedeutung von Enterokokken-Infektionen

VRE-Bakteriämien sind nicht nur mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert, sondern sind auch mit höheren Kosten für das Krankenhaus verbunden (DiazGranados et al. 2005, Salgado und Farr 2003, Song et al. 2003, Stosor et al. 1998). Eine Studie von Butler et al. zeigt, dass sowohl VRE- und VSE-Bakteriämien als auch die Vancomycin-Resistenz unabhängig mit signifikant erhöhten Krankenhauskosten assoziiert sind, VRE- und VSE-Bakteriämien auch mit einem verlängerten Krankenhausaufenthalt. Während dieser bei einem Patienten mit VRE-Sepsis bei

14,6 Tagen liegt, liegt er bei Patienten mit VSE-Sepsis bei 10 Tagen, bei Patienten ohne Enterokokken-Sepsis bei 4 Tagen (mediane Werte). Bei den für das Krankenhaus entstehenden Kosten zeigt sich ein ähnliches Gefälle: Die totalen Kosten, die für einen Patienten mit VRE-Sepsis entstehen, liegen bei 42.106 US\$, die für einen Patienten mit VSE-Sepsis bei 20.895 US\$ und die für einen Patienten ohne Enterokokken-Sepsis bei 8.192 US\$ (mediane Werte; Butler et al. 2010). Andere Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Stosor et al. zeigten, dass die Durchschnittskosten, die für das Krankenhaus bei Patienten mit VRE-Sepsis anfallen, um 27.000 \$ höher liegen als die, die für Patienten mit VSE-Sepsis anfallen (Stosor et al. 1998). Song et al. kommen zu dem Ergebnis, dass die Differenz der medianen Kosten, die ein Patient mit VRE-Sepsis bzw. ein Patient ohne Sepsis verursacht, bei 77.558 \$ liegen (Song et al. 2003). Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen weisen Butler et al. darauf hin, dass eine effektive Kontrolle der Ausbreitung von VRE auch aus finanziellen Gründen zu empfehlen sein könnte (Butler et al. 2010).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 Probenmaterial und Enterokokken-Isolate

Seit 2005 wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der in dieser Arbeit beschriebenen klinischen Einrichtung der Maximalversorgung in Südwestdeutschland Vancomycin-resistente *E. faecium*- und *E. faecalis*-Stämme aus Patientenmaterialien isoliert und in einer Stammsammlung aufbewahrt.

Bei den von 2005 bis 2009 in die Arbeit einbezogenen Materialien handelt es sich sowohl um Proben, die im Rahmen eines VRE-Screening-Programmes untersucht wurden, als auch um solche aus klinisch relevanten Materialien. Die 2010 isolierten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämme stammen aus einer eigens im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung. Hierbei wurde stichprobenartig eine Reihe von Rektalabstrichen, die aus anderen Gründen eingesandt worden waren, auf VRE gescreent. Diese Stämme wurden ebenfalls in die Stammsammlung aufgenommen.

Aus dieser Stammsammlung wurden 180 Stämme zur Bearbeitung ausgewählt, wobei aus jedem Jahr von 2005 bis einschließlich 2010 eine Reihe von Isolaten gewählt wurde. Die Stämme aus 2009 und 2010 wurden zusammengefasst. Eine jährweise Auflistung der untersuchten Stämme aus diesem Zeitraum findet sich in Tabelle 2a.

Tabelle 2a: In die Arbeit einbezogene Vancomycin-resistente *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme

Jahr	Anzahl der untersuchten Stämme (n=180)		
	Invasive Isolate (Blutkulturen)	Sonstige Isolate (z. B. Rektalabstriche; siehe Tabelle 2b)	gesamt
2005	1	54	55
2006	1	26	27
2007	1	28	29
2008	17	15	32
2009/2010	11	26	37
gesamt	31	149	180

Während nur ein Teil der von 2005 bis 2010 vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene isolierten und archivierten Enterokokken-Stämme aus Abstrich-Isolaten und sonstigen Isolaten untersucht wurde, wurden hingegen alle Blutkultur-Isolate untersucht. Die auffallend niedrige Anzahl an Blutkultur-Isolaten in den Jahren 2005, 2006 und 2007 entspricht allerdings nicht der Anzahl der in diesen Jahren aus Blutkulturen isolierten VRE, sondern der heute noch zur Verfügung stehender Stämme (Tabelle 2i).

Die Enterokokken-Stämme, die in die Untersuchungen einbezogen wurden, wurden aus verschiedenen Probenmaterialien isoliert (Tabelle 2b). Das Material stammt von Patienten verschiedener Fachgebiete (Abbildung 3k).

Pro Patient (n=179) wurde ein Isolat der gleichen Spezies untersucht. Von einem Patienten stammen sowohl ein *E. faecalis*- als auch ein *E. faecium*-Isolat.

Tabelle 2b: Numerische Auflistung des Probenmaterials, aus dem die einbezogenen *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme isoliert wurden

Probenmaterial	Anzahl der einbezogenen Proben (n _{gesamt} =180)
Primär sterile Flüssigkeiten/Materialien	
Blutkultur	31
Abdominalabstrich	4
ZVK-Spitze	4
Ascites	2
Drainagenabstrich	2
Abszessabstrich	1
Liquor	1
Pleurapunktat	1
Thoraxabstrich	1
Flüssigkeit ohne weitere Angaben	3
Primär nicht sterile Flüssigkeiten/Materialien	
Anal-/Rektalabstrich	63/26
Stuhl	15
Urin	11
Wundabstrich	4
Bronchialsekret	2
Nasenabstrich	2
Trachealsekret	2
Axillenabstrich	1
Fistelabstrich	1
Genitalabstrich	1
Rachenabstrich	1
Abstrich ohne weitere Angaben	1

2.1.1.2 Referenzstämme

Die in Tabelle 2c aufgeführten Stämme wurden als Referenzstämme verwendet. Sie dienten als Positivkontrollen im Rahmen der PCR sowie als Standards bei der PFGE und wurden zur Qualitätskontrolle eingesetzt.

Tabelle 2c: Einbezogene Referenzstämme und Angabe ihrer Verwendung

Bezeichnung	Stamm	Herkunft/Bemerkung	Positivkontrolle
DSM 12956 ATCC 51299	<i>E. faecalis</i>	DSMZ	<i>vanB</i> -PCR
DSM 13591 CIP 110054	<i>E. faecalis</i>	DSMZ	<i>vanA</i> -PCR
VRE 2	<i>E. faecium</i>	Klinisches Isolat des beschriebenen	<i>hyl</i> -PCR
VRE 3	<i>E. faecium</i>	Krankenhauses der Maximalversorgung in	<i>E. faecium</i> -/ <i>hyl</i> -PCR
VRE 4	<i>E. faecium</i>	Südwestdeutschland. Phäno- und genotypisch charakterisiert am Robert Koch-Institut.	<i>E. faecium</i> -/ <i>esp</i> -/ <i>hyl</i> -PCR
VRE-Freiburg 137	<i>E. faecium</i>	Isolat des Instituts für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene	<i>esp</i> -PCR
VRE-Freiburg 830	<i>E. faecium</i>	des Freiburger Universitätsklinikums. Hier auch phäno- und genotypisch charakterisiert.	
			Qualitätskontrolle
DSM 2570 ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	DSMZ	Daptomycin-Etest [®]
			Standard
NCTC 8325 PS 47(36)	<i>S. aureus</i>	NCTC	PFGE

2.1.2 Geräte

Brutschrank

Heraeus Typ B 20, Thermo Electron LED GmbH,
Langenselbold, Deutschland

Densitometer

Densimat, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich

Disk Dispenser	Disk dispenser Mk III (90 mm, für acht Blättchen), Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland
Geldokumentationssystem	Gel Doc™ XR mit Universal Hood II und Quantity One® 1D Analysis Software, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland Photoprint, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelelektrophoresesystem	HORIZON® 11•14, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Gelkammer	Gel Casting System 11•14, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Inkubator	Inkubator Haube TH30 kombiniert mit Schüttler SM30, Edmund Bühler GmbH Hechingen, Deutschland
Mikrowelle	Microwave & Grill, Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland Severin 700, Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Netzgeräte Gelelektrophorese	Consort E 265, Turnhout, Belgien Consort EV 443, Turnhout, Belgien
PCR-Thermocycler	Thermocycler T3000, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter CG 840, Schott Geräte GmbH, Hofheim

	am Taunus, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Pipetman, Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich
Pipettor	Pipetboy comfort, Integra biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Pulsfeld-Gelelektrophoresesystem mit Gelkammer und Kamm	CHEF-DR™ III-System, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät	MS2 Minishaker, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
	Typ REAX 1 DR, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
	Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA

Waage	Analysewaage Typ 822-36, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	Analysewaage Vibra CG series, Shinko Denshi Co., Ltd., Tokio, Japan
	Semi-Mikrowaage Sartorius research Typ R180D- *D1, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterial

API rapid ID 32 STREP	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Deckgläschen	VEB Jenaer Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena, Deutschland
Gießblock mit Schieber	Disposable Plug Mold, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Glasgefäße	Becherglas 100 ml Rasotherm, VEB Jenaer Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena, Deutschland
	Erlenmeyerkolben 300 ml Duran [®] , DURAN-Group GmbH, Wertheim am Main, Deutschland
	Glasröhrchen 80 x 17,75 x 0,55 mm, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
	Glasröhrchen mit Verschluss 20 ml, VEB Jenaer Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena, Deutschland

Glasröhrchen 16 cm x 16 mm, VEB Jenaer
Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena,
Deutschland

Laborglasflasche 250 ml DURAN[®], DURAN-Group
GmbH, Wertheim am Main, Deutschland

Messzylinder 50 ml DURAN[®], DURAN-Group
GmbH, Wertheim am Main, Deutschland

Messzylinder 100 ml, Isolab Laborgeräte GmbH,
Wertheim, Deutschland

Messzylinder 250 ml DURAN[®], DURAN-Group
GmbH, Wertheim am Main, Deutschland

Zentrifugenglasröhrchen 25 ml Jena Therm, VEB
Jenaer Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena,
Deutschland

Glasstäbchen

VEB Jenaer Glaswerk SCHOTT & Genossen, Jena,
Deutschland

Kits
(inkludierte Materialien
siehe Anhang)

HotStarTaq Master Mix Kit, Qiagen GmbH, Hilden,
Deutschland

Prolex[™] streptococcal grouping latex kit, Pro-lab
diagnostics, Neston, Vereinigtes Königreich

PYR 50 Test Kit, Remel products, Lenexa,
Kansas, USA

QIAamp[®] DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden,
Deutschland

	Taq DNA Polymerase recombinant, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatte	PS-Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfen, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger	Objektträger 76 x 26 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten (Einmal-Pipetten)	Stripette [®] , Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
	Transferpipette, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S Dualfilter 100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	epT.I.P.S Standard 100 µl, 1000 µl, 5000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Premium Tips, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Safe Seal Tips [®] Premium, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	TipOne [®] , Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Plastikimpfösen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Plastikröhrchen	PS-Röhrchen 12 ml, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Reaktionsgefäße	PCR-Tubes 0,2 ml, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
	Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Wattetupfer	WS-Laborservice GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
-------------	--

2.1.4 Kulturmedien

BHI-Bouillon	BBL™ Brain Heart Infusion, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
--------------	--

Typische Zusammensetzung in g/l:

Hirn-Herz-Infusion	6,0
Pepton A	6,0
Gelatinepepton	14,5
Dextrose	3,0
Natriumchlorid	5,0
Di-Natriumphosphat	2,5

Cryobank- Stammhaltungssystem	Mast Diagnostica Laboratoriumspräparate GmbH, Reinfeld, Deutschland
----------------------------------	--

Enterococcosel™ Agar with Vancomycin 8 µg/ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
---	--

Typische Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton	17,0
Pepton A	3,0
Hefeextrakt	5,0
Rindergalle	10,0

	Natriumchlorid	5,0
	Äsculin	1,0
	Eisenammoniumcitrat	0,5
	Natriumazid	0,25
	Natriumcitrat	1,0
	Agar	13,5
	Zusätzlich Vancomycin	8 mg
Müller-Hinton-Agar	heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland	
	Typische Zusammensetzung in g/l:	
	Rindfleischinfusion	6,0
	Caseinhydrolysat	17,5
	Stärke	1,5
	Agar	11,0
Müller-Hinton-Agar mit Schafblut	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland	
	Typische Zusammensetzung in g/l:	
	Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g	2,0
	Caseinhydrolysat	17,5
	Stärke	1,5
	Agar	17,0
	Angereichert mit 3 % Schafblut	
Schafblutagar	heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland	
	Typische Zusammensetzung in g/l:	
	Caseinpepton	14,0
	Fleischpepton	4,5
	Hefeextrakt	4,5
	Agar	16,0

Natriumchlorid	5,0
----------------	-----

Zusätzlich Hammelblut	50 ml
-----------------------	-------

2.1.5 Chemikalien

Agarose	Agarose, For Routine Use, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
---------	---

Agarose Type II, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
--

Agarose- low melting point	InCert® Agarose, FMC BioProducts, Philadelphia, Pennsylvania, USA
-------------------------------	---

API-Reagenzien	NIN, FB, VP A, VP B, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
----------------	---

Aqua	Aqua ad iniectabilia, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
------	--

Borsäure	M 61,83 g/mol, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
----------	---

M 61,83 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
--

Bromphenolblau	M 691,94 g/mol (Natrium-Salz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
----------------	--

M 691,94 g/mol (Natrium-Salz), Feinchemie K.H. Kallies KG, Sebnitz, Deutschland

dNTPs	Roti-Mix PCR 3, 10-11 mM, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
-------	---

EDTA Chelaplex II	EDTA, M 292,3 g/mol, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EDTA Chelaplex III	EDTA-Dinatriumsalz, M 372,24 g/mol, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
	EDTA-Dinatriumsalz, M 372,3 g/mol, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolut, mindestens 99,8 Volumen-%, M 46,07 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	Rotipuran [®] , Ethanol 99,8 %, M 46,07 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml), AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	≥ 99,5 %, M 74,56 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	M 203,3 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	M 58,44 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
	≥ 99 %, M 58,44 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Natrium-Desoxycholat	M 414,56 g/mol, VEB Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Natriumhydroxid	Riedel-de-Haën Natriumhydroxid-Plätzchen, ≥ 99 %, M 40,0 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Natriumhydroxid-Plätzchen, ≥ 99 %, M 40,01 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Laurylsarcosin (Sarkosyl)	M 271,40 g/mol, ≥ 94 %, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyalkylenglycolether	Brij 58, M 1050 g/mol, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Saccharose	D (+)-Saccharose, ≥ 99,5 %, M 342,30 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Salzsäure 37 % reinst, M 36, 46 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Trizma [®] base, ≥ 99,9 %, M 121,14 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Tris Pufferan [®] , ≥ 99,3 %, M 121,14 g/mol, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2.1.6 Enzyme	
Lysostaphin	aus <i>Staphylococcus staphylolyticus</i> , 397 Units/mg Feststoff, 625,4 Units/mg Protein, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Lysozym	aus Hühnereiweiß, Protein $\geq 90\%$, 46.900 Units/mg Feststoff, 49.900 Units/mg Protein, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	aus <i>Tritirachium album</i> , ≥ 30 Units/mg Protein, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Restriktionsenzym Endonuklease Sma I	aus <i>Serratia marcescens</i> _{Sb} , 5000 Units (10 Units/ μ l), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ribonuklease	Ribonuklease A Typ I-AS aus bovinem Pankreas, 48 Kunitz-Units/mg Feststoff, 70 Kunitz-Units/mg Protein, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.7 Antibiotika-Testblättchen bzw. Etest[®]-Streifen

Etest[®] bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Tabelle 2d: Verwendete Etest[®]-Streifen

Antibiotikum	MHK-Bereich (μ g/ml)
Daptomycin	0,016-256
Gentamicin (<i>high level</i> -Resistenz)	0,064-1024
Linezolid	0,016-256
Teicoplanin	0,016-256
Tigecyclin	0,016-256
Vancomycin	0,016-256

Testblättchen zur
Empfindlichkeitsprüfung

Neo Sensitabs™, Inverness Medical Deutschland
GmbH, Köln, Deutschland

Tabelle 2e: Verwendete Testblättchen

Antibiotikum	Menge Antibiotikum pro Blättchen (µg)
Furazolidon	50
Mupirocin	10
Vancomycin	5

Testblättchen zur
Empfindlichkeitsprüfung

Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland

Tabelle 2f: Verwendete Testblättchen

Antibiotikum	Menge Antibiotikum pro Blättchen (µg)
Ampicillin	10
Doxycyclin	30
Erythromycin	15
Levofloxacin	5
Linezolid	30
Nitrofurantoin	200
Rifampicin	5
Tigecyclin	15

2.1.8 Lösungen und Puffer

Agarosegel – 1 %iges Agarosegel (PFGE)

Agarose	1,2 g
TBE-Puffer 1x	120 ml

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 1,2 g Agarose in ein Glasgefäß eingewogen. Hierzu wurden 120 ml TBE-Puffer 1x gegeben. Dieser Ansatz wurde zweimal 2 min in der Mikrowelle (595 Watt) erhitzt, bis das Agarosegel frei von Schlieren war. Anschließend wurde das Gel in die dafür vorgesehene Gelkammer gegossen.

Agarosegel – 1,2 %iges low melting point-Agarosegel (PFGE)

Low melting point-Agarose	30 mg
PIV-Lösung	2,5 ml

Zur Herstellung des low melting point-Agarosegels für 30 Proben wurden 30 mg low melting point-Agarose in ein Glasröhrchen eingewogen. Hierzu wurden 2,5 ml PIV-Lösung pipettiert und der Ansatz in einem Wasserbad über dem Gasbrenner erhitzt, bis das Agarosegel frei von Schlieren war.

Agarosegel – 1,5 %iges Agarosegel (PCR-Produkte)

Agarose	1,5 g
TBE-Puffer 0,5x	100 ml

1,5 g Agarose wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und anschließend 100 ml 0,5x konzentrierter TBE-Puffer hinzugegeben. Der Kolben mit den darin enthaltenen Substanzen wurde in der Mikrowelle (800 Watt) 1,5 min erhitzt, kurz geschwenkt und weitere 1,5 min erhitzt. Das Agarosegel, das nun frei von Schlieren war, wurde in die mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen.

Bromphenolblau-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25 g
Saccharose	40 g
Aqua bidest.	100 ml

Die Substanzen wurden gemischt und bei +4° C gelagert.

Bromphenolblau-Ladepuffer (PFGE)

Natrium-EDTA (Chelaplex III)	40 mg
Saccharose	4 g
Bromphenolblau	3 mg
Aqua bidest.	10 ml

Die Substanzen wurden dem Aqua bidest. nacheinander hinzugegeben. Zum besseren Lösen wurde das Gemisch erwärmt. Die Lösung wurde bei +4° C gelagert.

ESP-Lösung (PFGE)

ES-Puffer

Proteinase K

Pro zu untersuchendem Stamm wurde 1 ml ES-Puffer und 1 mg Proteinase K angesetzt. Zum besseren Lösen der Proteinase K im ES-Puffer wurde der Ansatz ins Wasserbad gegeben. Die Lösung wurde sofort verwendet.

ES-Puffer (PFGE)

Natrium-EDTA	0,5 M
(Chelaplex III; pH 9)	
Aqua bidest.	90 ml
Sarcosyl	1 %

Natrium-EDTA und Aqua bidest. (90 ml für 30 Proben) wurden gemischt und der pH-Wert der Lösung auf 9,0 eingestellt. Nun wurde 1 % Sarkosyl hinzugegeben. Es folgte eine Kontrolle des pH-Wertes (9,0). Die Lösung wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Ethidiumbromidlösung (PFGE/Gelelektrophorese der PCR-Produkte)

Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml)	100 µl
Aqua bidest.	1000 ml

Die Substanzen wurden gemischt und die Ethidiumbromidlösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Kochsalzlösung (5 M) (PFGE)

Natriumchlorid	5 M
Aqua bidest.	ad 100 ml

Nach dem Mischen der Substanzen wurde die Lösung bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

Kochsalzlösung, physiologisch

Natriumchlorid	0,9 %
Aqua bidest.	1000 ml

Das Natriumchlorid wurde in Aqua bidest. gelöst und anschließend bei 121° C für 20 min autoklaviert.

Lysis-Lösung (PFGE)

Aqua bidest.	18 ml
Tris-Salzsäure-Lösung (pH 8)	6 mM
Natriumchlorid-Lösung (5M)	1 M
Natrium-EDTA-Lösung (Chelaplex III; pH 8)	100 mM
Polyalkylenglycoether	0,5 %
Natrium-Desoxycholat	0,2 %
Natrium-Laurylsarcosin (Sarkosyl)	0,5 %

Nach dem Mischen der Tris-Salzsäure-Lösung und Aqua bidest. (18 ml für 30 ml Lysislösung, das heißt für 30 Proben) wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,6 eingestellt. Nun wurden die restlichen Substanzen hinzugegeben. Nach der Kontrolle bzw. dem erneuten Einstellen des pH-Wertes auf 7,6, wurde die Lösung bei 121° C für 20 min autoklaviert und bei -20° C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lysis-Lösung wurde die RNase-Lösung (180 µl für 30 Proben) und Lysozym (30 mg für 30 Proben) hinzugegeben. Zur Lysis-Lösung für den *S. aureus*-Kontrollstamm wurde zusätzlich noch Lysostaphin (Spatelspitze) hinzugefügt.

Natrium-EDTA-Lösung (0,5 M)

EDTA (Chelaplex III)	0,5 M
Aqua bidest.	ad 2000 ml

Die Substanzen wurden gemischt und der pH-Wert des Ansatzes durch Hinzugeben von Natriumhydroxid auf 8,0 eingestellt. Der Ansatz wurde sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Natrium-EDTA-Lösung (0,5 M) (PFGE)

EDTA (Chelaplex III)	0,5 M
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Substanzen wurden gemischt und der pH-Wert des Ansatzes durch Hinzugeben von Natriumhydroxid auf 8,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

PIV-Lösung (PFGE)

Tris-Salzsäure-Lösung (pH 8)	10 mM
Natriumchlorid-Lösung (5 M)	1 M
Aqua bidest.	ad 100ml

Die Substanzen wurden gemischt und der pH-Wert der Lösung auf 7,6 eingestellt. Die Lösung wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert und anschließend bei -20°C gelagert.

RNase-Lösung (10 mg RNase/ml Tris-Salzsäure-Natriumchlorid-Lösung) (PFGE)

Tris-Salzsäure-Lösung (pH 8)	10 mM
Natriumchlorid	15 mM
Aqua bidest.	ad 10 ml

Nach dem Mischen der Substanzen wurde Aqua bidest. ad 10 ml hinzugegeben und der pH-Wert der Lösung auf 7,5 eingestellt. Zu 1 ml dieses Ansatzes wurden 10 mg RNase gegeben. Nach 15-minütigem Kochen und langsamen Abkühlen der Lösung, wurde die RNase-Lösung (10 mg RNase/ml Tris-Salzsäure-Natriumchlorid-Lösung) zur Lysis-Lösung hinzugegeben. Für 30 Proben waren dies 180 μl RNase-Lösung zu 30 ml Lysislösung. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

Sma I-Inkubationspuffer A 10x (Roche) (PFGE)

Sma I-	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Inkubationspuffer A 10x	

Laut Begleitzettel hat dieser Puffer folgende Zusammensetzung:

Trisacetat	33 mM
Kaliumacetat	66 mM
Magnesiumacetat	10 mM
Dithiothreit	0,5 mM

Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7,9 (bei 37°C). Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vor Gebrauch wurde der Puffer aufgetaut und mittels einer 1:10-Verdünnung mit Aqua bidest. wurde der, für den Restriktionsansatz benötigte, Sma I-Puffer 1x hergestellt. Je Probe benötigt man 50 µl Sma I-Inkubationspuffer A 1x und 4 µl Sma I-Enzym (10 Units/µl) (Arbeitsschritt – auf Eis – für 30 Proben: 1350 µl Aqua bidest. + 150 µl Sma I-Inkubationspuffer A 10x in ein Eppendorfgefäß pipettieren und mittels Vortexer mischen. Dann 120 µl Sma I-Enzym hinzupipettieren und vortexen).

Sma I-Puffer 10x (Eigenprodukt zum Äquilibrieren) (PFGE)

Kaliumchlorid	20 mM
Tris	6 mM
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	6 mM
Aqua bidest.	9,7 ml

Die Substanzen wurden mit Aqua bidest. (9,7 ml für 10 ml-Ansatz) gemischt, der pH-Wert der Lösung auf 8,0 eingestellt und der Ansatz bei 121°C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vor Gebrauch wurde der Puffer aufgetaut und mittels einer 1:10-Verdünnung mit Aqua dest. wurde der, für die Äquilibrierung benötigte, Sma I-Puffer 1x hergestellt (für 30 Proben: 3 ml Sma I-Puffer 10x + 27 ml Aqua dest.).

TBE-Puffer (5x konzentriert)

Tris	450 mM
Borsäure	450 mM
Natrium-EDTA-Lösung	10 mM
Aqua dest.	ad 2000 ml

Die Substanzen wurden zunächst gemischt, dann mit Aqua dest. ad 2000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Die Herstellung von 0,5x konzentriertem TBE-Puffer erfolgte durch eine 1:10-Verdünnung mit Aqua dest.

TBE-Puffer (1x konzentriert) (PFGE)

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA (Chelaplex II)	2 mM
Aqua bidest	ad 2000 ml

Die Substanzen wurden gemischt und mit Aqua bidest. ad 2000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8,0 eingestellt. Der Ansatz wurde bei 121°C für 20 min autoklaviert und bei +4°C gelagert.

TE-Puffer

Tris	10 mM
Natrium-EDTA (Chelaplex III)	1 mM
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Substanzen wurden gemischt und der pH-Wert des Puffers auf 8,0 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz sterilfiltriert und bei +4°C gelagert.

TE-Puffer (PFGE)

Tris-Salzsäure-Lösung (pH 8)	10 mM
Natrium-EDTA-Lösung (pH 8; Chelaplex III)	1 mM
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Substanzen wurden gemischt und mit Aqua bidest. ad 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren des Ansatzes bei 121°C für 20 min, wurde dieser bei +4°C gelagert.

Tris-Salzsäure-Lösung (2 M) (PFGE)

Tris	2 M
Aqua bidest.	85 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

Nach dem Mischen der Substanzen wurde der pH-Wert des Ansatzes durch Hinzugeben von konzentrierter Salzsäure auf 8,0 eingestellt. Im Anschluss wurde die Lösung mit Aqua bidest. ad 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei +4°C gelagert.

2.1.9 Marker und Primer

Basenpaarmarker 123 bp DNA Ladder 1,0 µg/µl, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

100 bp DNA Ladder 500 µg/ml, New England Biolabs®, Ipswich, Massachusetts, USA

Primer Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 2g: Verwendete Primer

Gen	Name	Gensequenz (5' → 3'- Richtung)
<i>vanA</i>	van A1	TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC (Klare et al. 2005)
	van A2	GG AGT AGC TAT CCC AGC ATT (Klare et al. 2005)
<i>vanB</i>	van B1	CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA (Klare et al. 2005)
	van B2	GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT (Klare et al. 2005)
<i>esp</i>	esp TIM1	CTT TGA TTC TTG GTT GTC GGA TAC (Klare et al. 2005)
	esp TIM2	TTC AAC TAC CAC GGT TTG TTT ATC (Klare et al. 2005)
<i>hyl</i>	hyl Efm1	GAG TAG AGG AAT ATC TTA GC (Klare et al. 2005)
	hyl Efm2	AGG CTC CAA TTC TGT (Klare et al. 2005)
Spezies-spezifische <i>E. faecium</i> rDNS-Sequenz	E. faecium1	TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG (Cheng et al. 1997)
	E. faecium2	TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC (Cheng et al. 1997)

Entsprechend des Protokolls von MWG wurde eine Gebrauchsverdünnungslösung der Primer in der gewünschten Konzentration (20, 50 bzw. 100 pmol/μl) hergestellt, indem nach Zentrifugation der die Primer enthaltenden Röhrchen die angegebene bzw. errechnete Menge TE-Puffer hinzugegeben wurde. Die Gebrauchsverdünnungslösungen der Primer wurden bei -8° C gelagert.

metabion international AG, Martinsried,
Deutschland

Tabelle 2h: Verwendete Primer

Gen	Name	Genesequenz (5' → 3'- Richtung)
<i>adk</i>	<i>adk1</i>	TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG (http://efaecium.mlst.net)
	<i>adk2</i>	GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT (http://efaecium.mlst.net)
<i>atpA</i>	<i>atpA1</i>	CGG TTC ATA CGG AAT GGC ACA (http://efaecium.mlst.net)
	<i>atpA2</i>	AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG (http://efaecium.mlst.net)
<i>ddl</i>	<i>ddl1</i>	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G (http://efaecium.mlst.net)
	<i>ddl2</i>	AAA AAG AAA TCG CAC CG (http://efaecium.mlst.net)
<i>gdh</i>	<i>gdh1</i>	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT (http://efaecium.mlst.net)
	<i>gdh2</i>	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA (http://efaecium.mlst.net)
<i>gyd</i>	<i>gyd 1</i>	CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C (http://efaecium.mlst.net)
	<i>gyd2</i>	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC (http://efaecium.mlst.net)
<i>pstS</i>	<i>pstS1</i>	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G (http://efaecium.mlst.net)
	<i>pstS2</i>	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC (http://efaecium.mlst.net)
<i>purK</i>	<i>purK1n</i>	CAG ATT GGC ACA TTG AAA G (http://efaecium.mlst.net)
	<i>purK2n</i>	TTC ATT CAC ATA TAG CCC G (http://efaecium.mlst.net)

Entsprechend des Protokolls von metabion wurde eine Gebrauchsverdünnungslösung der Primer in der gewünschten Konzentration (100 pmol/μl) hergestellt, indem nach Zentrifugation der die Primer enthaltenden Röhrchen die angegebene Menge TE-Puffer hinzugegeben wurde. Die Gebrauchsverdünnungslösungen der Primer wurden bei -8° C gelagert.

2.1.10 Software

Analyse-Software

BioNumerics 6.0, Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien

Quantity One[®] 1D Analysis Software, BioRad
Laboratories GmbH, München, Deutschland

goeBURST 1.2.1, <http://goeburst.phyloviz.net>

Apiweb[™] bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Identifizierungssoftware

Hybase 6[®] Statistik- und Tieto Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
Analysesystem

Orbis Klinikinformationssystem Agfa HealthCare GmbH, Berlin, Deutschland

Sequenzanalyse-Software DNASTAR-Lasergene, DNASTAR Incorporated,
Madison, Wisconsin, USA

Ridom TraceEditPro, Ridom GmbH, Münster,
Deutschland

Swisslab Swisslab GmbH, Berlin, Deutschland
Laborinformationssystem

Im Rahmen des *Multi Locus Sequence Typings* verwendete Homepage

(Informationen zur Durchführung des MLSTs, Datenauswertung):

<http://www.mlst.net> bzw. <http://efaecium.mlst.net> (Datenstand 01.02.2011)

2.2 Methoden

2.2.1 Stammauswahl

Da nicht alle zwischen 2005 und 2010 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung isolierten Vancomycin-resistenten *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden konnten, musste eine Vorauswahl hinsichtlich der zu

typisierenden Stämme getroffen werden, welche die VRE-Situation an diesem Krankenhaus angemessen repräsentiert.

Um dies zu erreichen, wurden 180 Isolate ($n_{E. faecium}=179$, $n_{E. faecalis}=1$) charakterisiert, die aus verschiedenen Fachgebieten ($n=18$) und von Patienten unterschiedlichen Geschlechts und Alters stammen (siehe Punkt 3.10.1, 3.10.2 und 3.10.3). Da die absolute Anzahl der untersuchten Stämme ihre Repräsentativität betreffend wenig aussagt, stellt Tabelle 2i die Relation zwischen den in dieser Arbeit untersuchten *E. faecium*-Isolaten und den Erstnachweisen Vancomycin-resistenter *E. faecium* (berücksichtigt wurde hierbei ein Erregernachweis pro Patient im gleichen Material) an dieser Einrichtung zwischen 2005 und 2010 dar.

Tabelle 2i: Relation zwischen untersuchten Isolaten und Erstnachweisen Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme an einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland zwischen 2005 und 2010

Jahr	Erstnachweise Vancomycin-resistenter <i>E. faecium</i> an einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland		Untersuchte Isolate (Anteil der untersuchten Isolate an entsprechenden Erstnachweisen in %)	
	Alle Materialien	BK	Alle Materialien	BK
2005	180	4	55 (30,6)	1 (25,0)
2006	243	11	26 (10,7)	1 (9,1)
2007	169	15	29 (17,2)	1 (6,7)
2008	201	25	32 (15,9)	17 (68,0)
2009/2010	306	14	37 (12,1)	11 (78,6)
gesamt	1099	69	179 (16,3)	31 (44,9)

Da 2009 nur 13 Isolate (davon 11 BK) für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung standen und um etwas mehr Aktualität zu gewährleisten, wurden Anfang 2010 weitere Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme aus Abstrichen isoliert ($n=24$). Diese 24 2010 isolierten *E. faecium*-Isolate sind die einzigen Stämme, die für das Jahr 2010 in die Zahl der Erstnachweise eingehen. Die 2009 und 2010 isolierten Stämme wurden zusammengefasst.

2.2.2 Isolierung von Enterokokken-Stämmen aus Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde mit einem Wattetupfer auf Enterococcosel™-Agar (Vancomycin 8 µl/ml) ausgestrichen und bis zu 48 h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Dieser modifizierte Äsculin-Galle-Agar dient der Detektion und selektiven Anzucht von Vancomycin-resistenten Enterokokken.

Die selektiven Eigenschaften des Enterococcosel™-Agars beruhen auf folgenden Prinzipien: Die Ochsen-galle inhibiert das Wachstum anderer gram-positiver Bakterien als Enterokokken, während Natriumazid das Wachstum gram-negativer Bakterien hemmt. D-Streptokokken, einschließlich der früher hierzu gezählten Enterokokken, hydrolysieren Äsculin zu Äsculetin und Dextrose. Äsculetin reagiert mit Eisenverbindungen, in diesem Fall mit dem im Agar enthaltenen Eisencitrat, unter Bildung dunkelbrauner bis schwarzer Komplexe. Die Kolonien von *Enterococcus spp.* erscheinen somit auf dem verwendeten Agar dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Da der Agar Vancomycin enthält, können nur Vancomycin-resistente Enterokokken wachsen (Packungsbeilage Enterococcosel™-Agar with Vancomycin 8 µl/ml, Stand 2010).

Verdächtige Kolonien wurden auf Schafblutagar isoliert und 24 h bei 37°C bebrütet. Von den Reinkulturen wurden dann mit einem Wattetupfer mehrere Kolonien abgenommen und in sterile 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung eingebracht. Mit Hilfe eines Densitometers wurde eine Bakteriensuspension hergestellt, die dem Mc Farland Standard 0,5 entsprach. Mit dieser Suspension wurde eine Müller-Hinton-Agarplatte durch mäanderförmiges Ausstreichen des Tupfers (zweimalige Wiederholung, wobei die Platte jeweils um 60° gedreht wurde) auf der Ag aroberfläche beimpft. Zur vorläufigen Speziesdifferenzierung und Bestätigung der Vancomycin-Resistenz wurden folgende Antibiotika-Blättchen auf den beimpften Agar aufgelegt:

Furazolidon	(50 µg)
Mupirocin	(10 µg)
Vancomycin	(5 µg)

Die so vorbereiteten Platten wurden 24 h bei 37°C im Brutschrank bebrütet und anschließend bezüglich der Speziesdifferenzierung, wie in [Tabelle 2j](#) dargestellt, ausgewertet. Stämme mit einem fehlenden Hemmhof um das jeweilige Blättchen galten als Furazolidon- bzw. Mupirocin-resistent.

Tabelle 2j: Kriterien zur vorläufigen Speziesdifferenzierung

(Rosko Diagnostica, Werner et al. 2008a)

Spezies	Furazolidon (50 µg)	Mupirocin (10 µg)
<i>E. faecalis</i>	s	r
<i>E. faecium</i>	r	s

r= resistent, s= sensibel

Bezüglich der Vancomycin-Resistenz galten Stämme mit einem fehlenden bzw. unscharf begrenzten Hemmhof (*hazy growth*) um das Vancomycin-Blättchen als Vancomycin-resistent oder zumindest als verdächtig.

Konnte der Stamm der Spezies *E. faecalis* bzw. *E. faecium* zugeordnet werden und galt er als *in vitro* Vancomycin-resistent bzw. verdächtig, wurde der Test auf Pyrrolidonylarylamidase-Aktivität mittels PYR 50 Test Kit und der D-Agglutinationstest mittels Prolex™ streptococcal grouping latex kit durchgeführt.

Bei dem Nachweis der Pyrrolidonylarylamidase-Aktivität wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde ein L-pyrrolidonyl- β -naphtylamid-haltiges Filterpapierblättchen mit Aqua ad iniectabilia benetzt und Kolonien des zu untersuchenden Stammes mit einer Impföse auf das Blättchen gegeben. Anschließend wurde das Filterpapier mit einem Tropfen Farentwickler benetzt. Bei vorhandener Pyrrolidonylarylamidase-Aktivität kommt es innerhalb einer Minute nach Hinzufügen des Farentwicklers zu einer rosafarbenen bis roten Färbung des Blättchens. Bei nicht vorhandener Enzymaktivität kommt es zu keiner bzw. einer leicht gelblichen Farbänderung. *Enterococcus spp.* besitzen das Enzym Pyrrolidonylarylamidase, das Filterpapierchen färbt sich bei Enterokokken dementsprechend rosa bis rot (Packungsbeilage PYR 50 Test Kit, Stand 2010).

Der D-Agglutinationstest wurde mittels Prolex™ streptococcal grouping latex kit durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass alle verwendeten Reagenzien Raumtemperatur hatten. Zunächst wurde ein Tropfen des Extraktions-Reagenz 1 in ein Plastikröhrchen gegeben. Mit einer Impföse wurden 1-4 Kolonien von der Schafblutplatte genommen und in das Reagenz im Röhrchen eingebracht. Nun wurde ein Tropfen Extraktions-Reagenz 2 hinzugegeben. Die Extraktions-Reagenzien 1 und 2 sind in der Lage, die verschiedenen Oberflächenantigene der Streptokokken, die der Einteilung in die Lancefieldgruppen zugrunde liegen, bei

Raumtemperatur aus der Bakterienwand zu extrahieren (Packungsbeilage Prolex™ streptococcal grouping latex kit, Stand 2010). Der Inhalt des Röhrchens wurde 5-10 sec durch leichtes Schütteln gemischt und nach Zugabe von fünf Tropfen des Extraktions-Reagenz 3, einer Neutralisierungslösung, wurde der Inhalt des Röhrchens erneut gemischt. Je ein Tropfen des Extrakts wurde auf die dafür vorgesehenen Flächen der Testkarte gebracht und einmal mit einem Tropfen der Latexsuspension Gruppe A (Kontrolle) und einmal mit einem Tropfen der Latexsuspension Gruppe D vermischt. Die Latexsuspensionen enthalten Antikörper der Gruppe A und D (Packungsbeilage Prolex™ streptococcal grouping latex kit, Stand 2010). Nachdem die Testkarten 1 min lang langsam geschwenkt worden waren, konnten sie abgelesen werden. Im positiven Fall kommt es zu einer Agglutination. Da Enterokokken das Streptokokken-Oberflächenantigen D besitzen, zeigen sie eine positive D-Agglutinationsreaktion (Packungsbeilage Prolex™ streptococcal grouping latex kit, Stand 2010).

Stämme, die aufgrund des durchgeführten Agardiffusionstests mittels Furazolidon- und Mupirocin-Blättchen der Spezies *E. faecalis* bzw. *E. faecium* zugeordnet werden konnten, *in vitro* Vancomycin-resistent erschienen, einen positiven Pyrrolidonylarylamidase-Aktivitäts-Test und eine positive D-Agglutination aufwiesen, wurden weiterführend untersucht.

Die Isolierung Vancomycin-resistenter Enterokokken aus Patientenmaterial wurde für die Jahre 2005 bis einschließlich 2009 durch das diagnostische Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der beschriebenen klinischen Einrichtung in Südwestdeutschland durchgeführt, die Isolierung der VRE-Stämme von 2010 erfolgte im Rahmen dieser Doktorarbeit nach dem beschriebenen Procedere.

2.2.3 Lagerung und Anzüchten der Enterokokken-Isolate

Die Enterokokken-Isolate wurden bei -80°C in einem Cryobankstammhaltungssystem gelagert. Bei Bedarf wurden die in den Kryoröhrchen enthaltenen Glaskügelchen mitsamt daran haftender Bakterien auf Schafblutagar ausgerollt und bei 37°C 24 h im Brutschrank bebrütet. Handelte es sich bei den angewachsenen Kolonien um eine Reinkultur, konnten sie von der Platte genommen und nach

erneuter Subkultur auf Schafblutagar untersucht werden. Lagen die Bakterien nicht in Reinkultur vor, wurde eine Isolierung auf Schafblutagar durchgeführt.

2.2.4 Speziesidentifizierung mittels API rapid ID 32 Strep

Die Speziesidentifizierung erfolgte mittels API rapid ID 32 Strep-Streifen, den zugehörigen API-Reagenzien und der Apiweb™ Identifizierungssoftware. Zunächst wurden 2 ml Aqua ad iniectionem in ein Glasröhrchen pipettiert. Mit einem sterilen Wattetupfer wurden mehrere Kolonien des zu untersuchenden Stammes direkt vom Blutagar genommen und ebenfalls in das Glasröhrchen eingebracht. Mittels Densitometer wurde eine Bakteriensuspension hergestellt, die dem Mc Farland Standard 4 entsprach. Je 55 µl der homogenisierten Suspension wurden in eine Vertiefung des Streifens pipettiert. Die so vorbereiteten Streifen wurden 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss wurden die API-Reagenzien – wie vom Hersteller vorgegeben – hinzugefügt. Die Reaktionen wurden 5 min nach Zugabe der Reagenzien anhand der Ablesetabelle abgelesen und die Ergebnisse auf dem Ergebnisblatt notiert. Anhand der negativen bzw. positiven Ergebnisse der Reaktionen wurde ein spezifisches elfstelliges numerisches Profil für den untersuchten Stamm erstellt. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Apiweb™ Identifizierungssoftware durch Eingabe dieses Zahlencodes.

Bei einem Teil der untersuchten Isolate wurde die Spezies zusätzlich mittels PCR bestätigt bzw. identifiziert (siehe Punkt 2.2.6, 2.2.7., 2.2.8 und 3.2).

2.2.5 Untersuchung der in vitro-Empfindlichkeit der Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika mittels Agardiffusionstest

Die Untersuchung der *in vitro*-Empfindlichkeit der Enterokokken-Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika erfolgte mittels Agardiffusionstest unter Verwendung von Antibiotika-Blättchen und Etest®-Streifen (Tabelle 2d und 2f). Die Empfindlichkeit der Isolate wurde bezüglich der Antibiotika Ampicillin, Daptomycin, Doxycyclin, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin, Linezolid, Nitrofurantoin, Rifampicin, Teicoplanin, Tigecyclin und Vancomycin getestet. Bei Stämmen, die im Agardiffusionstest aufgrund der Auswertung ihrer Hemmhofgröße um die Antibiotika-Blättchen als resistent

gegen Linezolid bzw. Tigecyclin eingestuft wurden, wurde zusätzlich die MHK mittels Etest[®] bestimmt.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden 2 ml sterile 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung in ein Glasröhrchen pipettiert. Mit einem sterilen Wattetupfer wurden mehrere Kolonien des zu untersuchenden Stammes in die Lösung eingebracht und eine Bakteriensuspension hergestellt, die dem Mc Farland Standard 0,5 bzw. 2 für Vancomycin entsprach. Diese wurde mit einem neuen sterilen Wattestäbchen auf Müller-Hinton-Agar ausgestrichen. Hierzu wurde das Stäbchen rotierend in die Bakteriensuspension eingetaucht und überflüssige Suspension durch Abstreifen des Tupfers an der Innenwand des Röhrchens entfernt. Das Wattestäbchen wurde mäanderförmig auf der Agaroberfläche ausgestrichen. Um eine gleichmäßige Benetzung zu erreichen wurde der Vorgang zweimal wiederholt, wobei die Platte jeweils um 60° gedreht wurde. Die Applikation der Antibiotika-Blättchen erfolgte mittels Antibiotika-Stempel, die Etest[®]- Streifen wurden mit einer Pinzette auf den beimpften Agar gelegt. Die so vorbereiteten Platten wurden für 20 h bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

Nach der Inkubation der Platten wurden diese aus dem Brutschrank genommen und abgelesen. Bei den Antibiotika, bei denen Blättchen zur Empfindlichkeitstestung benutzt wurden, wurde die Hemmhofgröße um das jeweilige Blättchen bestimmt. Hierzu wurde der Durchmesser des Hemmhofs gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe publizierter Hemmhofgrenzwerte (Tabelle 2k).

Tabelle 2k: Evaluationskriterien zur Auswertung der Empfindlichkeitstestung mittels Antibiotika-Blättchen

Antibiotikum	Hemmhofgrenzwerte (mm)			Norm/Quelle
	r	i	s	
Ampicillin	≤ 16		≥ 17	CLSI 2008
Doxycyclin	≤ 12	13-15	≥ 16	CLSI 2008
Erythromycin	≤ 13	14-22	≥ 23	CLSI 2008
Levofloxacin	≤ 13	14-16	≥ 17	CLSI 2008
Linezolid	≤ 20	21-22	≥ 23	CLSI 2008
Nitrofurantoin	≤ 14		≥ 15	Andrews 2008
Rifampicin	≤ 16	17-19	≥ 20	CLSI 2008
Tigecyclin	< 22		≥ 22	SFM 2008

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

Bei den Antibiotika, bei denen Etest[®]-Streifen zur Empfindlichkeitstestung benutzt wurden, erfolgte die Bestimmung der MHK. Auf der Unterseite des Etest[®]-Streifens, einem nicht porösen, inerten Kunststoffstreifen, ist ein definierter Konzentrationsgradient der antibiotischen Substanz aufgebracht. Der Konzentrationsbereich umfasst 15 Zweifach-Verdünnungsschritte einer konventionellen MHK-Methode. Auf der Oberseite des Streifens befindet sich eine Skala, die das Ablesen der entsprechenden MHK-Werte in µg/ml ermöglicht. Je nach Empfindlichkeit des getesteten Isolates kommt es zu einer Wachstumshemmung bzw. einem Bakterienwachstum um den Etest[®]-Streifen. Die gegebenenfalls entstehende Hemmzone hat die Form einer Ellipse. Die Schnittstelle zwischen Streifen und Hemmellipse definiert den Punkt, an dem der MHK-Wert in µg/ml abzulesen ist (Packungsbeilage Etest[®], Stand 2010). Während bei bakteriziden Antibiotika die MHK bei einer Hemmung von 100 % abgelesen wurde, wurde sie bei bakteriostatischen Antibiotika bei einer Hemmung von 80-90 % abgelesen. Die Interpretation der abgelesenen MHK-Werte erfolgte anhand publizierter Grenzwerte (Tabelle 2l).

Tabelle 2I: Evaluationskriterien zur Auswertung der Empfindlichkeitstestung mittels Etest®-Streifen

Antibiotikum	MHK-Grenzwerte (µg/ml)			Norm/Quelle
	r	i	s	
Daptomycin	> 4		≤ 4	EUCAST (EUCASTb)
Gentamicin*	> 500		≤ 250	SFM 2005
Linezolid	≥ 8	4	≤ 2	CLSI (ABBIODISK)
Teicoplanin	≥ 32	16	≤ 8	CLSI (ABBIODISK)
Tigecyclin	> 0,5		≤ 0,25	EUCAST (EUCASTa)
Vancomycin	≥ 32	8-16	≤ 4	CLSI (ABBIODISK)

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

* r= *high level*-resistent, s= *low level*-resistent bei Gentamicin

Ergänzend sei erwähnt, dass EUCAST bezüglich Daptomycin keine Breakpoints für *E. faecalis* und *E. faecium* definiert, wohl aber angibt, dass die Daptomycin-MHK des Wildtyps von *E. faecalis* und *E. faecium* bei ≤ 4 µg/ml liegt, worauf obige Einteilung begründet wird.

Die Qualitätskontrolle des Daptomycin-Etests® erfolgte durch den *E. faecalis* ATCC-29212-Stamm und wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Qualitätskontrollen der anderen Etest®-Streifen und Antibiotika-Blättchen erfolgten im Rahmen des Qualitätsmanagements der diagnostischen Labore des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der beschriebenen klinischen Einrichtung in Südwestdeutschland.

2.2.6 DNS-Isolierung

Die DNS-Isolierung erfolgte mittels QIAamp® DNA Mini Kit. Zunächst wurde 1ml sterile 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Mehrere Kolonien eines Enterokokken-Stammes wurden vom Schafblutagar direkt in diese Lösung eingebracht. Die Bakteriensuspension wurde bei 2655 x g (5000 rpm) 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 180 µl ATL-Puffer und 8 µl Lysostaphin (10 Units/µl) resuspendiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer, wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl AL-Puffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde 30 min bei 56°C und 300 rpm und anschließend 15 min bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Nun

wurden 200 µl 96 %iges Ethanol hinzugegeben und die Lösung mittels Vortexer durchmischt. Die Quiagensäule wurde in das Auffangtube gestellt und das Gemisch aufgetragen. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 6797 x g (8000 rpm), wonach das Auffangtube entleert wurde. Nun wurden 500 µl AW1-Puffer hinzugegeben, das Gemisch wurde erneut 1 min bei 6797 x g (8000 rpm) zentrifugiert und das Auffangtube wiederum entleert. Jetzt wurden 500 µl AW2-Puffer in die Quiagensäule pipettiert und es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 20817 x g (14000 rpm). Das Auffangtube wurde verworfen und die Quiagensäule in ein 1,5 ml Reagiergefäß gestellt. In die Säule wurden 200 µl AE-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 6797 x g (8000 rpm) zentrifugiert. Die Quiagensäule wurde entfernt und die DNS-Aufbereitung bei -20°C gelagert.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Ansatz setzte sich aus 45 µl Mastermix und 5 µl DNS (DNS-Isolierung siehe Punkt 2.2.6) zusammen. Der Mastermix wurde anhand des entsprechenden Pipettierschemas in einem 1,5 ml Reagiergefäß hergestellt. In den Tabellen 2m-o sind diese Schemata für die durchgeführten PCRs angegeben. Die angegebenen Mengen der Einzelkomponenten ergeben den Mastermix für einen PCR-Ansatz. Wurde bei mehreren Proben die gleiche PCR durchgeführt, wurde der Mastermix-Ansatz für alle Proben gemeinsam in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Hierzu wurde die Menge der Einzelkomponenten für einen PCR-Ansatz, das heißt für eine Probe, mit der Anzahl der zu untersuchenden Proben multipliziert und die Komponenten für eine Positiv-, eine Negativkontrolle und einen zusätzlich bereitgestellten Ansatz hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente ein PCR-Ansatz aus Mastermix und DNS eines Referenzstammes (siehe Punkt 2.1.1.2). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz aus Mastermix und 5 µl Aqua dest. verwendet.

Die isolierte DNS, ebenso wie alle zur Herstellung des Mastermix verwendeten Reagenzien, wurden während des Herstellens des PCR-Ansatzes auf Eis gelagert. Es wurde das Taq DNA Polymerase recombinant-Kit, das neben der Taq-DNA-Polymerase (5 Units/µl) den 10x Puffer ohne MgCl₂ und MgCl₂ (50 mM) enthält, verwendet.

Tabelle 2m: Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf eine Spezies-spezifische *E. faecium* rDNS-Sequenz)

Reagenz	Menge (µl)
10x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	5
MgCl ₂ (50 mM)	3,5
dNTPs (10-11 mM)	1
Primer <i>E. faecium</i> 1 (50 µM)	1
Primer <i>E. faecium</i> 2 (50 µM)	1
Taq DNA-Polymerase (5 Units/µl)	0,2
Aqua dest.	33,3

Tabelle 2n: Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf *esp* oder *hyl*)

Reagenz	Menge (µl)
10x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	5
MgCl ₂ (50 Mm)	2,5
dNTPs (10-11 mM)	2
Primer <i>esp</i> TIM 1 oder <i>hyl</i> Efm 1 (20µM)	2,5
Primer <i>esp</i> TIM 2 oder <i>hyl</i> Efm 2 (20µM)	2,5
Taq DNA-Polymerase (5 Units/µl)	0,4
Aqua dest.	30,1

Tabelle 2o: Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf *vanA* und *vanB*, Duplex-PCR)

Reagenz	Menge (µl)
10x PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	5
MgCl ₂ (50 mM)	2,5
dNTPs (10-11 mM)	2
Primer <i>vanA</i> 1 (100 µM)	1
Primer <i>vanA</i> 2 (100 µM)	1
Primer <i>vanB</i> 1 (100 µM)	1
Primer <i>vanB</i> 2 (100 µM)	1
Taq DNA-Polymerase (5 Units/µl)	0,4
Aqua dest.	31,1

Nach dem Pipettieren des Mastermix-Ansatzes, wurden je 45 µl desselben in ein PCR-Tube gegeben. Hierzu wurden 5 µl DNS bzw. 5 µl Aqua dest. bei der Negativkontrolle pipettiert. Der Thermocycler wurde bestückt und unverzüglich gestartet. Die Tabellen 2p-r enthalten die Temperaturprofile, nach denen die jeweiligen Zielsequenzen amplifiziert wurden.

Tabelle 2p: Cyclerprofil zur Amplifizierung der Spezies-spezifischen *E. faecium* rDNS-Sequenz (Cheng et al. 1997)

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1. Denaturierung	94	4 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Synthese	72	1 min
4. Synthese	72	8 min
5. Pause	4	∞

} 25x

Tabelle 2q: Cyclerprofil zur Amplifizierung von *esp*, *vanA* und *vanB*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1. Denaturierung	94	5 min
2. Denaturierung	94	45 sec
3. Annealing	55	30 sec
4. Synthese	72	1 min
5. Synthese	72	7 min
6. Pause	4	∞

} 30x

Tabelle 2r: Cyclerprofil zur Amplifizierung von *hyl*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1. Denaturierung	94	4 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Annealing	48	30 sec
4. Synthese	72	1 min
5. Synthese	72	4 min
6. Pause	4	∞

} 30x

Im Anschluß an die PCR wurden die amplifizierten DNS-Fragmente sofort gelelektrophoretisch aufgetrennt oder bis zu einer Woche bei 2-8°C gelagert.

2.2.8 Gelelektrophorese

Es wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 1,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und 100 ml 0,5x konzentrierter TBE-Puffer hinzugegeben. Der Kolben mit den darin enthaltenen Substanzen wurde in der Mikrowelle (800 Watt) 1,5 min erhitzt, kurz geschwenkt und erneut erhitzt, bis das Agarosegel frei von Schlieren war und in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen wurde. Nach Erkalten des Gels wurden die Kämmen gezogen und das feste Gel aus der Kammer genommen. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 0,5x konzentriertem TBE-Puffer gefüllt und das Agarosegel in die dafür vorgesehene Vorrichtung gelegt.

Die PCR-Amplifikate wurden in einer leeren Mikrotiterplatte vorbereitet. In einen Napf wurden je 1,5 µl Bromphenolblau-Puffer und 15 µl des jeweiligen Amplifikates aus der vorangegangenen PCR pipettiert. Als DNS-Längenstandard diente ein 123 bp Marker. 1,5 µl des Markers wurden zu 1,5 µl Bromphenolblau-Puffer und 15 µl TE-Puffer gegeben. Je 15 µl der so vorbereiteten Proben wurden nun in die Taschen des Agarosegels pipettiert.

Die Amplifikate wurden bei 180 Volt und einer Laufzeit von circa 45 min im Gelelektrophoresesystem aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNS wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in ein Ethidiumbromid-Bad gegeben und daraufhin 30 min in einem Wasserbad entfärbt. Anschließend wurde das Agarosegel mittels eines Geldokumentationssystems unter UV-Bestrahlung dokumentiert und ausgewertet.

2.2.9 Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Makrorestriktionsanalyse der DNS von *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese (modifiziert nach Goering und Duensing 1990 und Miranda et al. 1991) wurde in Zusammenarbeit mit G. Werner (Robert Koch-Institut, Wernigerode) durchgeführt.

Da nicht alle 180 Stämme untersucht werden konnten, musste eine Vorauswahl getroffen werden. Die Isolate wurden daher jahrweise (die Isolate von 2009 und 2010

wurden zusammengenommen) anhand ihrer phäno- und genotypischen Merkmale in Cluster unterteilt. Das heißt, Stämme mit gleichem Resistenzmuster und Markerprofil (*esp*, *hyl*) aus einem Jahr wurden in einem Cluster zusammengefasst. Bei den Resistenzen gegen Vancomycin und Teicoplanin wurde allein der Genotyp berücksichtigt. Es ergaben sich 64 Cluster. Aus 58 Clustern wurde der jeweils älteste, das heißt zuerst isolierte, Stamm ausgewählt, um ihn zu typisieren. 6 Cluster wurden nicht untersucht, bei 4 Clustern wurde jeweils ein weiterer Stamm charakterisiert. Somit wurden 62 Stämmen per PFGE untersucht, was 2 Gele à 30 Proben (27 Isolate und 3 Standards) und ein Gel à 10 Proben (8 Isolate und 2 Standards) ergab.

- Vorbereitung

Die Stämme wurden auf Blutagar angezchtet. Zur Herstellung der ersten Übernachtskultur wurden mit einem Glasstab 2-3 Einzelkolonien eines Stammes in ein Glasröhrchen mit 5 ml BHI-Bouillon eingebracht. Der Ansatz wurde 24 h bei 37°C im Inkubator unter leichtem Schwenken inkubiert.

- Tag 1 – Zelllysis

1 ml der Übernachtskultur wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei einer Temperatur von 4°C und 15294 x *g* (12000 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das im Eppendorfggefäß verbliebene Sediment in 1 ml PIV-Lösung mittels Vortexgerät resuspendiert. Die Suspension wurde bei einer Temperatur von 4°C und 15294 x *g* (12000 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgegossen und das Sediment nun in 0,7 ml PIV-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde bei einer Temperatur von 4°C gelagert, während ein 1,2 %iges low melting point-Agarosegel hergestellt wurde. Hierfür wurden je 36 mg low melting point-Agarose in zwei Glasröhrchen eingewogen und mit einer Pipette je 3 ml PIV-Lösung hinzugefügt. Die Glasröhrchen wurden in einem Wasserbad über einem Gasbrenner erhitzt, bis das Agarosegel frei von Schlieren war.

Nachdem die kühl gelagerte Bakteriensuspension durch kurzes Vortexen homogenisiert worden war, wurden 50 µl derselben mit 50 µl des noch flüssigen Agarosegels in einem Eppendorfggefäß gemischt und sofort in den Gießblock pipettiert. Dieser wurde 20 min bei 4°C gelagert, danach war das Agarosegel fest. Nun wurde 1 ml Lysislösung in ein Eppendorfggefäß pipettiert und das Agarosegel mit den darin

eingebetteten Bakterien mittels Schieber überführt. Es folgte eine Inkubation von 18 h bei 37°C und 350 rpm im Thermomixer.

- Tag 2 – Deproteinisierung

Nach der Übernachtinkubation der Probe wurde die Lysislösung mit einer Pipette aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Zu dem im Reaktionsgefäß verbliebenen Agarosegelblöckchen wurde nun 1 ml ES-Puffer pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Der ES-Puffer wurde entfernt und der Vorgang wiederholt. Im Anschluss wurde 1 ml ESP-Lösung, welche die Endopeptidase Proteinase K enthält, zu dem Agarosegelblöckchen pipettiert und der Ansatz für 20 h bei 50°C und 350 rpm im Thermomixer inkubiert.

- Tag 3 – Restriktase-Spaltung

Die ESP-Lösung wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und das Agarosegelblöckchen in ein Zentrifugenglas mit 14 ml TE-Puffer überführt. Während einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Blöckchen mehrmals vorsichtig aufgewirbelt, um es von der Glaswand zu lösen und den Spülvorgang zu optimieren. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der TE-Puffer abgegossen und der Vorgang dreimal wiederholt. Nach Beenden des letzten Spülvorgangs wurde das Agarosegelblöckchen vorsichtig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1ml 1x Sma I-Puffer (Eigenproduktion) überführt. Nach einer Äquilibrierungszeit von 30 min bei Raumtemperatur, wurde der Puffer mit Hilfe einer Pipette entfernt. In ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden nun je Probe 50 µl frischer 1x Sma I-Puffer (Firma Roche) und 4 µl Sma I-Restriktionsenzym (10 Units/ µl) pipettiert. Nach Durchmischen mittels Vortexgerät wurde dieser Ansatz in das Reaktionsgefäß mit Agarosegelblöckchen überführt. Während dieses Arbeitsschrittes wurde auf Eis gearbeitet. Im Anschluss wurde der Ansatz im Thermomixer bei 25°C und 300 rpm für 18 h inkubiert.

Die DNS-Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Sma I, die von *Serratia marcescens* gebildet wird, ist CCC↓GGG. Im Rahmen der Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese kommen selten schneidende Restriktionsenzyme zum Einsatz (Murray et al. 1990b). Bei Adenin-Thymin-(AT)-reichen DNS-Sequenzen empfiehlt es sich daher, auf Enzyme zurückzugreifen, die Guanin-Cytosin-(GC)-Hexamere erkennen. Analog hierzu sollten bei GC-reichen

Genomen Enzyme eingesetzt werden, die Hexanukleotide aus A und T erkennen (Goering 1998). Inwiefern Sma I also für das Schneiden einer bestimmten DNS verwendet werden kann, hängt von dem GC-Anteil derselben ab. Hat die DNS einen hohen GC-Anteil (z. B. *Escherichia coli*), so wird sie oft geschnitten, bei einem niedrigeren Anteil entsprechend weniger oft. Enterokokken gehören zu den Bakterien mit einem niedrigeren GC-Anteil der DNS (Murray et al. 1990b). Dieser liegt bei circa 40 % (Schleifer und Kilpper-Bälz 1984). Für Enterokokken ist Sma I daher das Enzym der Wahl (Murray et al. 1990b).

- Tag 4 – Pulsfeldgelelektrophorese

Zunächst wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden 1,2 g Agarose in ein Glasgefäß eingewogen und 120 ml TBE-Puffer 1x hinzugegeben. Der Ansatz wurde 2 min in der Mikrowelle (595 Watt) erhitzt, leicht geschwenkt und erneut erhitzt bis das Agarosegel frei von Schlieren war. Anschließend wurde das Gel in die dafür vorgesehene, zuvor mit 96 %igem Ethanol gereinigte, Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Um den Restriktionsvorgang abzustoppen, wurden 30 µl des Bromphenolblau-Ladepuffers zu dem inkubierten Probenansatz pipettiert und der Ansatz durch leichtes Schwenken durchmischt. Das angefärbte Agarosegelblöckchen wurde mit einem Glasschieber auf einen Objektträger überführt, mit einem Deckgläschen in Form gebracht und in die Schlitze des Agarosegels überführt. Die verwendeten Utensilien wurden zuvor mit Ethanol 96 % gereinigt. Nach Beladen des Gels mit Proben und Standards wurden die Schlitze mit 1,0 %igem Agarosegel verschlossen. Nachdem die Pulsfeldgelelektrophoresekammer waagrecht ausgerichtet und zweimal mit Aqua dest. gespült worden war, wurde der Laufpuffer – TBE-Puffer 1x – eingefüllt und auf 14°C vorgekühlt. Anschließend wurde das Gel an der dafür vorgesehenen Stelle positioniert. Dann wurde die Pulsfeldgelelektrophorese gestartet. Die Reaktionsbedingungen finden sich in Tabelle 2s.

Tabelle 2s: Reaktionsbedingungen der Pulsfeldgelelektrophorese

Pumpenge- schwindigkeit	Temperatur	Elektrische Feldstärke	Spannung	Pulszeiten
60	14 °C	6 V/cm	200 V	Block 1 1-11 sec für 14 h
				Block 2 11-30 sec für 13 h

- Tag 5 – Auswertung

Nach Beenden der Pulsfeldgelelektrophorese wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen und zur Visualisierung der DNS für 30 min in ein Ethidiumbromid-Bad gegeben. Anschließend wurde es 60 min im Wasserbad unter leichtem Schwenken entfärbt. Die mittels PFGE aufgetrennten und durch die Färbung mit Ethidiumbromid in UV-Licht sichtbaren DNS-Fragmente wurden mit Hilfe des Geldokumentationssystems und der zugehörigen Software (Quantity One[®] 1D Analysis-Software) betrachtet und gespeichert.

Zur Auswertung der Gele wurde die Analyse-Software BioNumerics 6.0 genutzt.

2.2.10 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Ein Teil der bereits mittels Makrorestriktionsanalyse/PFGE untersuchten Vancomycin-resistenten Enterokokken-Stämme wurde mit Hilfe des *Multi Locus Sequence Typings* charakterisiert. Primer und Bedingungen zur Durchführung der MLST-Typisierung entsprechen den Angaben, die im Internet unter <http://efaecium.mlst.net> (Datenstand 01.02.2011) zu finden sind. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit G. Werner (Robert Koch-Institut, Wernigerode).

Zunächst wurden die zu untersuchenden Isolate definiert. Hierzu wurde aus jedem Cluster des PFGE-Dendogramms ab einem Ähnlichkeitslevel von $\geq 80\%$ ein Stamm ausgewählt. Die 24 erhaltenen Stämme wurden weiter bearbeitet (der *E. faecalis*-Stamm wurde hierbei vernachlässigt).

Im Rahmen des MLSTs wurden nun sieben ausgewählte Haushaltsgene (house-keeping genes) von *E. faecium* mittels PCR amplifiziert, wobei allerdings nicht die kompletten Gene, sondern definierte interne Fragmente der Haushaltsgene vervielfältigt wurden (Tabelle 2t).

Tabelle 2t: Haushaltsgene von *E. faecium*, die im Rahmen des MLSTs mittels PCR amplifiziert wurden (Homan et al. 2002)

Gen	Genprodukt	Sequenzlänge (bp)
<i>adk</i>	Adenylatkinase	437
<i>atpA</i>	ATP-Synthase, α -Untereinheit	556
<i>ddl</i>	D-Alanin-D-Alanin-Ligase	465
<i>gdh</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	530
<i>gyd</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	395
<i>pstS</i>	Phosphat ATP binding cassette transporter	583
<i>purK</i>	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase Untereinheit	492

Ein PCR-Ansatz setzte sich aus 49 μ l Mastermix und 1 μ l DNS zusammen (DNS-Isolierung siehe Punkt 2.2.6). Der Mastermix wurde anhand des entsprechenden Pipettierschemas (Tabelle 2u) in einem 1,5 ml Reagiergefäß hergestellt. Die benötigten Primer-Paare sind in Tabelle 2h aufgeführt. Die angegebenen Mengen der Einzelkomponenten ergeben den Mastermix für einen PCR-Ansatz. Wurde bei mehreren Proben die gleiche PCR durchgeführt, wurde der Mastermix-Ansatz für alle Proben gemeinsam in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Hierzu wurde die Menge der Einzelkomponenten für einen PCR-Ansatz, das heißt für eine Probe, mit der Anzahl der zu untersuchenden Proben multipliziert und die Komponenten für eine Negativkontrolle und einen zusätzlich bereitgestellten Ansatz hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aus Mastermix und 1 μ l Aqua dest. Die isolierte DNS ebenso wie alle zur Herstellung des Mastermix verwendeten Reagenzien wurden während des Herstellens des PCR-Ansatzes auf Eis gelagert. Es wurde das HotStarTaq Master Mix Kit verwendet, das neben der Taq DNA-Polymerase (5 Units/ μ l) bereits Puffer mit $MgCl_2$ (3 mM) und dNTPs (je 400 μ M) enthält. Desweiteren wurde das ebenfalls im Kit enthaltene RNase-freie Wasser benutzt. 49 μ l Mastermix und 1 μ l der isolierten DNS bzw. 1 μ l Aqua dest. bei der Negativkontrolle wurden in ein PCR-Tube pipettiert und vorsichtig gemischt. Die PCR-Tubes wurden in den Thermocycler gegeben, der unverzüglich gestartet wurde. Das Temperaturprofil zur Amplifizierung der Haushaltsgene zeigt Tabelle 2v.

Tabelle 2u: Mastermix für einen MLST-PCR-Ansatz (<http://efaecium.mlst.net>)

Reagenz	Menge (µl)
HotStarTaq Master Mix Kit	25
Primer 1 (100 µM)	0,4
Primer 2 (100 µM)	0,4
RNase-freies Wasser	23,2

Tabelle 2v: Cycloprofil zur Amplifizierung der *E. faecium*-Haushaltsgene(<http://efaecium.mlst.net>)

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1. Denaturierung	95	15 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Annealing	50	30 sec
4. Synthese	72	30 sec
5. Synthese	72	5 min
6. Pause	4	∞

} 35x

Im Anschluss an die PCR folgte die Überprüfung der PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel. Schloss sich diese nicht direkt an, wurden die PCR-Tubes bei 2-8°C im Kühlschrank, bzw. bei -4°C im Gefrierschrank gelagert.

Das Agarosegel zur Überprüfung der Amplifikate wurde wie unter Punkt 2.2.8 beschrieben hergestellt. Die Proben wurden in einer leeren Mikrotiterplatte vorbereitet. Hierfür wurden in einen Napf 2 µl Bromphenolblau, 5 µl Aqua dest. und 5 µl des zu prüfenden PCR-Produkts pipettiert. Als DNS-Längenstandard wurde ein 100 bp Marker verwendet. 1 µl desselben wurde mit 9 µl Aqua dest. und 2 µl Bromphenolblau gemischt. Nun wurden die Taschen des Agarosegels mit den so vorbereiteten Proben bestückt und die Gelelektrophorese gestartet (Durchführung der Gelelektrophorese siehe Punkt 2.2.8). Die Auftrennung und Visualisierung der Amplifikate im Agarosegel diente zum einen als Erfolgskontrolle bezüglich der durchgeführten PCR, zum anderen der Abschätzung der in der Sequenzierreaktion einzusetzenden Menge an PCR-Produkt.

Die Aufreinigung, sowie die Doppelstrangsequenzierung der amplifizierten Genfragmente wurden von einem kommerziellen Sequenzierlabor (4base lab GmbH, Reutlingen) durchgeführt.

Nach Erhalt der Elektropherogramme der amplifizierten Haushaltsgene, wurden die Sequenzen mit Hilfe der DNA-Star-Software visuell auf ihre Auswertbarkeit überprüft. Die Auswertung erfolgte mittels Ridom TraceEditPro-Software und <http://efaecium.mlst.net> (single locus sequence query), unter Zuhilfenahme derer anhand der zugrunde liegenden Sequenzen der Haushaltsgene ein spezifisches siebenstelliges Allelprofil für jedes der untersuchten Isolate erstellt wurde. Den jeweiligen Allelprofilen wurde auf mlst.net (allelic profile query) der entsprechende Sequenztyp zugeordnet. Um einen Überblick über die anhand von MLST-Daten ermittelte phylogenetische Verwandtschaft und die Populationsstruktur von *E. faecium* geben zu können, sowie zur Einordnung der erhaltenen Sequenztypen in dieselbe, wurde die goeBURST 1.2.1-Software verwendet.

2.2.11 Erhebung der zugehörigen klinischen Daten

Die klinischen Informationen wurden mit Hilfe des Hybase 6[®] Statistik- und Analyse-systems, des Orbis Klinikinformationssystems und des Swisslab Laborinformationssysteme eruiert. Die Kategorisierung der Krankheitsbilder erfolgte unter Zuhilfenahme der ICD-10-GM – der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (DIMDI 2011).

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von Enterokokken-Stämmen aus Probenmaterial

Wie bereits unter Punkt 2.2.2 beschrieben, erfolgte die Isolierung der Vancomycin-resistenten Enterokokken aus Patientenmaterial in den Jahren 2005 bis einschließlich 2009 durch das diagnostische Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der beschriebenen klinischen Einrichtung in Südwestdeutschland. Die 24 Stämme aus 2010 wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nach dem unter Punkt 2.2.2 beschriebenen Procedere aus klinischen Materialien mit folgenden Ergebnissen isoliert:

Die Kolonien dieser Isolate erschienen auf Enterococcosel™-Agar with Vancomycin 8 µl/ml dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Nach Isolierung der Kolonien erfolgte eine vorläufige Empfindlichkeitstestung der Stämme im Agardiffusionstest bezüglich Furazolidon, Mupirocin und Vancomycin. Alle 24 Isolate zeigten sich resistent gegen Furazolidon und sensibel bezüglich Mupirocin. Aufgrund dieser Informationen wurden sie vorläufig der Spezies *E. faecium* zugeordnet. Die Vancomycin-Resistenz der Stämme wurde durch ihren fehlenden bzw. unscharf begrenzten Hemmhof (*hazy growth*) um das Vancomycin-Blättchen herum bestätigt. Im daraufhin durchgeführten D-Agglutinations- und Pyrrolidonylarylamidase-Test zeigten alle 24 Isolate positive Reaktionen.

Diese Informationen führten zur Aufnahme dieser – vorläufig als Vancomycin-resistente *E. faecium* eingestufte – Isolate in die VRE-Stammsammlung. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersucht.

3.2 Speziesidentifizierung

Die Speziesidentifizierung erfolgte mittels API rapid ID 32 Strep und Apiweb™-Software wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Die Ergebnisse fasst Tabelle 3a zusammen.

Tabelle 3a: Mit API rapid ID 32 Strep inklusive Apiweb™-Software und PCR erhaltene Identifizierungsergebnisse

Der %id-Wert beschreibt die relative Annäherung zu den unterschiedlichen Taxa der Api-Datenbank, der T-Index die Nähe zum typischsten Profil innerhalb eines Taxons. Der Begriff Taxon steht in diesem Fall für Spezies (Apiweb™-Informationen).

Identifizierungsergebnisse mit API rapid ID 32 Strep und Apiweb™-Software			
Kommentar	Grenzwerte	Spezies	
Ausgezeichnete Identifizierung	%id ≥ 99.9, T-Index ≥ 0.75	<i>E. faecalis</i> : 0 <i>E. faecium</i> : 21	
Sehr gute Identifizierung	%id ≥ 99.0, T-Index ≥ 0.50	<i>E. faecalis</i> : 1 <i>E. faecium</i> : 74	
Gute Identifizierung	%id ≥ 90.0, T-Index ≥ 0.25	<i>E. faecalis</i> : 0 <i>E. faecium</i> : 38	
Sehr gute Identifizierung auf Genusebene	Identifizierung des Genusniveaus (2-4 Taxa des gleichen Genus werden ausgewählt; <i>E. faecium</i> galt jeweils als wahrscheinlichstes Taxon)	<i>E. faecalis</i> : 0 <i>E. faecium</i> : 18	
Gute Identifizierung auf Genusebene		<i>E. faecalis</i> : 0 <i>E. faecium</i> : 4	
Akzeptierbare Identifizierung auf Genusebene		<i>E. faecalis</i> : 0 <i>E. faecium</i> : 2	
Zweifelhaftes Profil		4 (2 <i>E. faecium</i> , 1 <i>E. casseliflavus</i> , 1 <i>E. gallinarum</i>)	
Unzulässiges Profil		1 (<i>E. gallinarum</i>)	
Keine Identifizierung als <i>E. faecalis</i> oder <i>E. faecium</i>		Identifikation von 17 Stämmen als <i>E. gallinarum</i>	
gesamt		<i>E. faecalis</i>: 1 <i>E. faecium</i>: 179	

Die Speziesidentifizierung wurde mittels PCR bestätigt bzw. ermöglicht. Alle 46 Stämme konnten der Spezies *E. faecium* zugeordnet werden.

Alle Stämme, für die sich mittels API rapid ID 32 Strep und Apiweb™-Software keine gute, sehr gute oder ausgezeichnete Identifizierung als *E. faecalis* bzw. *E. faecium* ergab, wurden mittels PCR getestet. Es wurde bei diesen Stämmen (n=46) eine PCR (siehe Punkt 2.2.6-2.2.8) durchgeführt, deren Zielsequenz eine konservierte Spezies-

spezifische rDNS-Sequenz von *E. faecium* darstellt. Alle 46 Stämme zeigten nach gelelektrophoretischer Auftrennung Banden auf der gewünschten Höhe von 658 bp, was das Vorhandensein der Zielsequenz im Genom bestätigte, und konnten somit eindeutig als *E. faecium* identifiziert werden. Abbildung 3a zeigt eine Auswahl dieser Stämme im Gelbild.

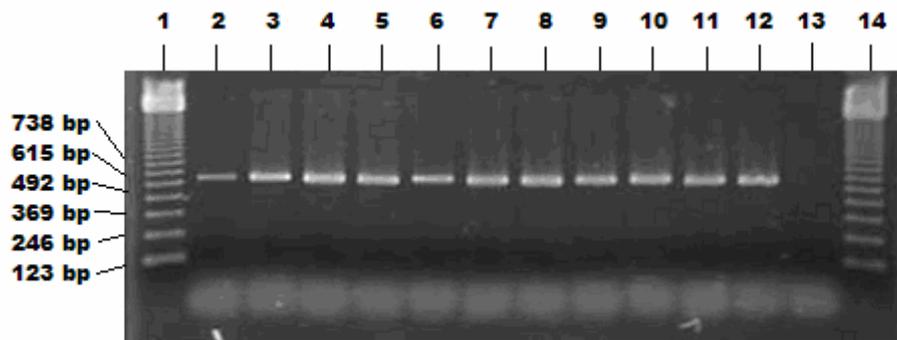


Abbildung 3a: Amplifizierte Genfragmente der *E. faecium*-Zielsequenz, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel. 1, 14=123 bp Marker, 2=Positivkontrolle, 13=Negativkontrolle, 3-12=untersuchte Stämme.

Von den 180 untersuchten Stämmen konnten also letztendlich 179 Stämme der Spezies *E. faecium* und 1 Stamm der Spezies *E. faecalis* zugeordnet werden.

Somit wurde nur ein Isolat der Spezies *E. faecalis* untersucht. Trotz der kaum vorhandenen Aussagekraft der hinsichtlich dieses einen Stammes erhaltenen Ergebnisse wurde er mitgeführt, um folgendes zu verdeutlichen: Vancomycin-resistente *E. faecalis*-Stämme treten zwar auf, sind aber nicht annähernd so häufig zu finden wie Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate. Dies gilt nicht nur für das hier beschriebene Krankenhaus, sondern für ganz Deutschland und eine Vielzahl europäischer Länder (ECDC 2008 und 2009, PEG: PEG-Studie 2001/2004/2007; siehe auch Punkt 1.2.8).

3.3 Ergebnisse der Untersuchung der in vitro-Empfindlichkeit der Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika mittels Agardiffusionstest

(Teicoplanin und Vancomycin siehe Punkt 3.4)

Das phänotypische Resistenzprofil der 179 als *E. faecium* identifizierten Isolate wurde mittels Agardiffusionstest, wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben, ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3b dargestellt.

Tabelle 3b: Empfindlichkeit der 179 *E. faecium*-Isolate gegenüber den getesteten Antibiotika Ampicillin, Daptomycin, Doxycyclin, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin, Linezolid, Nitrofurantoin, Rifampicin und Tigecyclin

Jahr	Anteil der resistenten <i>E. faecium</i> -Isolate in % (Anzahl resistenter <i>E. faecium</i> -Isolate/Anzahl untersuchter <i>E. faecium</i> -Isolate)										
	Ampicillin	Daptomycin	Doxycyclin* ¹		Erythromycin	Gentamicin* ²	Levofloxacin	Linezolid	Nitrofurantoin	Rifampicin	Tigecyclin
			r	i							
2005	100,0 (55/55)	0,0 (0/55)	1,8 (1/55)	5,5 (3/55)	98,2 (54/55)	54,5 (30/55)	100,0 (55/55)	1,8 (1/55)	85,5 (47/55)	96,4 (53/55)	0,0 (0/55)
2006	100,0 (26/26)	0,0 (0/26)	3,8 (1/26)	0,0 (0/26)	100,0 (26/26)	7,7 (2/26)	100,0 (26/26)	0,0 (0/26)	42,3 (11/26)	96,2 (25/26)	0,0 (0/26)
2007	100,0 (29/29)	6,9 (2/29)	3,4 (1/29)	0,0 (0/29)	100,0 (29/29)	6,9 (2/29)	100,0 (29/29)	0,0 (0/29)	20,7 (6/29)	100,0 (29/29)	0,0 (0/29)
2008	100,0 (32/32)	0,0 (0/32)	3,1 (1/32)	9,4 (3/32)	93,75 (30/32)	12,5 (4/32)	100,0 (32/32)	3,1 (1/32)	18,75 (6/32)	100,0 (32/32)	3,1 (1/32)
2009/	100,0 (37/37)	0,0 (0/37)	5,4 (2/37)	2,7 (1/37)	100,0 (37/37)	21,6 (8/37)	100,0 (37/37)	2,7 (1/37)	43,2 (16/37)	83,8 (31/37)	0,0 (0/37)
gesamt	100,0 (179/179)	1,1 (2/179)	3,4 (6/179)	3,9 (7/179)	98,3 (176/179)	25,7 (46/179)	100,0 (179/179)	1,7 (3/179)	48,0 (86/179)	95,0 (170/179)	0,6 (1/179)

*¹ zusätzlich Angabe der aufgetretenen gegenüber Doxycyclin intermediär-empfindlichen *E. faecium*-Isolate;

r= resistent, i=intermediär-empfindlich

*² Anteil/Anzahl der *high level*-resistenten *E. faecium*-Isolate bei Gentamicin

Tabelle 3c zeigt eine vergleichende Zusammenfassung der Resistenzdaten der von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolate und sonstigen Isolate.

Tabelle 3c: Vergleich der Resistenzdaten der insgesamt von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolate und sonstigen Isolate der Spezies *E. faecium* (n=179)

Antibiotikum	Blutkultur-Isolate (n=31)			Sonstige Isolate (n=148)		
	Anteil in % (n)			Anteil in % (n)		
	r	i	s	r	i	s
Ampicillin	100 (31)	0 (0)	0 (0)	100 (148)	0 (0)	0 (0)
Daptomycin	0 (0)	0 (0)	100 (31)	1,4 (2)	0 (0)	98,6 (146)
Doxycyclin	6,45 (2)	6,45 (2)	87,1 (27)	2,7 (4)	3,4 (5)	93,9 (139)
Erythromycin	93,5 (29)	0 (0)	6,5 (2)	99,3 (147)	0 (0)	0,7 (1)
Gentamicin*	12,9 (4)	0 (0)	87,1 (27)	28,4 (42)	0 (0)	71,6 (106)
Levofloxacin	100 (31)	0 (0)	0 (0)	100 (148)	0 (0)	0 (0)
Linezolid	3,2 (1)	0 (0)	96,8 (30)	1,4 (2)	0 (0)	98,6 (146)
Nitrofurantoin	38,7 (12)	0 (0)	61,3 (19)	51,4 (76)	0 (0)	48,6 (72)
Rifampicin	93,5 (29)	0 (0)	6,5 (2)	95,3 (141)	0 (0)	4,7 (7)
Tigecyclin	0 (0)	0 (0)	100 (31)	0,7 (1)	0 (0)	99,3 (147)

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

*r= *high level*-resistent, s= *low level*-resistent bei Gentamicin

Für jedes der getesteten Antibiotika fanden sich unter den 179 einbezogenen *E. faecium*-Stämmen Isolate, die *in vitro* Resistenzen aufwiesen.

Sogar gegen die erst kürzlich auf den Markt gekommenen und als Reserve-Antibiotika verwendeten Chemotherapeutika Daptomycin (1,1 %), Linezolid (1,7 %) und Tigecyclin (0,6 %) erschienen bereits einige der untersuchten Stämme zumindest *in vitro* resistent. Auch bei Doxycyclin (3,4 %) liegt der Anteil resistenter Isolate niedrig. Im mittleren Feld liegen die Daten für Gentamicin und Nitrofurantoin: 25,7 % der untersuchten Isolate zeigten *in vitro* eine *high level*-Resistenz gegen Gentamicin und 48,0 % waren resistent gegen Nitrofurantoin.

Mehr als 90 % der untersuchten *E. faecium*-Isolate hingegen zeigten sich *in vitro* resistent gegen die Antibiotika Ampicillin (100,0 %), Erythromycin (98,3 %), Levofloxacin (100,0 %) und Rifampicin (95,0 %). Die erworbene Ampicillin-Resistenz bei

E. faecium ist ein wichtiges Charakteristikum Hospital-assoziiierter Stämme dieser Spezies (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2005).

Ausgehend von den erhaltenen Daten, lässt sich hinsichtlich der untersuchten Isolate in den Jahren 2005-2009/2010 für einige der getesteten Antibiotika keine Veränderung der Empfindlichkeit feststellen (Ampicillin, Levofloxacin). Ein eindeutiger Trend in Bezug auf Abnahme bzw. Anstieg der Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Antibiotika ist nicht zu erkennen. Bei den Substanzen Gentamicin und Nitrofurantoin nimmt der Anteil (*high level-*) resistenter Isolate zunächst ab, um dann (bis) 2009/2010 wieder leicht anzusteigen. Der Vergleich der Resistenzen von Blutkultur-Isolaten und sonstigen Isolaten lässt keine einseitige Häufigkeitsverteilung erkennen.

Die Abbildungen 3b und 3c stellen den Inhalt von Tabelle 3b grafisch dar.

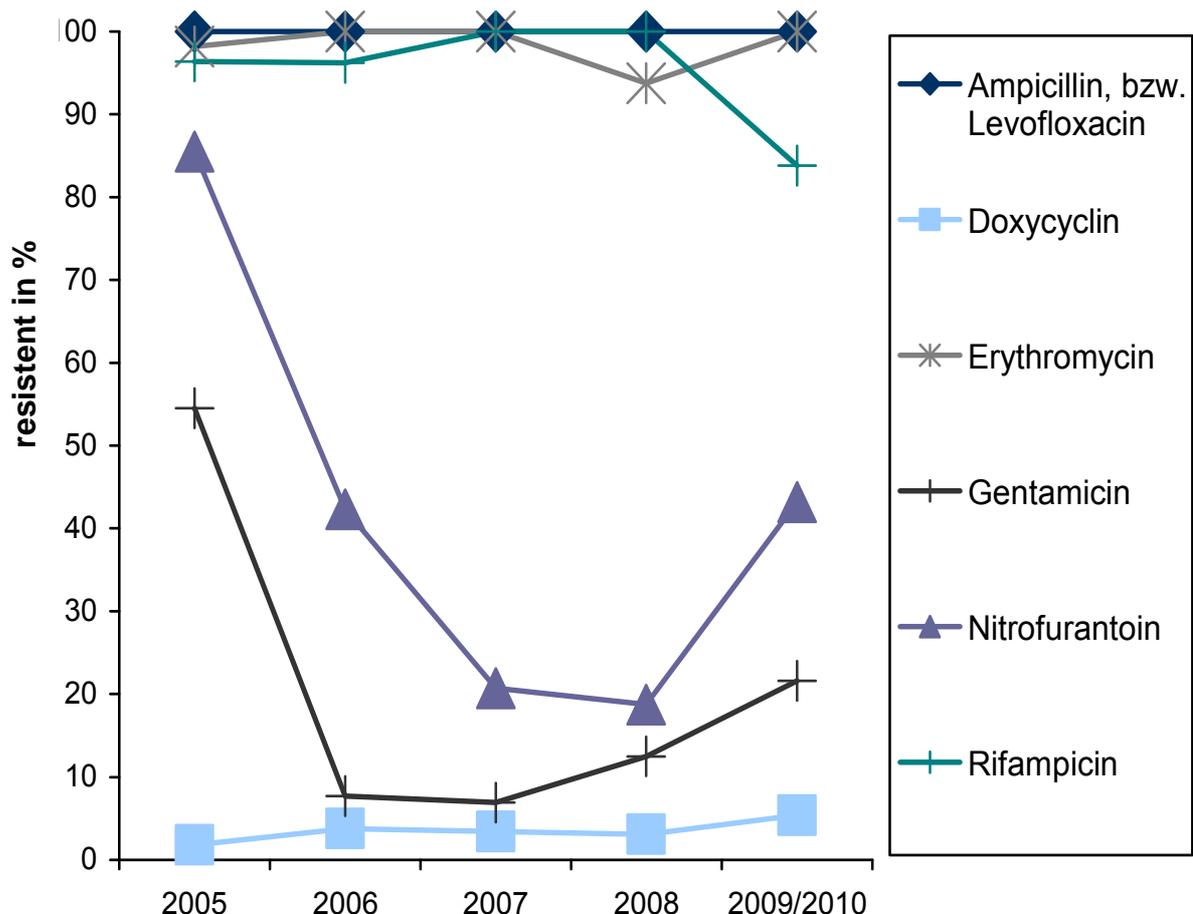


Abbildung 3b: Resistenzdaten (*high level*-Resistenz bei Gentamicin) der 179 von 2005-2009/2010 untersuchten *E. faecium*-Stämme im Überblick (Ampicillin, Doxycyclin, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin, Nitrofurantoin, Rifampicin)

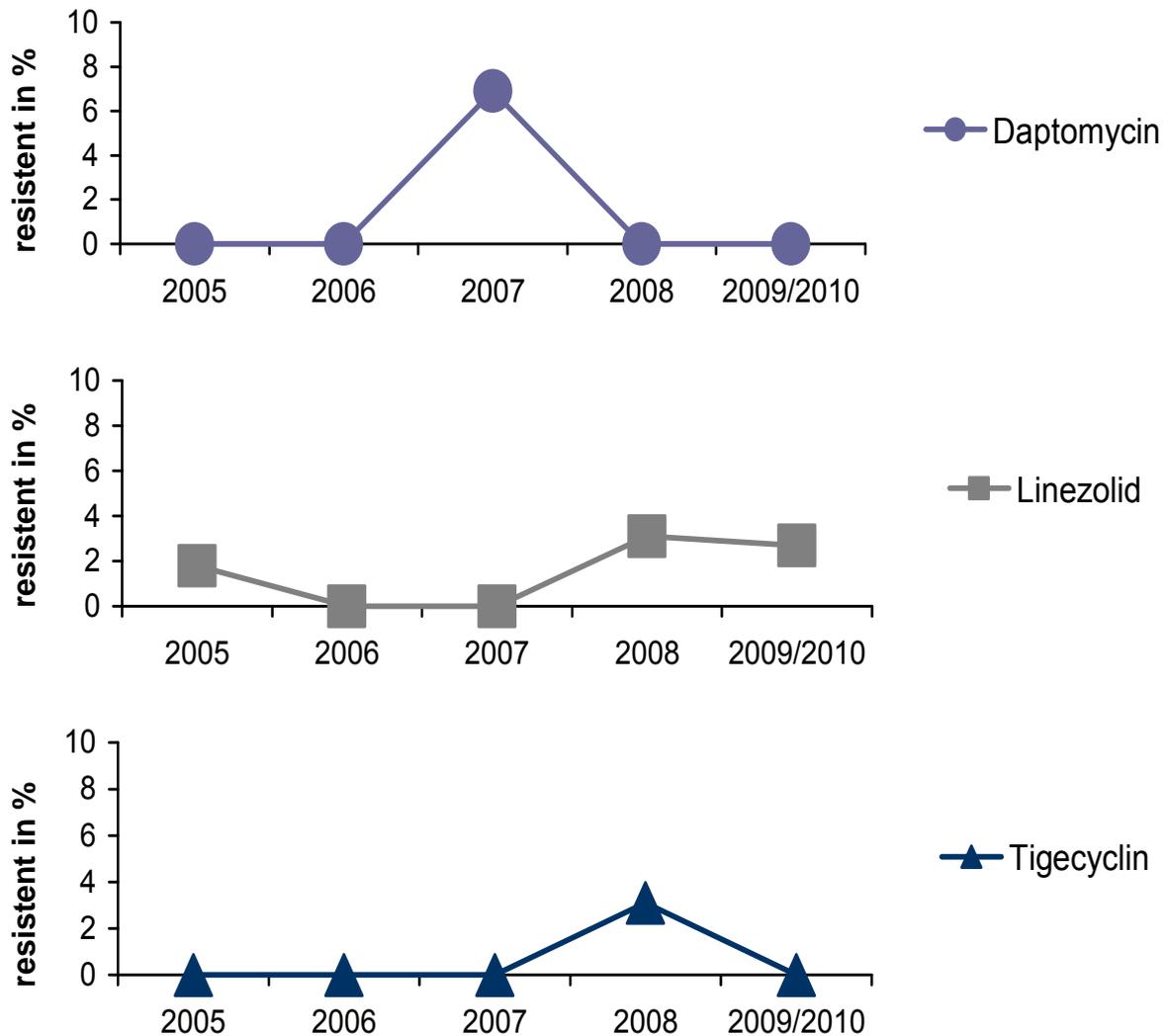


Abbildung 3c: Resistenzdaten der 179 von 2005-2009/2010 untersuchten *E. faecium*-Stämme im Überblick (Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin)

3.4 Ergebnisse der phäno- und genotypischen Untersuchung der Teicoplanin- und Vancomycin-Resistenz

3.4.1 Phänotyp

Zunächst wurde die Empfindlichkeit der in die Untersuchung einbezogenen *E. faecium*-Isolate ($n_{\text{gesamt}}=179$) bezüglich Teicoplanin und Vancomycin phänotypisch per Agardiffusionstest bestimmt (siehe Punkt 2.2.5). Die Ergebnisse hierzu sind in den Tabellen 3d-f dargestellt.

**Tabelle 3d: Phänotypische Empfindlichkeitstestung
der 179 *E. faecium*-Isolate – Vancomycin**

Jahr	Anteil in % (n)		
	r	i	s
2005	100,0 (55)	0,0 (0)	0,0 (0)
2006	100,0 (26)	0,0 (0)	0,0 (0)
2007	100,0 (29)	0,0 (0)	0,0 (0)
2008	100,0 (32)	0,0 (0)	0,0 (0)
2009/2010	91,9 (34)	8,1 (3)	0,0 (0)
gesamt	98,3 (176)	1,7 (3)	0,0 (0)

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

**Tabelle 3e: Phänotypische Empfindlichkeitstestung
der 179 *E. faecium*-Isolate – Teicoplanin**

Jahr	Anteil in % (n)		
	r	i	s
2005	1,8 (1)	5,5 (3)	92,7 (51)
2006	7,7 (2)	23,1 (6)	69,2 (18)
2007	17,2 (5)	6,9 (2)	75,9 (22)
2008	15,6 (5)	6,3 (2)	78,1 (25)
2009/2010	5,4 (2)	2,7 (1)	91,9 (34)
gesamt	8,4 (15)	7,8 (14)	83,8 (150)

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

**Tabelle 3f: Vergleich der Resistenzdaten der insgesamt von 2005-2009/2010
untersuchten Blutkultur-Isolate und sonstigen Isolate bezüglich Teicoplanin
und Vancomycin**

Antibiotikum	Blutkultur-Isolate (n=31)			Sonstige Isolate (n=148)		
	Anteil in % (n)			Anteil in % (n)		
	r	i	s	r	i	s
Teicoplanin	6,5 (2)	3,2 (1)	90,3 (28)	8,8 (13)	8,8 (13)	82,4 (122)
Vancomycin	100,0 (31)	0,0 (0)	0,0 (0)	98,0 (145)	2,0 (3)	0,0 (0)

r= resistent, i= intermediär-empfindlich, s= sensibel

3.4.2 Genotyp

Zusätzlich zur Bestimmung des Phänotyps, wurde der Genotyp der 179 *E. faecium*-Isolate ermittelt, welcher der Teicoplanin- und Vancomycin-Resistenz zugrunde liegt. Da eine medizinische Relevanz derzeit nur für den *vanA*- und den *vanB*-Resistenztyp in Enterokokken besteht (Werner et al. 2008a), wurde die PCR-Detektion der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten auf den Nachweis des *vanA*- und *vanB*-Gens beschränkt (Durchführung der PCR siehe Punkt 2.2.6-2.2.8). Bei 38 Stämmen konnte das *vanA*-Gen, bei 141 das *vanB*-Gen nachgewiesen werden (Abbildung 3e). Die Stämme zeigten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNS Banden auf der gewünschten Höhe (*vanA*=377 bp, *vanB*=298 bp), wodurch das Vorhandensein der entsprechenden Genabschnitte im Genom bestätigt wurde (Abbildung 3d). Eine detaillierte Auflistung der Verteilung des *vanA*- und *vanB*-Genotyps findet sich in den Tabellen 3g und 3h.

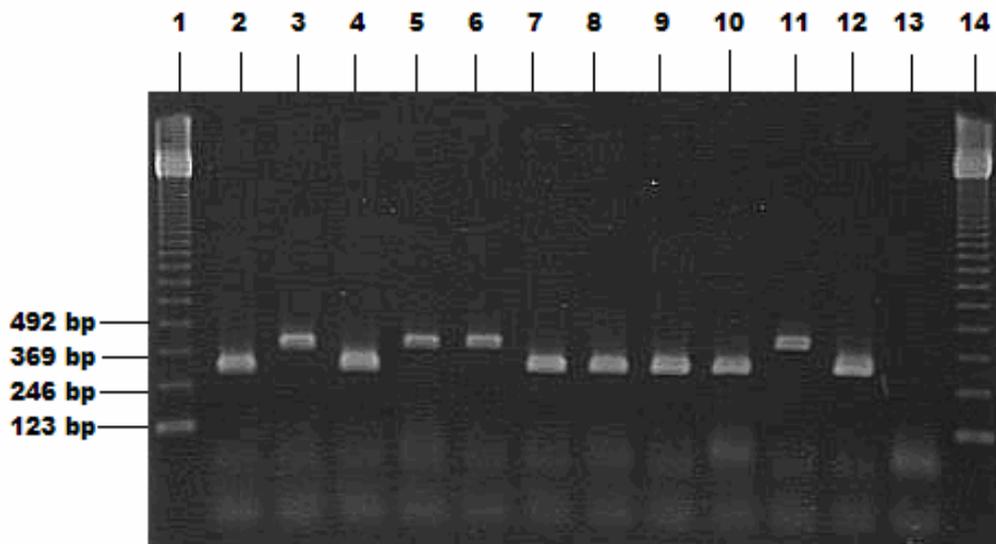


Abbildung 3d: Amplifizierte *vanA*- und *vanB*-Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel. 1, 14=123 bp Marker, 2=*vanB*-Positivkontrolle, 3=*vanA*-Positivkontrolle, 13=Negativkontrolle, 4-12=untersuchte Stämme.

Tabelle 3g: Jahrweise Auflistung der klinisch bedeutsamen *vanA*- und *vanB*-Resistenztypen unter den 179 untersuchten *E. faecium*-Isolaten

Jahr	Anteil in % (n)	
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
2005	7,3 (4)	92,7 (51)
2006	50,0 (13)	50,0 (13)
2007	31,0 (9)	69,0 (20)
2008	21,9 (7)	78,1 (25)
2009/2010	13,5 (5)	86,5 (32)
gesamt	21,2 (38)	78,8 (141)

Tabelle 3h: Anteile des *vanA*- und *vanB*-Genotyps unter den insgesamt von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolaten und sonstigen Isolaten

Resistenztyp	Anteil in % (n)	
	<i>vanA</i> (n=38)	<i>vanB</i> (n=141)
Sonstige Isolate (n=148)	23,0 (34)	77,0 (114)
Blutkultur-Isolate (n=31)	12,9 (4)	87,1 (27)

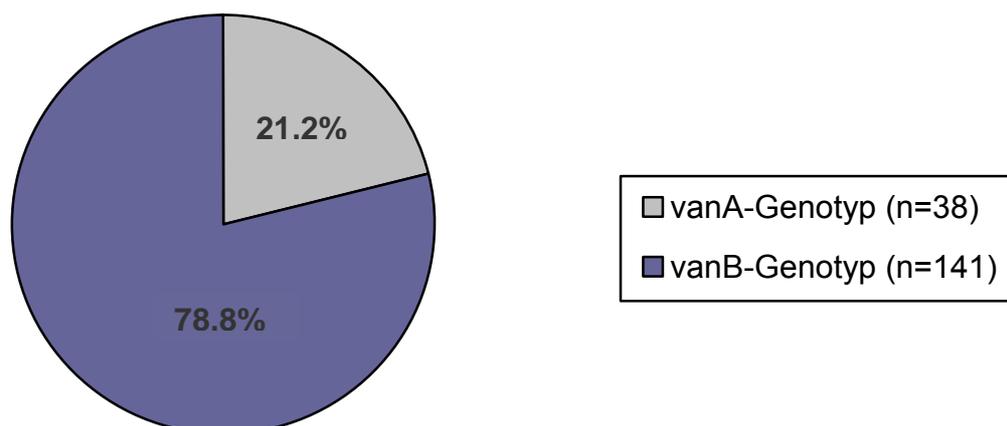


Abbildung 3e: Häufigkeitsverteilung des *vanA*- sowie *vanB*-Genotyps unter den 179 in die Untersuchung einbezogenen *E. faecium*-Isolaten

Bezüglich der Verteilung der Resistenz-Determinanten *vanA* und *vanB* ist innerhalb des Untersuchungszeitraums kein eindeutiger Trend zu erkennen. Der Anteil *vanB*-

positiver Isolate sinkt zunächst, um dann bis 2009/2010 wieder langsam anzusteigen, ohne allerdings den Höchstwert von 2005 zu erreichen.

Neun der untersuchten Stämme mit *vanA*-Gencluster zeigten *in vitro* einen VanB-Phänotyp, das heißt ihre MHK-Werte für Teicoplanin lagen im sensiblen Bereich (MHK ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$). Während die Werte für Teicoplanin bei Stämmen mit VanB-Genotyp jedoch üblicherweise bei ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ liegen (Werner et al. 2007), zeigten diese Stämme für Teicoplanin MHK-Werte von 4-8 $\mu\text{g/ml}$.

Vierzehn der *E. faecium*-Stämme erschienen trotz des *vanA*-Genotyps *in vitro* phänotypisch Teicoplanin-intermediär-empfindlich.

Drei der nicht durch das diagnostische Labor, sondern im Rahmen dieser Arbeit isolierten Stämme erschienen im Agardiffusionstest (Etest[®]) Vancomycin-intermediär-empfindlich (im Agardiffusionstest mit 5 μg Vancomycin-Blättchen zeigten sie einen unscharf begrenzten Hemmhof). Trotzdem wurden diese Stämme mitgeführt und, da sie sich als *vanB*-positiv erwiesen, in der Stammsammlung belassen. Daher sind nicht 100 % der untersuchten Stämme per definitionem phänotypisch Vancomycin-resistent, wie man es erwarten würde, da doch die Vancomycin-Resistenz Kriterium für die Aufnahme in die Stammsammlung und Untersuchung ist. Alle untersuchten Stämme (MHK-Werte für Vancomycin im Bereich von 8 bis > 256 $\mu\text{g/ml}$) sind jedoch *vanA*-, bzw. *vanB*-positiv.

3.5 PCR-Detektion des *esp* (*enterococcal surface protein*)-Gens

Alle 179 in die Untersuchung einbezogenen *E. faecium*-Isolate wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion auf das Vorhandensein des *esp*-Gens, das ein Enterokokken-Oberflächen-Protein kodiert, geprüft (Reaktionsbedingungen siehe Punkt 2.2.6-2.2.8). Stämme, die im Gelbild zunächst keine Banden auf der gewünschten Höhe (475 bp) zeigten und somit als *esp*-negativ eingestuft wurden, wurden noch einmal getestet, um die Ergebnisse zu bestätigen, bzw. um ein Nicht-Funktionieren der PCR bei einzelnen Proben auszuschließen. Letztendlich zeigten alle untersuchten *E. faecium*-Isolate Banden bei 475 bp, was das Vorhandensein des *esp*-Gens im Genom bestätigte. Sie wurden somit *esp*-positiv gewertet (Abbildung 3f).

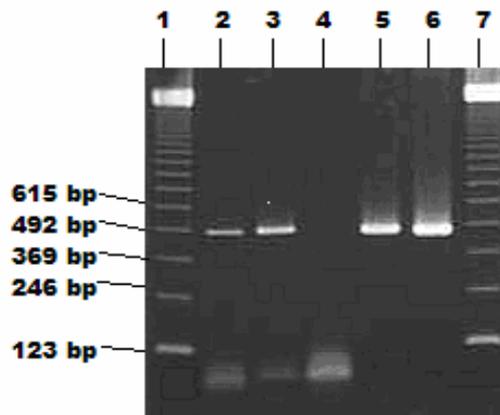


Abbildung 3f: Amplifizierte *esp*-Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel. 1, 7=123 bp Marker, 2, 3=Positivkontrolle, 4=Negativkontrolle, 5, 6=untersuchte Stämme.

3.6 PCR-Detektion des *hyl*-Gens

Die Reaktionsbedingungen zum Nachweis des *hyl*-Gens sind unter Punkt 2.2.6-2.2.8 beschrieben. Alle 179 untersuchten *E. faecium*-Stämme wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des *hyl*-Gens geprüft. Dieses kodiert eine vermeintliche Hyaluronidase. Auch bei dieser PCR wurden Stämme, die im Gelbild keine sichtbaren Banden auf der gewünschten Höhe von 661 bp zeigten und damit als *hyl*-negativ gewertet wurden, ein zweites Mal geprüft, um das Ergebnis zu bestätigen, bzw. ein Nicht-Funktionieren der PCR bei einzelnen Proben auszuschließen. 145 *E. faecium*-Stämme zeigten sichtbare Banden bei 661 bp (dies galt als Bestätigung des Vorhandenseins des *hyl*-Gens im Genom) und sind somit *hyl*-positiv, bei 34 *E. faecium*-Stämmen konnten keine Banden nachgewiesen werden. Sie wurden somit *hyl*-negativ gewertet (Abbildung 3g).

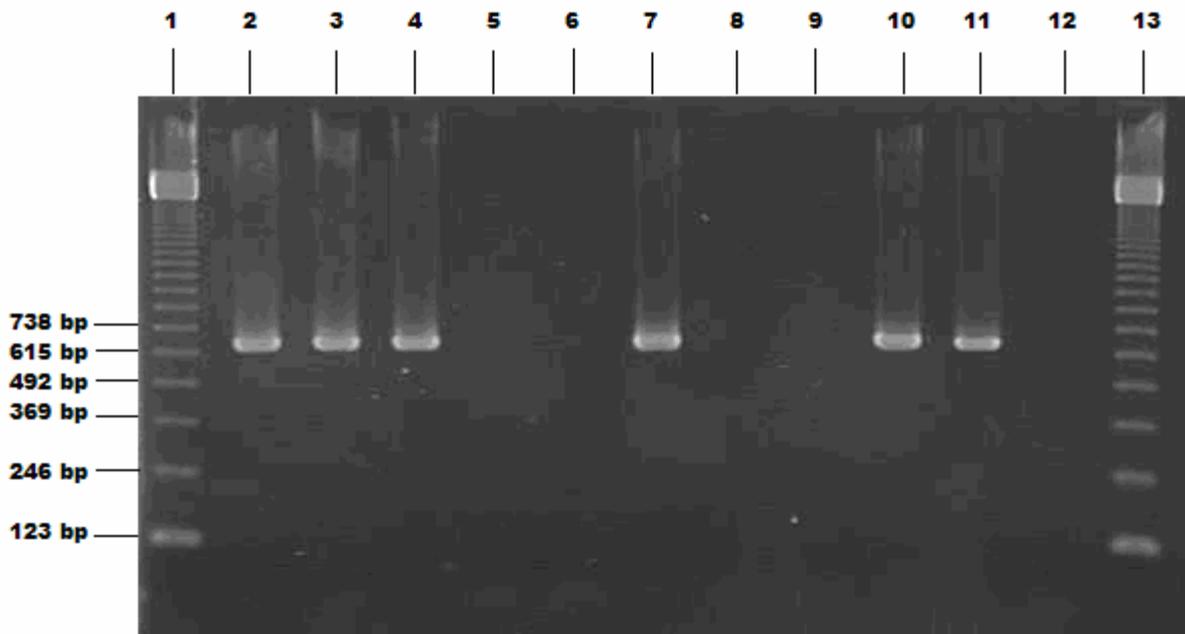


Abbildung 3g: Amplifizierte *hyl*-Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel. 1, 13=123 bp Marker, 2=Positivkontrolle, 12=Negativkontrolle, 3-11=untersuchte Stämme.

3.7 Ergebnisse der Untersuchung des *E. faecalis*-Isolates

Die Untersuchung des 2006 isolierten *E. faecalis*-Isolates verlief nach dem gleichen Procedere wie die Untersuchung der *E. faecium*-Isolate. Bei der *in vitro* Empfindlichkeitstestung per Agardiffusionstest zeigte sich der *E. faecalis*-Stamm empfindlich gegenüber Ampicillin (bei *E. faecalis* hat die Ampicillin-Resistenz im Gegensatz zu *E. faecium* zumindest in Mitteleuropa keine medizinische Bedeutung; Werner et al. 2008a; siehe auch Klare et al. 2011), Daptomycin, Doxycyclin, Erythromycin, Linezolid, Nitrofurantoin, Teicoplanin und Tigecyclin. Desweiteren erschien er *low-level*-resistent gegenüber Gentamicin und intermediär-empfindlich bezüglich Rifampicin. Resistent zeigte er sich gegen Levofloxacin und Vancomycin. Mittels PCR konnte sowohl das *vanB*-Resistenzgen als auch der Virulenzfaktor *esp* nachgewiesen werden. Auf einen Nachweis des *hyl*-Gens wurde verzichtet.

3.8 Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

62 der 180 in die Untersuchung einbezogenen Isolate wurden mittels Makrorestriktionsanalyse und Pulsfeldgelelektrophorese unter den bei Punkt 2.2.9 beschriebenen Bedingungen charakterisiert. Die Auswertung erfolgte mittels Dice-Koeffizient und

einer UPGMA-Berechnung mit Hilfe der Analyse-Software BioNumerics 6.0 (Parameter „optimization“ 0,5 und „tolerance“ 1,0).

Neben 61 ausgewählten *E. faecium*-Isolaten wurde auch der eine *E. faecalis*-Stamm ($n_{\text{gesamt}}=62$) mittels PFGE untersucht und zur Abgrenzung in der Abbildung belassen. Betrachtet man die DNS-Bandenmuster der untersuchten *E. faecium*-Isolate im Gelbild, sowie das zugehörige Dendrogramm, fällt eine deutliche genotypische Heterogenität derselben auf (Abbildung 3h). Gleichzeitig werden aber auch Cluster eng verwandter Isolate identifiziert (es sei nochmals daran erinnert, dass die typisierten Isolate anhand bestimmter Merkmale vorselektiert wurden und letztlich mehrere Isolate repräsentieren können). Die größten Übereinstimmungen bezüglich ihrer DNS-Bandenmuster zeigen zum einen die Isolate 577 und 559, zum anderen die Isolate BK 1822 und 581 (Abbildung 3h, Cluster III und IV). Die Isolate 577 und 559 stammen beide aus Probenmaterial von Patienten der Klinik für Hämatologie und Onkologie und wurden zeitnah isoliert (559 am 26.12.2007, 577 am 22.01.2008). Die Muster der DNS-Banden stimmen zu 97 % überein, wie die der Isolate BK 1822 und 581. Zwischen der Isolierung dieser Stämme liegt jedoch eine längere Zeitspanne (BK 1822 am 30.01.2009, 581 am 08.03.2010) und sie stammen von Patienten verschiedener Fachgebiete. Betrachtet man Abbildung 3h weiter, erkennt man, dass die übrigen Stämme eine Vielzahl weiterer Cluster bilden. Die geringste Übereinstimmung bezüglich der DNS-Bandenmuster der untersuchten *E. faecium*-Isolate findet man zwischen Cluster I und II, deren Bandenmuster nur zu 54 % übereinstimmen.

Legt man der Definition eines Stammes einen Ähnlichkeitswert von 87 % (bzw. 82 %) zugrunde (Morrison et al. 1999; siehe Diskussion), so erhält man innerhalb der 61 untersuchten *E. faecium*-Isolate 43 (bzw. 29) Cluster, wobei man die Isolate eines jeden Clusters zu einem Stamm zusammenfassen würde (Abbildung 3h). Innerhalb dieser 43 (29) Stämme – jenseits der 87 % (82 %)-Grenze – besteht ebenfalls genotypische Diversität, das heißt die DNS-Bandenmuster der Isolate eines Stammes gleichen sich nicht völlig. Dies lässt sich durch das ständige Auftreten genetischer Ereignisse erklären, das innerhalb eines Stammes zu einem gewissen Maß erlaubt ist. Betrachtet man die Daten und Informationen bezüglich der Isolierung der einzelnen Stämme aus klinischem Material, so erkennt man, dass die Stämme teilweise über Jahre hinweg isoliert wurden und durchaus auch aus Patienten verschiedener Fachkliniken (Abbildung 3h, z. B. Cluster V). Vergleicht man das Vorkommen der

Virulenzfaktoren *esp* und *hyl*, sowie der Gene *vanA* und *vanB* innerhalb eines solchen Stammes, so gleichen sich die Isolate bezüglich dieser Eigenschaften meist. Abweichungen sind jedoch zu beobachten und in der tabellarischen Auflistung der Zusatzinformationen in Abbildung 3h farbig hervorgehoben. Zur Orientierung sind die Cluster, die sich ergeben nutzt man den Ähnlichkeits-Grenzwert 82 %, in der Tabelle durch Trennlinien voneinander abgesetzt. Wo nötig, finden sich Hilfslinien, die Abgrenzungen von Subclustern innerhalb dieser Cluster anzeigen.

Die Fragestellung, inwiefern es sinnvoll ist, die Stammgrenze ohne Berücksichtigung weiterer Informationen bei einem Prozentwert von 87 (82) zu ziehen, ist kritisch zu behandeln und ist Gegenstand der Diskussion. Ungeachtet dessen, welchen Ähnlichkeits-Grenzwert man zur Clustereinteilung nutzt, lässt sich jedoch wohl zusammenfassend sagen, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung eindeutig eine große Diversität der Isolate aufzeigen.

Um eine Überdiskriminierung seitens der PFGE auszuschließen, das heißt um zu vermeiden, dass die PFGE eine Diversität vorspiegelt, die nicht gegeben ist, wurden einige Isolate zusätzlich mittels MLST untersucht (siehe Punkt 3.9).

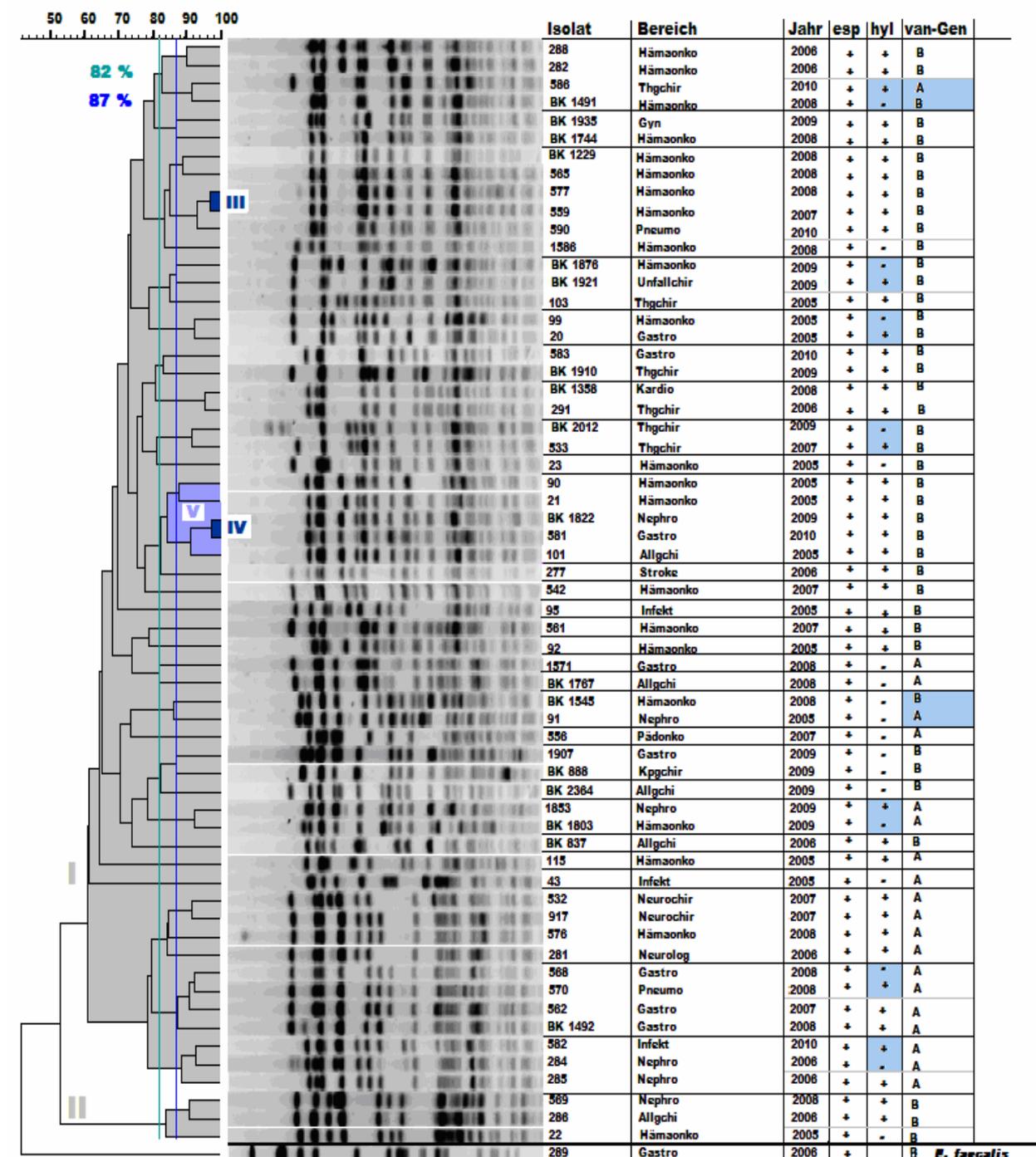


Abbildung 3h: Ergebnisse der PFGE (Dice-Koeffizient und UPGMA-Berechnung mittels BioNumerics 6.0-Software) – Bandenmuster mit Dendrogramm sowie tabellarischer Auflistung der zugehörigen Isolate, Verteilung der epidemischen Marker *esp/hyl*, der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten *vanA/vanB* und epidemiologischer Daten. Erklärungen zu Farben- und Zeichencode finden sich im Text. Die in der Spalte „Bereich“ verwendeten Abkürzungen der einzelnen Fachgebiete/Kliniken finden sich gelistet im Abkürzungsverzeichnis.

3.9 Ergebnisse des Multi Locus Sequence Typings (MLST)

Alle 24 zur Typisierung mittels MLST (Durchführung siehe Punkt 2.2.10) ausgewählten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämme zeigten im Gelbild bezüglich der sieben nachzuweisenden Haushaltsgene (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS*, *purK*) Banden auf der gewünschten Höhe, wodurch deren Vorhandensein im Genom bestätigt wurde. Zu beachten ist hierbei, dass die PCR-Produkte um einige Basenpaare größer sind, als die angegebene Sequenzlänge der MLST-Allele (Tabelle 2t). Man amplifiziert und sequenziert einen größeren Bereich als man letztendlich für die Analyse benötigt. Dieses Vorgehen dient der Sicherheit, gut auswertbare Sequenzen zu erhalten, auch wenn diese an Anfang und Ende schlechter lesbar sind.

Nach der Sequenzierung der PCR-Produkte und der visuellen Überprüfung der Auswertbarkeit der erhaltenen Sequenzen erfolgte die Auswertung derselben. Die jeweiligen Allelprofile der untersuchten Stämme, sowie die zugehörigen MLST-Sequenztypen (STs) sind in Tabelle 3i dargestellt.

Tabelle 3i: Tabellarische Auflistung der erhaltenen Allelprofile, sowie der zugehörigen Sequenztypen (STs)

Untersuchte <i>E. faecium</i> -Isolate (n=24)	Alleltyp							ST
	<i>adk</i>	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>purK</i>	
277, 285, 532, 542, 570, BK 1358, 1571, BK 2012	1	1	1	1	1	7	1	202
20, 561, 577, 586, BK 837, BK1921, BK 1935	1	15	1	1	1	7	1	192
91, 556	1	15	1	1	1	1	1	78
BK 888, BK 1803	1	9	1	1	1	1	1	117
286	1	1	1	1	1	1	1	17
43	1	7	1	1	5	1	1	18
92	1	7	1	1	5	7	1	262
95	1	1	28	1	1	1	1	306
115	1	15	1	1	1	20	44	412

Die untersuchten Isolate konnten neun verschiedenen Sequenztypen zugeordnet werden, was die Aussage der PFGE bestätigt. Während ST 202 (n=8) und 192 (n=7) häufiger auftraten, wurden andere STs nur vereinzelt nachgewiesen (Tabelle 3i). Alle identifizierten MLST-Typen gehören dem klonalen Komplex 17 (CC17) an (Abbildung 3j). Die Ergebnisse der MLST-Typisierung zeichnen somit für die untersuchten Isolate ein recht heterogenes Bild innerhalb des CC17.

Abbildung 3i, die einen Einblick in die Populationsstruktur von *E. faecium* geben soll, wurde mit Hilfe der goeBURST 1.2.1-Software angefertigt. Als Datengrundlage zur Erstellung der Grafik diente eine öffentliche MLST-Database (<http://www.mlst.net>), die alle zum Zeitpunkt der Erstellung (15.03.2011) hinterlegten Sequenztypen von *E. faecium* umfasst (524 STs). Die Gruppendifinition umfasst Single- und Doppel-Locus-Varianten. Insgesamt ergaben sich bezüglich der zugrunde liegenden Daten 43 Gruppen. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der größten Gruppe (445 STs), die den klonalen Komplex 17 umfasst, der hier vor allem dargestellt werden soll. Die Charakterisierung ausgewählter Isolate mittels MLST ermöglichte ihre Einordnung in die *E. faecium*-Population, die Lokalisation der nachgewiesenen STs ist in Abbildung 3i besonders hervorgehoben.

Bei ST 17 handelt es sich um den Gruppen-Gründer (hellgrüner Nodus), Untergruppen-Gründer innerhalb des CC17 sind unter anderem ST 18, 78, 117 und 192 (dunkelgrüne Nodi). Bei den MLST-Typen 78, 117, 202 und 306 handelt es sich um Single-Locus-Varianten (SLV) von ST 17, bei ST 18 und 192 um Doppel-Locus-Varianten (DLV) von ST 17 und bei ST 412 (DLV von ST 78 und 192) und ST 262 (SLV von ST 18) um Dreifach-Locus-Varianten von ST 17. Auf eine vollständige Auflistung der Verbindungen zwischen den erhaltenen MLST-Sequenztypen wurde verzichtet.

Die erhaltenen STs stehen größtenteils mit den PFGE-Clustern im Einklang (PFGE-Cluster und ST gleichfarbig) und bestätigen diese somit. Dies zeigt Abbildung 3j. Stämme, die nur per PFGE untersucht wurden, wurden ebenso wie die mittels beider Methoden typisierten Isolate desselben PFGE-Clusters markiert. Die Zuordnung erfolgte rein spekulativ, da eine Bestätigung der entsprechenden MLST-STs ausblieb. Das Hauptanliegen bei Durchführung des MLSTs lag nicht in der Bestätigung der erhaltenen PFGE-Cluster, sondern sollte Auskunft über eine vorliegende CC17-Zugehörigkeit der untersuchten Isolate und eine mögliche Überdiskriminierung seitens der PFGE geben, was die Untersuchung aller PFGE-Isolate mittels MLST nicht nötig machte. Isolate, deren ST nur einmal nachgewiesen wurde, und die eine etwas isolierte Stellung im PFGE-Dendogramm innehaben, wurden nicht farbig markiert. Fünf Isolate des PFGE-Clusters I wurden mittels MLST untersucht und dem ST 192 zugeordnet. Es clustert mit PFGE-Cluster II, aus dem vier Stämme dem ST 202 zugewiesen wurden, bei einem Ähnlichkeitslevel von 73 %. ST 202 ist eine

SLV von ST 192. Sie stehen mit einem Stamm in Verbindung, der als ST 306 – einer DLV von ST 202 – identifiziert wurde (Ähnlichkeitslevel 70 %). In Cluster III wurden zwei Isolate dem ST 78 zugeordnet. In Cluster IV, das mit einem weiteren Isolat vom ST 192 in Verbindung steht (Ähnlichkeitslevel 75 %), wurden zwei Isolate als ST 117 identifiziert. ST 117 ist eine DLV von ST 192, ST 78 eine SLV von ST 117 und 192. Drei Isolate des Clusters V wurden dem ST 202 zugeordnet, ein Isolat von Cluster VI dem ST 17, dem Gründer des CC17, dem alle erhaltenen STs angehören. Er steht mit allen anderen untersuchten Stämmen in Verbindung (Ähnlichkeitslevel 54 %). Eine etwas isolierte Stellung im PFGE-Dendogramm haben ST 18 und 412 inne. Die drei untersuchten Isolate aus PFGE-Cluster VII wurden den STs 192, 202 und 262 zugeordnet. ST 202 ist eine SLV von ST 192, ST 262 eine DLV dieser STs. Desweiteren kombiniert Abbildung 3j die Ergebnisse der genotypischen Charakterisierung mit epidemiologischen Daten. Neben Clustern, deren Isolate sowohl genotypisch als auch epidemiologisch in engerem Zusammenhang stehen (tabellarischer Teil von Abbildung 3j, mit „a“ gekennzeichnet), existieren auch solche, für deren Isolate ein epidemiologischer Zusammenhang nur in weiterem Sinne hergestellt werden kann, da Zeitpunkt bzw. Station (Fachgebiet) des Patienten bei Probenentnahme nicht übereinstimmen (tabellarischer Teil von Abbildung 3j, mit „b“ gekennzeichnet). Einige dieser Cluster sind exemplarisch für alle hervorgehoben.

Es fällt auf, dass Isolate des gleichen MLST-Sequenztyps im PFGE-Dendogramm teilweise recht weit auseinander liegen (ST 192 und 202; Abbildung 3j). Da die Typisierung mittels MLST aber weniger diskriminierend ist als die Charakterisierung mittels PFGE, ist es nicht verwunderlich, dass sich Isolate mit identischem MLST-Sequenztyp in der PFGE unterscheiden und somit gleiche MLST-Sequenztypen in verschiedenen PFGE-Clustern zu finden sind.

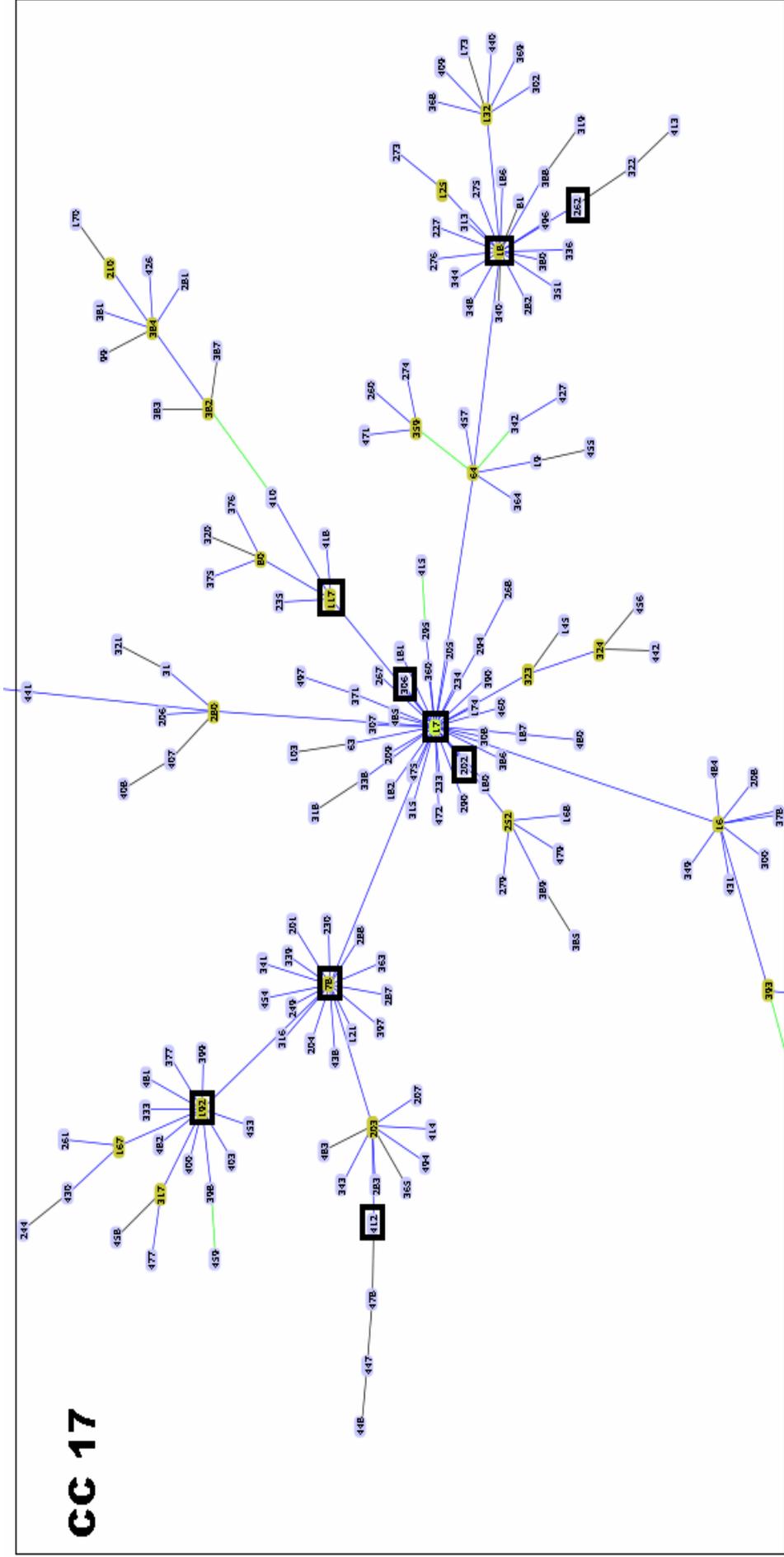


Abbildung 3i: Ausschnitt aus der auf MLST-Daten basierenden Populationsstruktur von *E. faecium* mit Darstellung des CC17, erstellt mit Hilfe von goeBURST 1.2.1. Die neun Sequenztypen der untersuchten *E. faecium*-Isolate sind durch schwarze Umrandung gekennzeichnet. Hellgrüner Nodus=Gruppen-Gründer (ST 17), dunkelgrüne Nodi=Untergruppen-Gründer (u. a. ST 18, 78, 117, 192). Der Farbcode der Verbindungslinien kann in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden. Weitere Angaben zur Erstellung der Abbildung finden sich im Text.

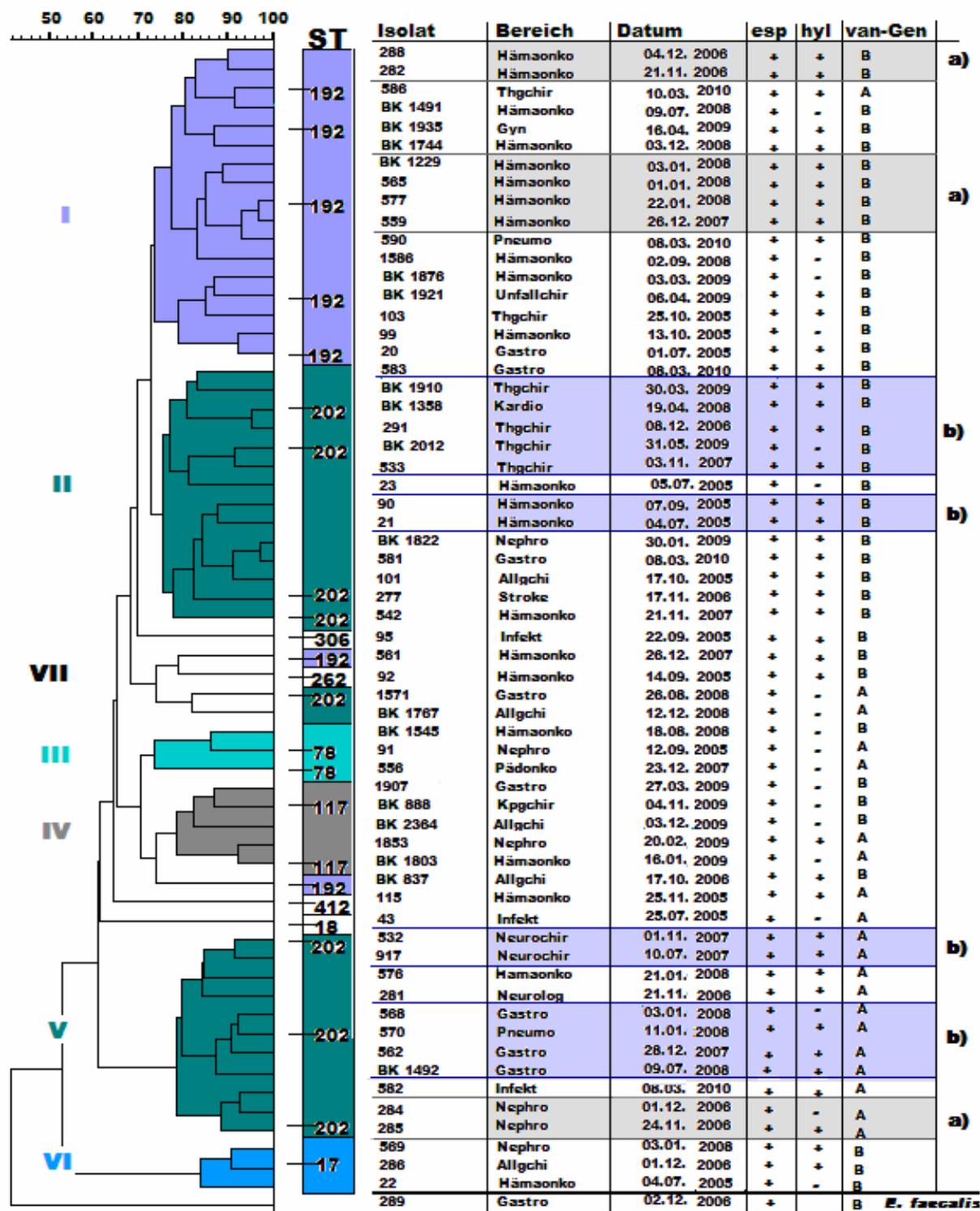


Abbildung 3j: Ergebnisse der genotypischen Charakterisierung (MLST und PFGE) sowie tabellarische Auflistung der zugehörigen Isolate, Verteilung der epidemischen Marker *esp/hyl*, der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten *vanA/vanB* und epidemiologischer Daten. Römische Zahlen=PFGE-Cluster, ST=MLST-Sequenztyp, arabische Ziffern siehe Text. Die in der Spalte „Bereich“ verwendeten Abkürzungen der einzelnen Fachgebiete/Kliniken finden sich gelistet im Abkürzungsverzeichnis.

3.10 Klinische Daten

Die klinischen Informationen wurden mit Hilfe der unter Punkt 2.2.11 aufgeführten Software eruiert. Zu Beginn sei erwähnt, dass im Folgenden keine allgemeingültigen Aussagen getroffen werden. Die Ergebnisse beziehen sich allein auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolate ($n_{\text{gesamt}}=180$) und die Patienten ($n=179$), aus denen sie isoliert wurden.

3.10.1 Geschlecht

Es wurde sowohl Probenmaterial männlicher als auch weiblicher Patienten untersucht. Der Anteil weiblicher untersuchter Patienten liegt bei 43,6 % ($n=78$), der männlicher untersuchter Patienten bei 56,4 % ($n=101$).

3.10.2 Alter

Das Alter der Patienten, deren Isolate im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde zum Zeitpunkt der Entnahme des Probenmaterials bestimmt. Das arithmetische Mittel des Alters der Patienten bei Probenentnahme beträgt 57,7 Jahre (Minimum 9, Maximum 87 Jahre).

3.10.3 Kliniken

Abbildung 3k gibt einen Überblick, in welchen Fachkliniken und Einrichtungen des beschriebenen südwestdeutschen Krankenhauses der Maximalversorgung die Patienten, von denen die untersuchten Isolate stammen, stationär aufgenommen waren, bzw. behandelt wurden.

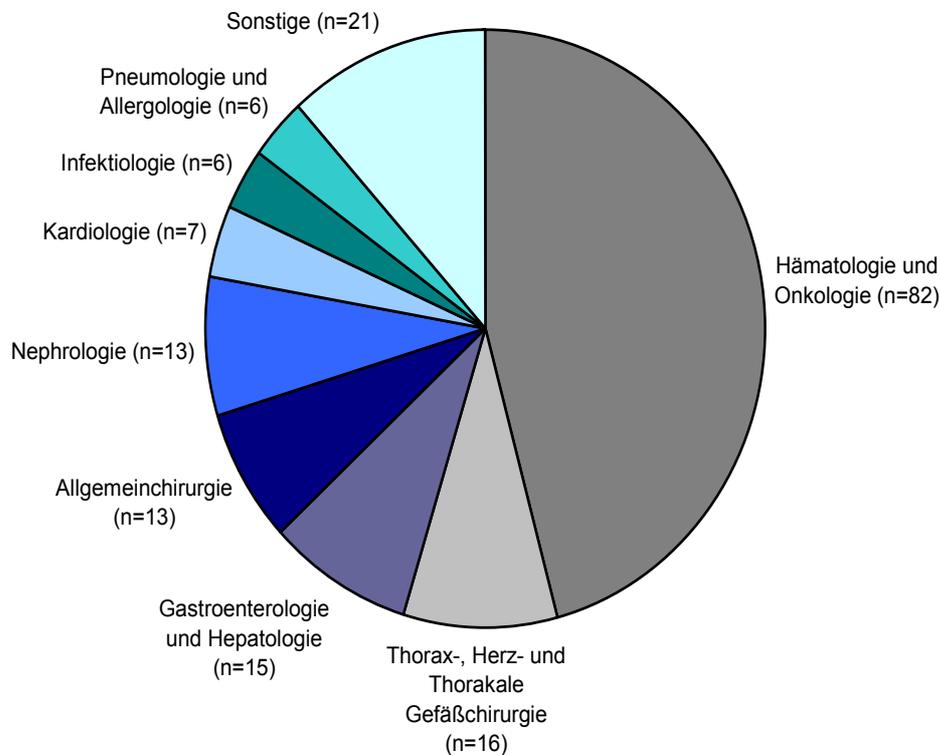


Abbildung 3k: Verteilung der Patienten (n=179), deren Probenmaterial untersucht wurde, auf die einzelnen Fachgebiete eines Krankenhauses der Maximalversorgung in Südwestdeutschland. Pro Patient wurde ein Isolat der gleichen Spezies untersucht. Von einem Patienten der Fachklinik für Gastroenterologie und Hepatologie stammen ein *E. faecalis*- und zugleich ein *E. faecium*-Isolat. Der Punkt „Sonstige (n=21)“ setzt sich aus den Fachgebieten Gefäß- und Endovascularchirurgie (n=4), Neurochirurgie (n=4), Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (n=3), Frauenheilkunde und Geburtshilfe (n=2), Stroke-Unit (Neurologie) (n=2), (Kinder-) Urologie (n=2), Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (n=1), Neurologie (n=1), Pädiatrische Onkologie (n=1) sowie Strahlentherapie und Onkologie (n=1) zusammen.

3.10.4 Zeitraum zwischen erster Aufnahme des Patienten im Klinikum und erstem bekannten VRE-Nachweis

Der Median der Zeit zwischen der ersten Aufnahme des Patienten in dem beschriebenen Krankenhaus und dem ersten bekannten Nachweis Vancomycin-

resistenter Enterokokken liegt bei 75 d, der arithmetische Mittelwert beträgt 428,7 d (Minimum 0, Maximum 2669 d). Bei der Patientin mit *E. faecalis*- und *E. faecium*-Isolat wurde sowohl die Zeit bis zum ersten Nachweis von *E. faecalis* als auch von *E. faecium* berücksichtigt.

Da die Untersuchung auf VRE nicht bei allen Patienten, die in diese Arbeit einbezogen wurden, innerhalb der ersten 48 Stunden des Krankenhausaufenthaltes stattfand, sondern häufig erst zu einem späteren Zeitpunkt, ist es nicht möglich zu sagen, ob die VRE-Kolonisation bzw. –Infektion nosokomialen Ursprungs ist, das heißt während des Krankenhausaufenthaltes erworben wurde, oder bereits vor Aufnahme bestand.

3.10.5 Herkunft bzw. Wohnort der Patienten

Der größte Teil der Patienten, deren Isolate im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden ($n_{\text{gesamt}}=179$), lebt in Deutschland (98,9 %, $n=177$). Nur 1,1 % ($n=2$) der Untersuchten leben hingegen im Ausland (Griechenland, Saudi-Arabien). Von den in Deutschland lebenden Patienten ($n=177$) kommen 91,5 % ($n=162$) aus Hessen, 5,1 % ($n=9$) aus Bayern, je 1,1 % ($n=2$) aus Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz und je 0,6 % ($n=1$) aus Nordrhein-Westfalen und Thüringen.

Diese Menschen ($n=177$) kommen nicht nur aus verschiedenen Bundesländern, sondern leben auch in recht unterschiedlichen Siedlungsstrukturen. Während 2,8 % ($n=5$) der Patienten in Siedlungen mit weniger als 5000 Einwohnern leben, wohnen 26,0 % ($n=46$) in Kleinstädten (5000-20000 EW), 33,9 % ($n=60$) in Mittelstädten (20000-100000 EW) und 37,3 % ($n=66$) in Großstädten (> 100000 EW) (Brockhaus 1989, 1990 und 1991). Die meisten der Patienten, die aus den Großstädten kommen, leben in Frankfurt am Main ($n=51$) und Offenbach ($n=8$), nutzen also das beschriebene Klinikum als nahe gelegene medizinische Versorgungseinrichtung. Städte wie Frankfurt, Offenbach, aber auch Wiesbaden, Darmstadt oder Augsburg stehen kleineren Siedlungen in ländlichen Gegenden, wie z. B. Bessenbach oder Fischbachtal gegenüber, die einigen Patienten als Wohnort dienen.

3.10.6 Grundleiden der Patienten

Die Grundleiden der Patienten, deren Isolate im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden mit Hilfe der ICD-10-GM – der Internationalen statistischen Klassifi-

kation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (DIMDI 2011) – kategorisiert und kodiert.

Der größte Teil der Grundleiden der untersuchten Patienten lässt sich den Kapiteln „Neubildungen“ (n=100), „Krankheiten des Kreislaufsystems“ (n=32) und „Krankheiten des Verdauungssystems“ (n=22) zuordnen (Abbildung 3I).

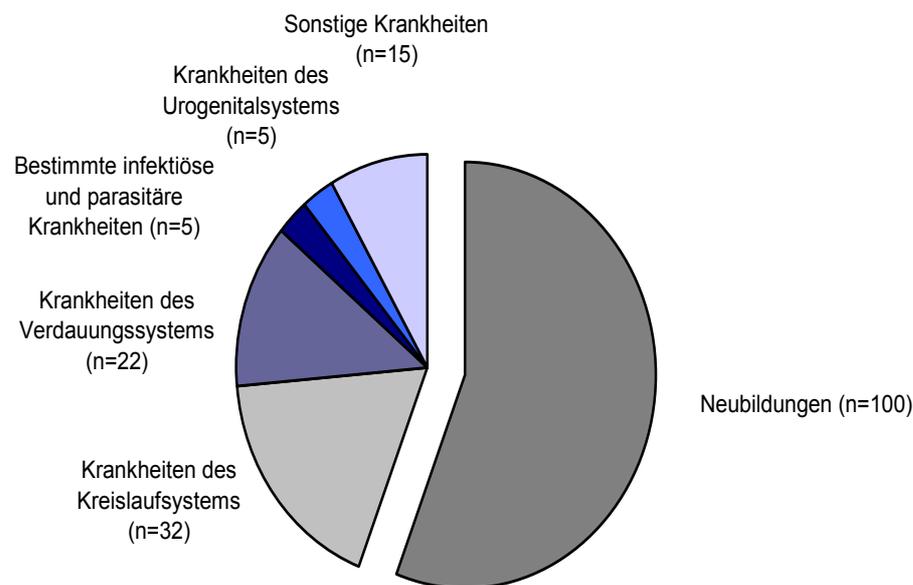


Abbildung 3I: Grundleiden der 179 in die Arbeit einbezogenen Patienten. Der Komplex „Neubildungen“ (n=100) setzt sich aus den Untergruppen „Bösartige Neubildungen des lymphatischen, blutbildenden und verwandten Gewebes“ (n=79), „Bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane“ (n=7), „Bösartige Neubildungen der Atmungsorgane und sonstiger intrathorakaler Organe“ (n=3), „Neubildungen unsicheren oder unbekanntem Verhaltens“ (n=3) und sonstigen Neubildungen (n=8) zusammen. Die Kategorisierung erfolgte mit Hilfe der ICD-10-GM (DIMDI 2011).

3.10.7 Letzte Informationen, die dem Klinikum über die in die Untersuchung einbezogenen Patienten vorliegen

Um eine Aussage bezüglich des weiteren Weges bzw. der weiteren Krankengeschichte der Patienten, deren Isolate in die Untersuchung einbezogen wurden,

machen zu können, wurden die letzten Informationen, die dem Krankenhaus, an dem diese Studie durchgeführt wurde, diese Personen betreffend vorlagen, eruiert.

2 (1,1 %) der Patienten befanden sich zu diesem Zeitpunkt in stationärer Behandlung, 49 (27,4 %) waren verstorben und 128 (71,5 %) entlassen worden.

Bei den VRE-Stämmen der verstorbenen Patienten handelte es sich allein um *E. faecium*-Isolate. Bei 30,6 % (n=15) der 49 verstorbenen Patienten wurden VRE aus dem Blut isoliert, lag also ein septikämisches Geschehen vor. Dies war hingegen bei nur 12,3 % (n=16) von 130 überlebenden Patienten der Fall.

Der Median des Zeitraums zwischen dem ersten bekannten Nachweis von VRE und dem Tod des Patienten liegt bei 15 d, das arithmetische Mittel beträgt 40,31 d (Minimum 0, Maximum 389 d). Es ist nicht bekannt, wie lange der Patient zum Zeitpunkt des ersten bekannten Nachweises von VRE schon besiedelt bzw. infiziert war.

Desweiteren ist unbekannt, inwiefern die Besiedlung bzw. Infektion mit VRE hinsichtlich des Todes der Patienten von Bedeutung war, da die direkte Letalität aufgrund der oft schwerwiegenden Grunderkrankung des Patienten (siehe Punkt 3.10.6) nur schwer zu bestimmen ist. Der größte Teil der verstorbenen Patienten litt an Krankheiten, die den Komplexen „Neubildungen“ (n=24), „Krankheiten des Kreislaufsystems“ (n=11) und „Krankheiten des Verdauungssystems“ (n=10) zugeordnet werden können (DIMDI 2011).

Das arithmetische Mittel des Patientenalters zum Todeszeitpunkt liegt bei 58,9 Jahren (Minimum 26, Maximum 82 Jahre).

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine repräsentative Auswahl Vancomycin-resistenter Enterokokken-Stämme eines südwestdeutschen Krankenhauses der Maximalversorgung hinsichtlich ihrer molekularen Epidemiologie charakterisiert werden. Ziel sollte sein, die VRE-Population an dieser Einrichtung anhand relevanter Merkmale zu beschreiben und eventuelle Veränderungen untersuchter Eigenschaften zwischen 2005 und 2010 aufzuzeigen. Weiterhin sollten die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den untersuchten Isolaten aufgedeckt und Übertragungswege identifiziert werden.

Aus den gesammelten Ergebnissen sollten – soweit möglich – Schlüsse für den zukünftigen Umgang mit VRE an diesem Krankenhaus gezogen werden.

Desweiteren sollte analysiert werden, inwiefern sich eine Abgrenzung dieser aus Patienten stammenden Isolate von animalen VRE-Stämmen bestätigen lässt (siehe auch Einleitung).

4.1 Speziesidentifizierung

Das kommerzielle Testsystem API rapid ID 32 Strep diente zur Bestätigung der vorläufigen Spezieszuordnung (siehe Punkt 2.2.2 und 2.2.4). In 133 (74,3 %) von 179 Fällen konnte das Isolat mittels API rapid ID 32 Strep mit ausgezeichneten bis guten Identifizierungsergebnissen als *E. faecium* identifiziert werden, wodurch die Ergebnisse der vorläufigen Speziesbestimmung, bzw. früherer Untersuchungen bestätigt wurden. Bei den übrigen Isolaten war dies nicht möglich, obwohl alle 46 Stämme bei der vorläufigen Speziesbestimmung und früheren Untersuchungen als *E. faecium* identifiziert worden waren und die Spezies *E. faecium* eindeutig per PCR bestätigt wurde (Tabelle 3a).

Das Problem der Speziesidentifizierung von *E. faecium* mittels verschiedenster Techniken (Cheng et al. 1997) sowie mittels API rapid ID 32 Strep im Speziellen (Hamilton-Miller und Shah 1999) ist durchaus bekannt. Ein möglicher Grund hierfür ist die phänotypische Ähnlichkeit und das teils indifferente Verhalten bei biochemischen Tests zwischen einzelnen Enterokokkenspezies einerseits und die phänotypische Heterogenität innerhalb der Spezies *E. faecium* andererseits (Cheng et al. 1997, Devriese et al. 1993, Teixeira et al. 1995). Während die Fehlerrate eines standardisierten Tests, wie dem Testsystem API rapid ID 32 Strep, im Hinblick auf

den ersten Aspekt durch die Auswahl aussagekräftiger, differenzierender Tests minimiert werden kann, mag das Erfassen atypischer *E. faecium*-Isolate innerhalb eines solchen standardisierten Testverfahrens nicht immer gelingen. Diese beiden Aspekte könnten erklären, weshalb 46 via PCR als *E. faecium* identifizierte Stämme mittels API nicht eindeutig als solche erkannt wurden.

Hamilton-Miller und Shah untersuchten 28 Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate mittels verschiedener Testsysteme, darunter auch das API rapid ID 32 Strep-Kit. Mit Hilfe dieses Kits konnten nur 7 % (n=2) der Stämme eindeutig als *E. faecium* identifiziert werden. In vielen Fällen erfolgte eine Identifizierung als *E. casseliflavus* oder *E. gallinarum*, bzw. wurde die Zugehörigkeit zu diesen Spezies als am wahrscheinlichsten angegeben. Hamilton-Miller und Shah kamen zu dem Schluss, dass das API-Kit für eine Identifizierung von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen ungeeignet sei (Hamilton-Miller und Shah 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse (siehe Punkt 3.2) zeigen ähnlich wie die von Hamilton-Miller und Shah, dass, wenn auf eine andere Spezies verwiesen wurde, dies *E. gallinarum* war (keine Berücksichtigung angegebener Taxa bei zweifelhaften und unzulässigen Profilen). Allerdings konnten – im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hamilton-Miller und Shah – 74,3 % der untersuchten VRE-Stämme als *E. faecium* identifiziert werden. Zählt man die Identifizierungen auf Genusebene, bei denen als wahrscheinlichstes Taxon *E. faecium* angegeben wurde, hinzu, waren es sogar 87,7 % (n=157). Dies zeigt zwar, dass es Isolate gibt, bei denen eine Identifizierung nicht möglich ist und Missidentifizierungen auftreten können, was Zusatztests oder weitere bzw. andere Untersuchungen, eventuell mittels PCR, nötig macht; lässt aber den Einsatz des API-Testkits zur Identifizierung von *E. faecium* nicht unbedingt ungeeignet erscheinen. Erwähnt sei noch, dass eine Überprüfung der mit ausgezeichneten bis guten Identifizierungsergebnissen bestimmten *E. faecium*-Isolate mittels PCR ausblieb. Das Ergebnis des API rapid ID 32 Strep-Kits und die der vorläufigen Speziesidentifizierung bzw. früherer Untersuchungen genügten in diesen Fällen. Auch die später durchgeführten weiterführenden Untersuchungen gaben keinen Grund zur Annahme, dass es sich um Missidentifikationen handeln könnte, auch wenn dieses Risiko nicht durch eine Speziesidentifizierung mittels PCR minimiert wurde.

Untersuchungen von Freney et al. befassen sich ebenfalls mit dem Einsatz des API rapid ID 32 Strep-Kits. Sie konnten mit dessen Hilfe 100 % zuvor mittels konventio-

neller Methoden bestimmter *E. faecium*-Isolate (n=12) als solche identifizieren (Freney et al. 1992).

Auch wenn Untersuchungen zum Einsatz des API rapid ID 32 Strep-Kits bei *E. faecium* teilweise recht unterschiedlich ausfallen, wird es häufig zur Identifizierung dieser Spezies eingesetzt (Borgmann et al. 2007, Chuang et al. 2010, Naas et al. 2005).

Abschließend ist anzumerken, dass die Auswertung der Testergebnisse, insofern sie visuell erfolgt, ein Stück weit von Beurteilung und Erfahrung des Auswertenden abhängt und diese subjektive Komponente das Identifizierungsergebnis beeinflussen kann. Dies kann einzelne schlechte Identifikationsergebnisse bzw. Missidentifikationen von *E. faecium*-Isolaten erklären, liefert jedoch sicher nicht die Erklärung für die allgemeine Identifikationsproblematik von *E. faecium* mittels standardisierter biochemischer Testverfahren, wie z. B. API rapid ID 32 Strep, und anderer Methoden.

4.2 In vitro-Antibiotika-Empfindlichkeitstests der *E. faecium*-Isolate

.... „Gegen alle Chemotherapeutika, die gegen Enterokokken eingesetzt wurden, haben diese Bakterien Resistenzen entwickelt [...].“ (Werner et al. 2008a). Diese Aussage wurde für die in dieser Arbeit getesteten Antibiotika bestätigt.

Während die Resistenzsituation gegen einige Antibiotika noch als recht günstig zu bewerten ist und nur einzelne Isolate Resistenzen aufweisen (Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin), gestaltet sich die Resistenzlage gegen andere Antibiotika ungünstig (Ampicillin, Erythromycin, Levofloxacin, Rifampicin). Die Ergebnisse bestätigen das Vorliegen einer bei *E. faecium* oft zu beobachtenden Multiresistenz und eines großen Reservoirs erworbener Antibiotika-Resistenzen. Dies begünstigt eine Verbreitung unter Antibiotika-Selektionsdruck (Klare et al. 2003, Werner et al. 2008a).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung machen darüber hinaus deutlich, dass bei Indikation einer Therapie das Spektrum an Therapieoptionen stark eingeschränkt ist.

Getestet wurde eine Auswahl an Antibiotika, die gegen Enterokokken wirksam sind (siehe Punkt 2.2.5 und 3.3).

Die Daten dieser Arbeit sowie der verschiedenen Surveillance-Systeme und Studien, die zum Vergleich einbezogen wurden, unterscheiden sich teilweise bezüglich der

Herkunft bzw. Art der untersuchten Isolate (z. B. Infektions-/Besiedlungsisolate) sowie der zur Empfindlichkeitstestung genutzten Methoden und Grenzwerte.

4.2.1 Ampicillin

Alle 179 untersuchten *E. faecium*-Isolate erwiesen sich im *in vitro*-Empfindlichkeitstest als resistent gegen Ampicillin. Die erworbene Ampicillin-Resistenz ist ein wichtiges Merkmal Hospital-assoziiertes *E. faecium*-Stämme, die meist dem klonalen Komplex 17 angehören (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2005). Verschiedene Studien im Rahmen der Antibiotika-Resistenz-Überwachung zeigen, dass die Resistenzrate klinischer *E. faecium*-Isolate für Ampicillin bei circa 90 % liegt (PEG: PEG-Studie 2004/2007, RKI: Antibiotika-Resistenz-Surveillance ARS 2008-2010). Das Epidemiologische Bulletin gibt bezugnehmend auf Einsendungen an das RKI von 2006 bis 2009 eine *in vitro*-Ampicillin-Resistenzhäufigkeit von > 98 % für Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate (*vanA*-, *vanB*-Typ) an (RKI 2010). Klare et al., die Besiedlungs- und Infektionsisolate der Spezies *E. faecium* (n=19) von Patienten verschiedener deutscher Kliniken untersuchten, identifizierten alle Isolate als *in vitro*-resistent gegen Ampicillin (Klare et al. 2005 – Tabelle 1 A). Leavis et al. untersuchten *E. faecium*-Stämme unterschiedlicher Herkunft. Während nur 3 % der 36 Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Surveillance-Isolate gesunder Menschen Ampicillin-resistent waren, zeigten sich 31 % von 36 Vancomycin-resistenten Surveillance-Isolaten hospitalisierter Menschen, 65 % von 20 VRE-Infektionsisolaten und 94 % von 16 epidemischen, das heißt im Rahmen eines Ausbruchs isolierten, Vancomycin-resistenten Stämmen Ampicillin-resistent (Leavis et al. 2003).

Dies lässt erste Rückschlüsse auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämme zu. Die *in vitro* nachgewiesene Ampicillin-Resistenz spricht dafür, dass es sich bei diesen Isolaten um Hospital-assoziierte Stämme handelt und nicht etwa um Besiedlungsisolate gesunder Menschen, die bereits bei der Aufnahme in das Krankenhaus kolonisiert sind.

Bezüglich bestehender Therapieoptionen wird schon jetzt deutlich, dass die herkömmliche Standardtherapie bei Enterokokken-Infektionen im Falle der untersuchten *E. faecium*-Stämme versagt: Da alle Isolate resistent gegen Ampicillin sind, ist der sinnvolle Einsatz einer Ampicillin-Aminoglycosid-Kombination nicht mehr möglich. Diese synergistisch wirkende Kombination ist bakterizid, versagt allerdings schon beim Vorliegen einer Resistenz (*high level*-Resistenz im Falle des Aminoglycosids)

gegen einen von beiden Kombinationspartnern (Murray 1990a, RKI 2010), weshalb in einem solchen Fall auf den Einsatz dieser Antibiotika-Kombination verzichtet werden sollte. Darüberhinaus ist eine Vielzahl der untersuchten Isolate zusätzlich *high level*-resistent gegen das Aminoglycosid Gentamicin (siehe Punkt 4.2.4).

4.2.2 Doxycyclin

Die PEG-Studien von 2001 und 2004 dokumentieren für *E. faecium* (n=110, bzw. n=193) eine *in vitro*-Resistenzhäufigkeit von 28,2 %, bzw. 14,5 %. 9,1 %, bzw. 10,4 %, der Stämme waren intermediär-empfindlich (PEG: PEG-Studie 2001/2004). Neuere Zahlen flächendeckender Studien stehen leider nicht zur Verfügung. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Zahlen bezüglich der Doxycyclin-Empfindlichkeit der untersuchten *E. faecium*-Isolate liegen deutlich unter den Werten der erwähnten PEG-Studien: 3,4 % der Isolate zeigten sich *in vitro* resistent, 3,9 % intermediär-empfindlich. Dies spricht für eine relativ günstige Resistenzsituation.

4.2.3 Erythromycin

98,3 % der untersuchten *E. faecium*-Isolate erschienen im *in vitro*-Empfindlichkeitstest resistent gegen Erythromycin. Klare et al. untersuchten 19 *E. faecium*-Isolate – Besiedlungs- und Infektionsisolate von Patienten verschiedener deutscher Kliniken – und kamen zu ähnlich ungünstigen Ergebnissen: 100 % dieser Stämme zeigten sich *in vitro* resistent gegen Erythromycin (Klare et al. 2005 – Tabelle 1A). Eine weitere Studie dokumentiert für *vanA* (n=490)- und *vanB* (n=404)-positive *E. faecium*-Stämme aus deutschen Kliniken, die zwischen 2008 und 2010 an das RKI gesandt wurden, Resistenzhäufigkeiten von 93-99 % (Klare et al. 2011).

4.2.4 Gentamicin

Die Isolate wurden im Hinblick auf das Vorliegen einer *high level*-Resistenz getestet, da die *low level*-Aminoglycosid-Resistenz zu den intrinsischen Resistenzen der Enterokokken zählt. Die Aminoglycosid-*high level*-Resistenz gehört zur Gruppe der erworbenen Resistenzen (Murray 1990a, Werner et al. 2008a). In dieser Arbeit wurde allein das Aminoglycosid Gentamicin getestet. Bezüglich des Resistenzverhaltens der untersuchten Isolate gegenüber anderen Aminoglycosiden können keine verbindlichen Aussagen getroffen werden. Unterschiedliche Resistenzmechanismen und

Substratprofile Aminoglycosid-inaktivierender Enzyme sind hierfür verantwortlich (Geisel et al. 2004/2005, Murray 1990a).

Bezüglich der Werte, die flächendeckende repräsentative Antibiotika-Überwachungssysteme die Gentamicin-Hochresistenz in *E. faecium* betreffend dokumentieren, liegt die Rate resistenter Isolate, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, im mittleren Bereich. Hier zeigten sich 25,7 % der Stämme *in vitro high level*-resistent gegen Gentamicin. Die PEG-Studien geben Resistenzraten zwischen 32,1 und 35,2 % an, ARS für 2008-2010 Resistenzhäufigkeiten zwischen 45,9 und 49,6 % (PEG: PEG-Studie 2004/2007, RKI: Antibiotika-Resistenz-Surveillance ARS 2008-2010). Das Epidemiologische Bulletin dokumentiert für *E. faecium*-Isolate, die an das RKI gesandt wurden, folgende Resistenzhäufigkeiten: Während 2006/2007 13,6 % der *E. faecium*-Isolate *in vitro high level*-resistent gegen Gentamicin waren, waren es 2008/2009 42,9 %. Der Grund für den vermeintlichen Resistenzanstieg zwischen den zwei Untersuchungszeiträumen könnte in methodischen Unterschieden zu finden sein, da unterschiedliche MHK-Breakpoints zur Auswertung verwendet wurden (RKI 2010). Klare et al., die Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate (*vanA* n=490, *vanB* n=404) verschiedener deutscher Kliniken aus 2008-2010 untersuchten, ermittelten Gentamicin-Resistenzhäufigkeiten zwischen 39,7 und 56,9 % (Klare et al. 2011).

Laut Werner et al. tritt die Aminoglycosid-*high level*-Resistenz gehäuft bei Hospital-assoziierten *E. faecium*-Isolaten auf (Werner et al. 2008a). Daten des EARS-Net identifizieren ≥ 35 % der aus Blutkultur isolierten und aus Deutschland stammenden *E. faecium*-Stämme als hochresistent gegen Gentamicin (ECDC 2009).

Bezüglich bestehender Therapieoptionen bei Enterokokkeninfektionen ist das Auftreten Gentamicin-hochresistenter *E. faecium*-Stämme als problematisch zu bewerten (siehe Punkt 4.2.1).

4.2.5 Levofloxacin

ARS dokumentiert für klinische Isolate der Spezies *E. faecium* bezüglich Levofloxacin Resistenzraten zwischen 85 und 88 % für 2008-2010 (RKI: Antibiotika-Resistenz-Surveillance ARS 2008-2010). Die Resistenzsituation unter den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *E. faecium*-Isolaten gestaltet sich noch ungünstiger: 100 % dieser Stämme sind *in vitro* resistent gegen Levofloxacin.

Laut Leavis et al. scheint eine Assoziation zwischen der Fluorchinolon-Hochresistenz und Hospital-assoziierten *E. faecium*-Stämmen zu bestehen. Diese Untersuchungen beziehen sich allerdings auf Ciprofloxacin (Leavis et al. 2006, RKI 2010).

4.2.6 Nitrofurantoin

Der Einsatz von Nitrofurantoin als Therapeutikum ist umstritten, nicht nur wegen eventuell auch an eukaryontischen Zellen auftretender mutagener und genotoxischer Effekte (Kroker et al. 2002), sondern auch aufgrund weiterer schwerer Nebenwirkungen, unter anderem an Lunge und Leber (Amit et al. 2002, Goemaere et al. 2008, Wichelhaus 2004/2005). Aufgrund pharmakokinetischer Eigenschaften des Nitrofurantoins werden therapeutisch wirksame Konzentrationen in Gewebe und Serum nicht erreicht, wohl aber im Urin (Kroker et al. 2002, Wichelhaus 2004/2005). Daher kann Nitrofurantoin bei durch VRE verursachten Harnwegsinfektionen und Zystitiden eingesetzt werden (Heintz et al. 2010, Linden 2002, Swaminathan und Alangaden 2010, Wichelhaus 2004/2005).

48 % der untersuchten *E. faecium*-Stämme erschienen *in vitro* resistent gegen Nitrofurantoin. Angaben vergleichbarer Untersuchungen oder flächendeckender Studien zur Resistenzsituation bezüglich Nitrofurantoin in *E. faecium* für Deutschland waren leider nicht zu finden.

4.2.7 Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid und Tigecyclin

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sogar einige der untersuchten *E. faecium*-Isolate gegen die erst kürzlich auf den Markt gekommenen und als Reserve-Antibiotika eingesetzten Wirkstoffe Daptomycin (1,1 %), Linezolid (1,7 %) und Tigecyclin (0,6 %) *in vitro* resistent sind, auch wenn die Resistenzsituation unter den untersuchten Stämmen insgesamt noch als recht günstig zu bewerten ist. Repräsentative Antibiotika-Überwachungssysteme sowie zu dieser Thematik durchgeführte Studien und Fallberichte kommen zu ähnlichen Ergebnissen.

Flächendeckende Studien, wie die der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e. V. und das Antibiotika-Resistenz-Überwachungssystem ARS des RKI, dokumentieren ähnlich niedrige Linezolid-Resistenzraten für klinische *E. faecium*-Stämme (Daten zu Daptomycin und Tigecyclin sind leider nicht abrufbar). Laut ARS lag die Resistenzhäufigkeit für Linezolid in den Jahren 2008-2010 bei ≤ 1 %, laut PEG-

Studien bei $\leq 1,6$ % (PEG: PEG-Studie 2004/2007, RKI: Antibiotika-Resistenz-Surveillance ARS 2008-2010). Das Epidemiologische Bulletin gibt, bezugnehmend auf Einsendungen an das RKI von 2006 bis 2009, eine *in vitro*-Linezolid-Resistenzhäufigkeit von $\leq 0,7$ % für Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate an (RKI 2010). Klare et al. untersuchten *vanA*- und *vanB*-positive *E. faecium*-Isolate (n=894) aus verschiedenen deutschen Kliniken. Sie dokumentierten für die Jahre 2008-2010 Resistenzraten für Linezolid von $\leq 0,7$ %, mit einer Ausnahme: 2010 lag der Anteil Linezolid-resistenter *vanA*-positiver Stämme bei 4,2 % (Klare et al. 2011). Die Resistenzsituation gegen Linezolid sieht also noch sehr günstig aus, auch wenn es seit dem Bericht über das erste Auftreten Linezolid-resistenter VRE in Deutschland 2002 (Halle et al. 2004) unter Linezolid-Therapie immer wieder zur Selektion von Linezolid-resistenten Enterokokken-Stämmen kommt (Klare et al. 2005, Seedat et al. 2006) und Untersuchungen von Klare et al. für eine nosokomiale Übertragung Linezolid-resistenter Stämme sprechen (Klare et al. 2005; Herrero et al. 2002 und Rahim et al. 2003 berichteten über mehrere Fälle nosokomialer Übertragung Linezolid-resistenter Stämme außerhalb Deutschlands). Dies widerspricht dem Trend, den Untersuchungen von Raad et al. aufzeigten: Hier kam es innerhalb von sechs Monaten nach dem klinischen Einsatz von Linezolid zu einer Abnahme der *in vitro*-Empfindlichkeit Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme von 100 % auf 83 % (Raad et al. 2004).

Bezüglich Tigecyclin dokumentiert das Epidemiologische Bulletin für die zwischen 2006 und 2009 ans RKI gesandten und untersuchten klinischen Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate eine Resistenzrate von 0 % (RKI 2010). Kresken et al. führten zwei deutschlandweite Studien (German Tigecycline Evaluation Surveillance Trial-Programm, G.-T.E.S.T I und II) durch, eine vor der Einführung von Tigecyclin 2005 und eine 2007, ein Jahr nachdem Tigecyclin in deutschen Kliniken zum Einsatz kam. Keines der untersuchten klinischen *E. faecium*-Isolate erwies sich *in vitro* resistent gegen Tigecyclin (Kresken et al. 2009). Klare et al. hingegen, die Vancomycin-resistente klinische *E. faecium*-Isolate (n=894) untersuchten, die 2008-2010 an das RKI gesandt wurden, konnten Tigecyclin-resistente *E. faecium*-Stämme identifizieren. Die Raten lagen hier bei $\leq 2,1$ % (Klare et al. 2011).

Bezüglich Daptomycin sind Daten deutscher flächendeckender repräsentativer Antibiotika-Überwachungs-Studien rar. Die eben erwähnte Studie von Klare et al. dokumentiert Daptomycin betreffend eine Resistenzhäufigkeit von 0 % (Klare et al.

2011). Weltweit wurden allerdings Einzelfälle Daptomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme beschrieben (Fraher et al. 2007, Long et al. 2005).

4.2.8 Rifampicin

Die bezüglich des Ansamycins Rifampicin für die in dieser Arbeit untersuchten *E. faecium*-Isolate ermittelte Resistenzhäufigkeit von 95 % entspricht in etwa den Resistenzraten (86-95 %), die das Epidemiologische Bulletin für RKI-Einsendungen von *E. faecium*-Isolaten des *vanA*- und *vanB*-Typs in den Jahren 2006-2009 dokumentiert, auch wenn der Prozentsatz Rifampicin-resistenter *E. faecium*-Isolate des *vanB*-Typs mit 85,6 % in den Jahren 2006/2007 deutlich niedriger liegt (RKI 2010). Bei Klare et al., die 19 *E. faecium*-Isolate von Patienten verschiedener deutscher Krankenhäuser untersuchten, lag die Resistenzhäufigkeit mit 78,9 % (n=15) ebenfalls unterhalb der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte (Klare et al. 2005 – Tabelle 1 A). In einer weiteren Studie von Klare et al., bei der man 490 *vanA*- und 404 *vanB*-positive klinische *E. faecium*-Isolate, die zwischen 2008 und 2010 an das RKI geschickt wurden, untersuchte, lagen die ermittelten Resistenzhäufigkeiten bei > 90 % (Klare et al. 2011). Mit Resistenzraten > 85 %, häufig sogar > 95 %, so wie auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten, ist die Resistenzsituation gegen Rifampicin als ungünstig zu bewerten.

4.3 Vancomycin- und Teicoplanin-Resistenz der *E. faecium*-Isolate

Um Aussagen über eine vorliegende Vancomycin- und eventuell Teicoplanin-Resistenz bei den zu untersuchenden *E. faecium*-Isolaten treffen zu können, wurde der Resistenztyp sowohl phänotypisch als auch genotypisch bestimmt (siehe Punkt 3.4).

4.3.1 Phäno- und genotypische Glycopeptid-Resistenz-Bestimmung

Die Vancomycin-Resistenz der untersuchten Stämme ist *in vitro* unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Isolate zeigten gegenüber Vancomycin MHK-Werte von 8 bis ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$. Dies hängt einmal von dem der Glycopeptid-Resistenz zugrunde liegenden Genotyp ab. Während Stämme mit *vanA*-Gencluster *in vitro* oft recht hohe MHK-Werte gegen Vancomycin zeigen ($\text{MHK}_{\text{Vancomycin}}$ 16-1000 $\mu\text{g/ml}$), liegen die MHK-Werte *vanB*-positiver Stämme meist einige Stufen darunter ($\text{MHK}_{\text{Vancomycin}}$ 2-32 (-1000) $\mu\text{g/ml}$). Unterschiede in der Resistenzausprägung bestehen aber nicht nur zwischen verschiedenen Genotypen, sondern auch innerhalb eines Genotyps, vor

allem des *vanB*-Genotyps, können verschiedene Ausprägungen auftreten. Werner et al. untersuchten *vanB*-positive *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme (n=174) bezüglich ihrer *in vitro*-MHK-Werte gegenüber Vancomycin. Nur 28,2 % dieser Isolate zeigten MHK-Werte $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ (Werner et al. 2007) und wären damit nach den in dieser Arbeit genutzten CLSI-Breakpoints als Vancomycin-resistent eingestuft worden. Die übrigen 71,8 % *vanB*-positiver Stämme mit MHK-Werten von ≤ 1 bis $< 32 \mu\text{g/ml}$ (Werner et al. 2007) wären somit überhaupt nicht als solche erkannt worden. Man kann dieser Untersuchung zwei wichtige Aussagen entnehmen. Einmal zeigt sie, dass bei Stämmen des *vanB*-Genotyps Vancomycin-MHK-Werte von $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ bis $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ möglich sind. Desweiteren unterstreicht sie die Schwierigkeit, *vanB*-Stämme phänotypisch als solche zu erkennen. Die Rate falsch-negativer Identifizierungen kann somit zuweilen recht hoch sein. Auch bei 1,7 % (n=3) der im Rahmen dieser Arbeit isolierten und untersuchten *E. faecium*-Stämme konnte das *vanB*-Gen nachgewiesen werden, obwohl sie aufgrund der phänotypischen Resistenzbestimmung nicht zu den Vancomycin-resistenten Enterokokken zählen. Sie zeigten bezüglich Vancomycin MHK-Werte von 8 bzw. 12 $\mu\text{g/ml}$ und wurden demnach als intermediär-empfindlich eingestuft. Erst weiterführende Untersuchungen detektierten das *vanB*-Gencluster. Diese Stämme wären ohne die Anwendung molekularer Methoden unentdeckt geblieben. Wie hoch die Anzahl unentdeckter *vanB*-positiver, per definitionem aber Vancomycin-intermediär-empfindlicher, bzw. -sensibler *E. faecium*-Stämme an dem in dieser Arbeit beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus und anderen Einrichtungen wirklich ist, ist in den meisten Fällen unbekannt. Findet eine Vorselektion statt (z. B. Anzuchtung auf mit Vancomycin angereicherten Nährböden, Bestimmung des Genotyps allein bei phänotypisch Vancomycin-resistenten Isolaten), ist davon auszugehen, dass ein unbekannter Anteil von VanB-Typ *E. faecium* undetektiert bleibt und die reale Rate *vanB*-positiver *E. faecium*-Stämme um einiges höher liegt. Die aus den Ergebnissen von auf PCR basierenden Screeningmethoden im Vergleich zu phänotypischen Assays abgeleitete, vergleichbar hohe Falsch-Positiv-Rate für die Vorhersage „VanB“ stellt einen wichtigen Indikator für den vermeintlichen hohen Anteil von nicht-diagnostizierten VanB-VRE mit niedrigen Vancomycin-MHK dar (Ballard et al. 2005b, Stamper et al. 2007, Young et al. 2007).

Desweiteren zeigten 5,0 % (n=9) der untersuchten Stämme *in vitro* einen VanB-Phänotyp, das heißt, sie waren per definitionem Teicoplanin-sensibel, bei den detek-

tierten Resistenzgenen handelte es sich aber um das *vanA*-Gencluster. Das Auftreten solcher Stämme wurde bereits beschrieben (Eom et al. 2004, Lauderdale et al. 2002, Song et al. 2006, Werner et al. 2007). Einen ersten Hinweis hierauf gaben die für *vanB*-Stämme unüblich hohen MHK-Werte (4-8 µg/ml) gegen Teicoplanin (Werner et al. 2007).

Weitere 7,8 % (n=14) der *E. faecium*-Stämme erschienen trotz des *vanA*-Genotyps *in vitro* phänotypisch Teicoplanin-intermediär-empfindlich.

Abgesehen von diesen Fällen konnte bei 85,5 % (n=153) der 179 untersuchten *E. faecium*-Stämme der vom Phänotyp des jeweiligen Isolates abgeleitete Genotyp bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, wenn *vanA*- bzw. *vanB*-Stämme als Vancomycin-resistent erkannt worden sind, eine Bestimmung des zugrunde liegenden Genotyps anhand des Phänotyps in den meisten Fällen möglich war. Sicherheit brachte allerdings erst der molekulare Nachweis der verantwortlichen Resistenzgene.

Anbei sei erwähnt, dass die klinischen EUCAST-Breakpoints zur Interpretation der MHK-Werte von Vancomycin und Teicoplanin bei Enterokokken 2010 geändert wurden, um den genannten Schwierigkeiten entgegenzutreten und die Ergebnisse der phänotypischen Resistenzbestimmung zu optimieren (Vancomycin-resistent > 4 mg/l, Vancomycin-sensibel ≤ 4 mg/l, Teicoplanin-resistent > 2 mg/l, Teicoplanin-sensibel ≤ 2 mg/l; RKI 2010). Verwendet man diese modifizierten Grenzwerte anstelle der bisher Genutzten, ist eine korrekte Bestimmung des Genotyps anhand des Phänotyps in 100 % der hier untersuchten Fälle möglich.

4.3.2 Epidemiologie der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten

2003/2004 kam es zu einem Anstieg der Häufigkeit Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme in deutschen Krankenhäusern (ECDC 2008 und 2009, Fahr et al. 2004, PEG: PEG-Studie 2001/2004/2007, RKI 2008). 2005 erhöhte sich die VRE-Prävalenz auch an dem in dieser Arbeit beschriebenen Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland. Während in anderen deutschen Kliniken überwiegend der *vanA*-Resistenztyp anzutreffen ist und erst in den letzten Jahren ein Anstieg der *vanB*-kodierte Resistenz zu beobachten ist (Klare et al. 2011, RKI 2010; siehe unten), dominiert hier bereits seit 2005 der *vanB*-Resistenztyp. Der Anteil

vanB-positiver Isolate unter den untersuchten *E. faecium*-Stämmen lag für die Jahre 2005-2010 bei 78,8 % und erreichte 2005 seinen bisherigen Höchstwert von 92,7 %. Diese vergleichbar hohen Raten *vanB*-positiver *E. faecium*-Stämme stehen somit im Gegensatz zu anderen deutschen Studien. Beispielsweise seien hier Angaben zu Einsendungen an das Robert Koch-Institut aus den Jahren 2006-2009 erwähnt. In den Jahren 2006-2008 lag der Anteil von *E. faecium*-Isolaten des VanA-Typs mit 82,5 % (n=249), 73,9 % (n=184) und 68,1 % (n=203) deutlich über dem der *E. faecium*-Isolate des VanB-Typs (17,5 %, n= 53; 26,1 %, n= 65; 31,9 %, n= 95). 2009 lag der Anteil der VanB-Typ *E. faecium*-Stämme bei 52,5 % (n=157), der von Isolaten des VanA-Typs bei 47,5 % (n=142; die Prozent-Angaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der in dem jeweiligen Jahr an das RKI gesendeten *E. faecium*-Isolate des VanA- und VanB-Typs; RKI 2008 und 2010).

Die naheliegendste Erklärung für die außergewöhnlich hohe *vanB*-Rate an der beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung wäre wohl, dass dieser die klonale Ausbreitung einzelner *vanB*-positiver *E. faecium*-Stämme zugrunde liegt, was bedeuten würde, dass neben den *vanA*-positiven Stämmen eine Subpopulation eng verwandter *vanB*-Stämme existiert. Allerdings widersprechen die Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese und die des *Multi Locus Sequence Typings* dieser These: Die *vanB*-positiven Stämme stellen sich in der PFGE insgesamt nicht als besonders eng verwandt sowie abgrenzbar zu den *vanA*-Stämmen dar und gehören zudem verschiedenen MLST-Sequenztypen an. Die Ergebnisse lassen vielmehr ein polyklonales Geschehen vermuten (siehe Punkt 4.6). Das Vorliegen einer polyklonalen Population hauptsächlich *vanB*-positiver *E. faecium*-Stämme, sowie der Nachweis verschiedener Resistenzgene (*vanA/vanB*) bei genetisch eng verwandten Stämmen (siehe Punkt 3.8) sprechen dafür, dass neben einer vertikalen Ausbreitung¹ von *vanB*-Stämmen auch ein horizontaler Transfer² des *van(B)*-Genclusters unter *E. faecium*-Stämmen besteht.

Dies entspricht Beobachtungen anderer Autoren und ist Grundlage des derzeit favorisierten Modells zur Entstehung und Ausbreitung Hospital-assoziiertes Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme. Demnach breiten sich zunächst Vancomycin-

¹ Die vertikale Ausbreitung erfolgt durch ungeschlechtliche Zweiteilung der Bakterienzelle, wobei aus einer Mutterzelle erbgleiche Tochterzellen entstehen, die dann – inklusive all ihrer Gene – von Patient zu Patient übertragen werden können (Valentin-Weigand 2011a).

² Der horizontale Gentransfer findet in Form von Transformation, Transduktion und Konjugation statt. Hierbei können genetische Informationen (z. B. Resistenzgene) zwischen Bakterienzellen innerhalb eines Patienten ausgetauscht werden (Valentin-Weigand 2011b und 2011c).

sensible Stämme des klonalen Komplex 17, die meist Ampicillin-resistent sind, sowie die Virulenzfaktoren *esp* und *hyl* besitzen, im Krankenhaus aus und erwerben erst später die Determinanten für Glycopeptid-Resistenz, wodurch sie auffällig werden (Kawalec et al. 2000 und 2001, Klare et al. 2005, Leavis et al. 2003, Rice et al. 2003, Suppola et al. 1999, Werner et al. 2008a, Willems et al. 2001 und 2005). Voraussetzung hierfür ist die Möglichkeit des horizontalen Transfers der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten. Von Werner et al. diesbezüglich durchgeführte Studien, sowie Untersuchungen von Kawalec, Leavis and Willems et al., sprechen – neben einem vertikalen Transfer und somit einer klonalen Ausbreitung – für die Existenz einer solchen horizontalen Ausbreitung der Resistenzgene (Kawalec et al. 2000 und 2001, Leavis et al. 2003, Werner et al. 2007, Willems et al. 2005). Während die Ergebnisse dieser Arbeit Letzteres vermuten lassen, bestätigen sie das Modell zur Entstehung Vancomycin-resistenter Enterokokken nicht zwingend. Natürlich ist es durchaus vorstellbar, dass zuvor Vancomycin-sensible Isolate, die sich bei Patienten der in dieser Arbeit beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung ausgebreitet haben, Glycopeptid-Resistenz-Determinanten aufnehmen und somit Vancomycin-resistent und auffällig werden. Handelt es sich bei den Vancomycin-sensiblen Stämmen um eng verwandte Isolate und um unterschiedliche Glycopeptid-Resistenz-Determinanten (*vanA/vanB*), könnte dies das oben beschriebene Auftreten unterschiedlicher *van*-Gene innerhalb eines PFGE-Clusters genetisch eng verwandter Isolate erklären. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass nach Ausbreitung Vancomycin-resistenter Stämme zuvor *vanB*-positive *E. faecium*-Isolate durch Aufnahme des *vanA*-Genclusters und Verlust des *vanB*-Gens und umgekehrt, ihren *van*-Genotyp wechseln. Dies wurde bereits bei Woodford et al. beschrieben (Woodford et al. 1997) und könnte ebenfalls erklären, weshalb genetisch eng verwandte Isolate verschiedene *van*-Gene tragen. Welches Szenario für den hier vorliegenden Sachverhalt letztlich verantwortlich ist, bleibt ungeklärt.

Auch wenn der horizontale Transfer von Resistenz-Determinanten, zusätzlich zu einer klonalen Ausbreitung Glycopeptid-resistenter *E. faecium*-Stämme, zu der VRE-Prävalenz an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus beitragen könnte, stellt sich dennoch die Frage, weshalb hier im Gegensatz zu anderen deutschen Kliniken der *vanB*-Resistenztyp dominiert. Denn während das *vanB*-Gencluster üblicherweise chromosomal kodiert und nur selten übertragbar ist (Carias et al. 1998,

Quintiliani und Courvalin 1996, Rice et al. 1998), werden die meisten der *vanA*-Resistenz-Determinanten über konjugative Plasmide übertragen (Werner et al. 1997 und 1999).

Die Lokalisation des *vanB*-Genclusters bei den untersuchten Isolaten sowie die Identifizierung und Charakterisierung der die Glycopeptid-Resistenz vermittelnden chromosomalen Elemente, sowie im Falle einer plasmidalen Lage die Typisierung der Plasmide, könnten dem Verständnis der VRE-Situation an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus dienen. Ein Einbau in konjugative Plasmide bzw. chromosomale Elemente und eine damit verbundene bessere Übertragbarkeit des *vanB*-Gens könnten zu den hohen Raten *vanB*-positiver *E. faecium* beitragen. Die Identifizierung der vorliegenden Subtypen des *vanB*-Ligase-Gens würde bezüglich der *vanB*-kodierte Vancomycin-Resistenz eventuell vorsichtige Schlüsse auf eine gemeinsame oder verschiedene Quellen zulassen.

Abgesehen von bzw. zusätzlich zu genetischen Begebenheiten könnte auch eine (unbewusste) Selektion *vanB*-positiver Stämme vorliegen und somit zum hohen *vanB*-Anteil beitragen. Während Teicoplanin *vanA*-positive *E. faecium*-Stämme selektiert, kommt es durch die Anwendung von Vancomycin zur Selektion von *vanA*- und *vanB*-positiven Stämmen (Klare et al. 2005). Eine Selektion *vanB*-positiver Stämme durch den Einsatz dieser Antibiotika ist also nicht möglich. Eventuell besteht ein genetischer Link zwischen *vanB*-Resistenz-Determinanten und Resistenzgenen eines anderen Antibiotikums (siehe Punkt 4.8, Tylosin), sodass es zu einer unbewussten Selektion *vanB*-positiver Stämme kommen kann. Die Lokalisation des *vanB*-Gens, sowie die Charakterisierung eventuell vorliegender übertragbarer Elemente könnten hier erste Anhaltspunkte liefern.

Die Frage der Herkunft und Ausbreitung der *van*-Gene wird nicht zu klären sein. Hierzu ist ihr Vorkommen zu ubiquitär. Man findet sie nicht nur in verschiedenen Enterokokkenspezies bei Mensch und Tier global verbreitet (Werner et al. 2008b; siehe auch Punkt 1.2.8, 1.2.9 und 4.8), sondern es scheinen auch Reservoirs der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten *vanA* und *vanB* außerhalb der Enterokokken zu existieren (Ballard et al. 2005a und 2005b, Domingo et al. 2005, Guardabassi et al. 2004 und 2005, Guardabassi und Agersø 2006, Stinear et al. 2001).

4.4 Nachweis des *esp*-Gens in *E. faecium*

Das im Chromosom lokalisierte *esp*-Gen kodiert ein Enterokokken-Oberflächen-Protein (*enterococcal surface protein*), das eine Rolle bei der Adhäsion an Epithelzellen und der Bildung eines Biofilms zu spielen scheint (Heikens et al. 2007, Lund und Edlund 2003, Shankar et al. 2001, Toledo-Arana et al. 2001). Der horizontale Transfer per Konjugation wurde beschrieben (Oancea et al. 2004).

Das *esp*-Gen wurde zuerst in *E. faecalis* detektiert. Das gehäufte Vorkommen von *esp* bei Infektionsisolaten von *E. faecalis* im Gegensatz zu Isolaten gesunder Individuen ließ Shankar et al. vermuten, dass der Besitz von *esp* mit einer erhöhten Virulenz assoziiert ist (Shankar et al. 1999). Creti et al. wiesen das *esp*-Gen nicht nur in Infektionsisolaten, sondern auch in 20 % der Isolate gesunder Menschen und 50 % aus der Umwelt stammender *E. faecalis* nach (Creti et al. 2004). *Esp* scheint also in *E. faecalis* ubiquitär vorzukommen (siehe auch Werner et al. 2008a). Dies scheint der von Shankar et al. vermuteten Assoziation mit einem etwaigen Virulenzeffekt zunächst zu widersprechen. Allerdings besitzt *E. faecalis* im Vergleich zu *E. faecium* ein höheres Virulenzpotential (Werner et al. 2008a). Das ubiquitäre Vorkommen von *esp* in *E. faecalis* könnte dazu beitragen. Weiterhin könnte es dafür sprechen, dass *esp* eine Rolle bei der Ausbreitung epidemischer Stämme spielt (Eaton und Gasson 2002).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *E. faecalis*-Isolat ist ebenfalls *esp*-positiv. Es wurde aus dem Urin einer Patientin isoliert. Shankar et al. führten Untersuchungen zur Pathogenese aufsteigender Harnwegsinfektionen verursacht von *E. faecalis* durch. In solchen Stämmen ist das *esp*-Gen häufiger zu finden, als beispielsweise in fäkalen Isolaten. Die Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass dieses Oberflächen-Protein die Kolonisation und Persistenz des Erregers begünstigt (Shankar et al. 2001).

Später wurde das *esp*-Gen auch in *E. faecium* entdeckt (Baldassarri et al. 2001, Coque et al. 2002, Eaton und Gasson 2002, Klare et al. 2005, Willems et al. 2001). Willems et al. untersuchten humane epidemische und nicht-epidemische sowie animale Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate unterschiedlicher geographischer Herkunft auf das Vorhandensein des *esp*-Gens. Während dieses in 95,8 % der epidemischen Isolate (n=120) detektiert wurde, konnte man es in keinem der nicht-epidemischen Isolate (n=45), darunter auch Isolate gesunder Menschen, sowie in keinem der animalen Isolate (n=98) nachweisen (Willems et al. 2001). Leavis et al.

untersuchten Vancomycin-resistente und -sensible *E. faecium*-Stämme verschiedener Länder (u. a. aus Deutschland) und kamen zu ähnlichen Ergebnissen: 94 % der Vancomycin-resistenten Isolate (n=16), die man mit nosokomialen Ausbrüchen in Verbindung brachte, waren *esp*-positiv, desweiteren 40 % der Vancomycin-resistenten (n=20) und 57 % der Vancomycin-sensiblen (n=73) klinischen Infektionsisolate. Der Anteil *esp*-positiver Stämme an den Vancomycin-resistenten bzw. -sensiblen Surveillance-Isolaten lag bei ≤ 6 % (Leavis et al. 2003). Beide Studien zeigen, dass eine Assoziation zwischen *esp*-Gen und Isolaten, die im Zusammenhang mit nosokomialen Ausbrüchen (und klinischen Infektionen) stehen, zu existieren scheint, so dass sich ein Einfluss von *esp* auf die Ausbreitungsfähigkeit und eventuell auch Virulenz von *E. faecium*-Isolaten vermuten lässt (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2001). Ein ubiquitäres Vorkommen von *esp*, wie bei *E. faecalis*, scheint nicht gegeben zu sein. Eine Studie von Klare et al. zeigt ebenfalls, dass das *esp*-Gen unter Hospital-assoziierten *E. faecium*-Stämmen weit verbreitet ist: 78,9 % (n=15) der untersuchten Infektions- und Besiedlungs-Isolate (n=19) der Spezies *E. faecium* aus verschiedenen deutschen Krankenhäusern waren *esp*-positiv (Klare et al. 2005 – Tabelle 1 A). Auch das Epidemiologische Bulletin dokumentiert für deutsche Krankenhäuser 2008/2009 anhand der RKI-Einsendungen ein häufiges Vorkommen von *esp* in *E. faecium*. Während 56,5 % der *vanA*-positiven *E. faecium* Stämme (n=345) *esp*-positiv waren, konnte das *esp*-Gen in 92,5 % der untersuchten *vanB*-positiven (n=252) und 76,1 % der Vancomycin-sensiblen Isolate (n=46) nachgewiesen werden (RKI 2010).

Der Besitz der Determinante *esp* gilt mittlerweile als wichtiges Charakteristikum Hospital-assoziierten Stämme (CC17) von *E. faecium* (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2001 und 2005; siehe auch RKI 2010, Werner et al. 2008a). Der Nachweis des *esp*-Gens bei 100 % der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate (siehe Punkt 3.5) spricht demnach dafür, dass es sich bei diesen um solch Hospital-assoziierte (CC17) Stämme handelt. Ergänzend sei erwähnt, dass ein positiver Nachweis zwar für „Hospital-assoziiert“ spricht, ein negatives Ergebnis allerdings nicht dagegen. Dies macht eine Studie aus Schweden deutlich. Nur bei einem Isolat aus 15 untersuchten Fällen Vancomycin-resistenter CC17-*E. faecium* konnte das *esp*-Gen nachgewiesen werden (Bjørkeng et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Stämme charakterisiert, die im Rahmen eines Ausbruchs isoliert wurden, als auch Infektions- und Besiedlungsisolate, die

nicht mit einem Ausbruchgeschehen in Verbindung gebracht werden können. Diese Ergebnisse stehen nicht vollständig im Einklang mit denen von Willems et al., die *esp* in keinem der nicht-epidemischen Stämme nachweisen konnten und Leavis et al., die *esp* hauptsächlich bei epidemischen und Infektions-Stämmen nachwies (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2001), denn auch alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Besiedlungsisolate waren *esp*-positiv. Im Vergleich zu den von Klare et al. sowie vom Epidemiologischen Bulletin für deutsche Krankenhäuser dokumentierten Häufigkeiten *esp*-positiver *E. faecium*-Stämme, liegt die Rate bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen deutlich höher.

Die im *esp*-Gen begründete Fähigkeit zur Adhäsion an Epithelzellen und Biofilmbildung könnte die Ausbreitung der untersuchten Isolate an dem hier beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus begünstigen.

4.5 Nachweis des *hyl*-Gens in *E. faecium*

Das *hyl*-Gen ist plasmidal lokalisiert (Freitas et al. 2010, Laverde-Gomez et al. 2011) und kodiert eine vermeintliche Hyaluronidase (Laverde-Gomez et al. 2011, Panesso et al. 2011, Rice et al. 2003).

Rice et al. konnten in einem Maus-Infektions-Modell zeigen, dass es neben der Antibiotika-Resistenz noch weitere Faktoren in *E. faecium* geben muss, die eine gastrointestinale Besiedlung begünstigen. Andernfalls wäre die Assoziation von Stämmen des klonalen Komplex 17 mit Ausbrüchen und klinischen Infektionen nicht zu erklären. Auch wenn die Faktoren nicht eindeutig definiert wurden, verliehen Gene, die im Zusammenhang mit der Übertragung von *hyl* stehen, wenn nicht sogar *hyl* selbst, *E. faecium*-Stämmen die Fähigkeit, den Intestinaltrakt in hohem Maße zu kolonisieren (Rice et al. 2009). Bei einer weiteren Studie von Rice et al. wurden Vancomycin-sensible und -resistente *E. faecium*-Stämme (n=577) unterschiedlicher Herkunft und aus verschiedenen Ländern (u. a. aus Deutschland), auf das Vorhandensein von *hyl* untersucht. 17,7 % der untersuchten Stämme waren *hyl*-positiv. Sie stammten ausschließlich von hospitalisierten Personen (v. a. aus Nicht-Stuhl-Isolaten). 98 % dieser Stämme kamen aus den USA, 2 % aus Argentinien (Rice et al. 2003). Im Gegensatz zu deutschen Krankenhäusern und Kliniken anderer europäischer Länder waren also *hyl*-positive Vancomycin-resistente *E. faecium*-Stämme bereits in den 90ern in US-amerikanischen Krankenhäusern prävalent (Klare et al. 2005, Rice et al. 2003). Mittlerweile tragen aber auch viele *E. faecium*-Stämme aus

deutschen Kliniken das *hyl*-Gen. Klare et al. wiesen in 52,6 % (n=10) der 19 aus Patienten verschiedener deutscher Krankenhäuser zwischen 2003 und 2004 isolierten *E. faecium*-Stämme das *hyl*-Gen nach (Klare et al. 2005 – Tabelle 1 A). Das Epidemiologische Bulletin dokumentiert bezüglich des Nachweises von *hyl* in den *E. faecium*-Einsendungen an das RKI für die Jahre 2008 und 2009 folgende Zahlen: 44,1 % bzw. 66,7 % der untersuchten *vanA*- bzw. *vanB*-positiven *E. faecium*-Isolate (n=345/252) waren *hyl*-positiv. Desweiteren trugen 45,7 % der Vancomycin-sensiblen Stämme (n=46) das *hyl*-Gen (RKI 2010). Die Ergebnisse der aufgeführten Studien zeigen, dass das *hyl*-Gen unter Hospital-assoziierten Stämmen der Spezies *E. faecium* weit verbreitet ist, nicht nur in den USA, sondern nun auch in Deutschland.

Der Besitz des Virulenzfaktors *hyl* gilt als Charakteristikum Hospital-assoziiertes *E. faecium*-Stämme bestimmter klonaler Linien (CC17) und scheint mit deren erhöhten Ausbreitungspotential assoziiert zu sein (andere Virulenzfaktoren und Eigenschaften sind hier ebenfalls von Bedeutung; Freitas et al. 2010, Rice et al. 2003; siehe auch RKI 2010, Werner et al. 2007). Daher wurden die 179 in die Arbeit einbezogenen *E. faecium*-Isolate auf das Vorhandensein dieses putativen Virulenzfaktors untersucht. In 81 % (n=145) der untersuchten Isolate wurde das *hyl*-Gen nachgewiesen (siehe Punkt 3.6). Dieses Ergebnis erlaubt zwei Schlussfolgerungen, die eng miteinander verknüpft sind. Zum einen spricht der Besitz des putativen Virulenzfaktors *hyl* dafür, dass es sich um Hospital-assoziierte Isolate des klonalen Komplex 17 handelt (ein positiver Nachweis spricht für „Hospital-assoziiert“, ein negativer Nachweis allerdings nicht dagegen), zum anderen könnte der unter den untersuchten Isolaten weit verbreitete Besitz des *hyl*-Gens die Ausbreitung dieser Stämme an der hier beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung begünstigen. Eine auffällige Verteilung des Virulenzfaktors wie bei Rice et al (Rice et al. 2003), die das *hyl*-Gen vor allem in Nicht-Stuhl-Isolaten nachwies, wurde nicht erkannt.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass es sich bei dem von *hyl* kodierten Protein eventuell nicht um eine Hyaluronidase handelt. Aufgrund seiner Homologie zu Hyaluronidasen anderer gram-positiver Erreger hatte man dies zwar vermutet (Panesso et al. 2011, Rice et al. 2003), aber letztendlich konnte keine Hyaluronidase-Aktivität in *hyl*-positiven *E. faecium* detektiert werden (Laverde-Gomez et al. 2011). Wahrscheinlich handelt es sich bei dem *hyl*-kodierten Protein

um eine Glycosid-Hydrolase der Familie 84 (Panesso et al. 2011). Desweiteren ist es bis heute nicht gelungen die Rolle von *hyl* als Virulenzfaktor zu bestätigen. Studien von Panesso et al. sprechen dafür, dass es sich bei Genen der *hyl*-Region und *hyl* selbst nicht um die Hauptmediatoren des Virulenzeffekts, der anscheinend von *hyl*-tragenden Plasmiden ausgeht (siehe auch Rice et al. 2009), handeln kann. Wahrscheinlich sind andere Gene, die ebenfalls auf den recht großen *hyl*-Plasmiden lokalisiert sind, relevanter (Panesso et al. 2011). Nichtsdestotrotz lässt sich aufgrund des fast ausschließlichen Vorkommens von *hyl* bei klinischen *E. faecium*-Isolaten die Assoziation dieser Determinante mit unklarem Einfluss auf den Virulenzeffekt zu Hospital-assoziierten *E. faecium*-Stämmen nicht leugnen und somit ein Einfluss auf die Virulenz dieser Isolate nicht völlig ausschließen.

4.6 Genotypische Charakterisierung repräsentativer E. faecium-Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der PFGE und MLST – Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse

Unterschiedliche Resistenzprofile, sowie die unterschiedliche Verteilung der Resistenzgene *vanA/vanB* und des Virulenzfaktors *hyl* (siehe Punkt 3.3, 3.4, 3.6) lassen bereits ein polyklonales Geschehen vermuten. Die genotypische Charakterisierung ausgewählter Isolate mittels PFGE und MLST sollte nun weitere Auskünfte darüber geben, ob die VRE-Prävalenz an dem hier beschriebenen Krankenhaus auf der klonalen Ausbreitung eines oder einzelner Stämme basiert oder ob es sich um ein polyklonales Geschehen handelt, das – ausgehend von diversen Infektionsquellen – auf der Ausbreitung einer Vielzahl verschiedener Stämme beruht, und somit die vorliegenden Vermutungen bestätigt.

4.6.1 Auswahl der zu untersuchenden Stämme

Da nicht alle 180 in die Untersuchung einbezogenen Enterokokken-Isolate mittels PFGE typisiert werden konnten, musste eine Auswahl getroffen werden. Um trotz des Informationsverlustes, der sich durch diese Beschränkung ergab, hinsichtlich des oben geschilderten Bestrebens möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurden die Isolate zunächst jahrweise nach phäno- und genotypischen Kriterien unterteilt (siehe Punkt 2.2.9). Hintergrund ist die Überlegung, dass sehr eng verwandte Isolate/Klone sich hinsichtlich dieser Kriterien gleichen müssten. Aus diesen vorläufigen Clustern wurde dann ein Isolat, teilweise auch mehrere, mittels PFGE

charakterisiert. Bezüglich des Erstellens der vorläufigen Cluster sind zweierlei Dinge zu kritisieren: Zum einen wurde das Fachgebiet des Patienten, in dem er sich bei Probenentnahme befand, sowie der genaue Zeitpunkt derselben nicht in die Clustereinteilung einbezogen. Dies hätte zu weiteren Differenzierungen geführt, was zwar hinsichtlich der Genauigkeit förderlich gewesen wäre, deren Umfang aber nicht hätte bearbeitet werden können. Folglich hätte nur ein Bruchteil der bestehenden vorläufigen Cluster untersucht werden können. Priorität hatte aber das Anliegen, einen möglichst umfassenden Überblick zu geben, weswegen auf den Einbezug dieser Kriterien verzichtet wurde. Zum anderen basiert die Einteilung der Cluster zum Teil auf dem Vorliegen identischer Resistenzprofile. Ein Schluss von Antibiogramm auf verwandtschaftliche Verhältnisse kann mitunter zu fehlerhaften Annahmen führen. Morrison et al. zeigte, dass Isolate eines PFGE-Subtyps verschiedene Antibiogramme haben und Isolate verschiedener PFGE-Cluster (entfernt verwandt) identische Antibiogramme aufweisen können (Morrison et al. 1999).

Wie bereits erwähnt, war das Geben eines umfassenden Überblicks vorrangig (und nicht die Bestätigung der vorläufigen Clustereinteilung anhand phäno- und genotypischer Kriterien, hierzu siehe unten). Daher wurden nicht viele Isolate einiger weniger Cluster untersucht, sondern Isolate aus möglichst vielen Clustern typisiert, wodurch sich natürlich die Anzahl der pro Cluster untersuchten Stämme reduzierte. Auch wenn dieses Auswahlverfahren einige Nachteile mit sich bringt, so erschien es doch dem Vorhaben – im Vergleich zu anderen Verfahren – am dienlichsten.

Es sei noch kurz erwähnt, dass aus vier vorläufigen Clustern jeweils zwei Isolate untersucht wurden. Diese Paare clusterten bei 97 %, 78 %, 73 % und 65 % und zeigen somit, dass ein Schluss von Resistenzprofil, Markerverteilung und *van*-Gencluster auf das bestehende Verwandtschaftsverhältnis zwar möglich ist, aber nicht zwingend funktionieren muss.

Die per PFGE untersuchten *E. faecium*-Isolate konnten wiederum nicht alle mittels MLST charakterisiert werden, so dass auch hier eine Vorauswahl getroffen werden musste. Die Typisierung mittels MLST sollte zeigen, ob eine Überdiskriminierung seitens der PFGE vorliegt oder sich das heterogene Bild, das die PFGE zeichnet, bestätigen lässt. Um dies trotz der reduzierten Anzahl zu untersuchender Isolate bestmöglich umzusetzen, wurde aus jedem Cluster mit einem Ähnlichkeitslevel von

≥ 80 % ein Isolat charakterisiert. Dies gewährleistet nicht nur einen umfassenden Überblick, sondern ermöglichte auch grob die Bestätigung der Clustereinteilung durch die PFGE, da mehrere Isolate der größeren Cluster untersucht wurden. Auf eine Charakterisierung aller Isolate eines PFGE-Clusters wurde verzichtet, da die Bestätigung der Clustereinteilung durch die PFGE im Einzelnen nicht im Vordergrund stand und eine solche Betrachtung recht einseitig wäre. Die gewählte Methode ermöglicht eine umfassendere Betrachtung und lässt im Hinblick auf das genannte Anliegen aussagekräftigere Schlüsse zu.

4.6.2 Die Methoden und ihre Ergebnisse im Überblick

Die Makrorestriktionsanalyse des Gesamtgenoms in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gilt als „Goldener Standard“ bei epidemiologischen Analysen verschiedener Bakterienspezies, u. a. der Enterokokken (Morrison et al. 1999). Diese Methode verfügt über eine exzellente Diskriminierungsfähigkeit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird mit sehr gut bis gut bewertet (Werner et al. 2007). Eingeschränkt wird der Nutzen dieser Anwendung aufgrund fehlender einheitlicher Kriterien zur Auswertung der erhaltenen Bandenmuster und fehlender standardisierter Laufbedingungen, vor allem bei Langzeitstudien und in Bezug auf Vergleiche zwischen Laboratorien (Morrison et al. 1999). Ein Datenaustausch ist zwar möglich, aber eben abhängig von verwendetem Protokoll und Gerätschaft (Werner et al. 2007). Die ausgezeichnete Diskriminierungsfähigkeit dieser Methode, die primär als Vorteil zu betrachten ist, beschränkt das Anwendungsgebiet der PFGE bei (Vancomycin-resistenten) Enterokokken. Während sie bei der Aufklärung lokaler Ausbruchgeschehen als die Methode der Wahl gilt und ebenso bei Analysen zur überregionalen Verbreitung gewisser Klone eine Rolle spielt, ist sie überdiskriminierend in Populationsanalysen, weshalb hier andere Methoden zum Einsatz kommen sollten (Werner et al. 2007). Auch bei der Bestimmung des Verwandtschaftsgrades epidemiologisch nicht in Verbindung stehender Isolate können aufgrund des hohen Differenzierungsgrades der PFGE Probleme auftreten (Homan et al. 2002).

Vor diesem Hintergrund ist erkennbar, dass sich die Auswertung der mittels PFGE erhaltenen Bandenmuster der in dieser Arbeit untersuchten Isolate in zweierlei Hinsicht schwierig gestaltet. Seit Tenover's Publikation „Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing“ existieren zwar Kriterien zur Auswertung von Bandenmustern,

allerdings wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass diese Richtlinien sich auf eine Isolatanzahl von $n \leq 30$, sowie einen Untersuchungszeitraum von ≤ 3 Monaten beziehen (Tenover et al. 1995). Werden diese Grenzen überschritten, ist eine strikte Einhaltung der Richtlinien nicht zu empfehlen (Morrison et al. 1999, Tenover et al. 1995). Es existieren also keine klaren, einheitlichen Kriterien was die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen PFGE-Ergebnisse betrifft, da sowohl Probenanzahl als auch Untersuchungszeitraum den von Tenover et al. empfohlenen Anwendungsbereich bei Weitem übersteigen. Das heißt, die Auswertung der Ergebnisse ist bei einer solchen Probengrundlage immer ein Stück weit abhängig von der persönlichen Einschätzung der untersuchenden Person und enthält somit eine subjektive Komponente. Desweiteren ist bezüglich der Auswertung kritisch zu betrachten, dass die in dieser Arbeit durchgeführte PFGE nicht innerhalb des optimalen Anwendungsbereichs dieser Methode liegt, der die Analyse von epidemiologisch verwandten Isolaten im Rahmen eines Ausbruchgeschehens (Kurzzeitstudie) umfasst (siehe oben). Es wurden zwar allein Isolate untersucht, die während eines bestimmten Zeitraums (2005-2010) an einem definierten Ort (Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland) isoliert wurden, doch muss man hierbei Folgendes bedenken: Alle Isolate wurden an einem Krankenhaus isoliert, stammen aber aus unterschiedlichen Stationen und Einrichtungen und wurden innerhalb eines definierten, aber doch sehr langen Zeitraums, gesammelt.

Die Problematik der beiden aufgeführten Aspekte ist begründet in der hohen Diskriminierungsfähigkeit der PFGE und der hohen Rekombinationsrate (Willems et al. 2005) sowie dem hohen Maß an genetischen Polymorphismen (Morrison et al. 1999), welche zu einer genomischen Instabilität in *E. faecium* führen können, was die Aussagekraft der PFGE bei Langzeitstudien (2005-2010) möglicherweise limitiert. Der speziesspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägte genetische Polymorphismus sollte laut European Study Group on Epidemiological Markers bei der Auswertung der Ergebnisse epidemiologischer Typisierungsmethoden im Hinblick auf Aussagen, welche die Verwandtschaft einzelner Isolate betreffen, berücksichtigt werden (Struelens et al. 1996).

Morrison et al. konnten zeigen, dass der eben erwähnte genetische Polymorphismus bei *E. faecium* selbst innerhalb eines Stammes stark ausgeprägt sein kann. Die Bandenmuster der Isolate unterschieden sich hier in bis zu 7 (12) Banden. Dies entspricht einem Ähnlichkeitslevel von 87 % (82 %). Der Untersuchungszeitraum dieser

Studie betrug elf Monate (Morrison et al. 1999). Das bedeutet, dass selbst eng verwandte Isolate in der PFGE recht polymorph erscheinen können. Orientiert man sich an den Kriterien von Tenover et al., ist innerhalb einer dreimonatigen Periode das Auftreten von zwei unabhängigen genetischen Ereignissen in einem Ausbruchstamm erlaubt, was sich in 4-6 Bandenunterschieden deutlich macht. Diese Isolate bezeichnet man als „possibly related“. Isolate mit ≥ 7 Bandenunterschieden gelten als „unrelated“ (Tenover et al. 1995). Die Untersuchungen von Morrison et al. unterstützen Tenover's Empfehlung, die aufgestellten Kriterien nur bei Kurzzeituntersuchungen zu verwenden. Denn innerhalb einer elfmonatigen Untersuchungsperiode bestätigte man die Verwandtschaft (Zugehörigkeit zum gleichen Stamm) für Isolate mit bis zu 7 Bandenunterschieden beim Vergleich untereinander und bis zu 5 Bandenunterschieden im Vergleich mit dem „common pattern“ (Morrison et al. 1999, Tenover et al. 1995). Nun übersteigt der Untersuchungszeitraum dieser Arbeit auch die Untersuchungsdauer bei Morrison et al. Es stellt sich somit die Frage, vom Stattfinden wie vieler unabhängiger genetischer Ereignisse man bei einer Untersuchungsperiode von ungefähr 57 Monaten ausgehen sollte und inwiefern sich im Einzelfall Isolate ein und desselben Stammes, der über Jahre persistiert, überhaupt noch als genetisch verwandt erkennen lassen, bzw. inwiefern das heterogene Bild, das die PFGE bezüglich der untersuchten Isolate zeichnet, eventuell aufgrund des Auftretens einer Vielzahl von genetischen Ereignissen und der hohen Diskriminierungsfähigkeit der PFGE auf einige wenige eng verwandte „Ausgangs“-Isolate zurückzuführen ist. Um eine mögliche Überdiskriminierung seitens der PFGE auszuschließen (langer Untersuchungszeitraum, hohe Rekombinationsrate/hohes Maß an Polymorphismus bei *E. faecium*), das heißt um zu vermeiden, dass die PFGE eine Diversität vorspiegelt, die letztendlich nicht gegeben ist, und somit falschen Schlüssen vorzubeugen, wurden daher ausgewählte Isolate zusätzlich mittels MLST charakterisiert.

Während im Rahmen der PFGE das Gesamtgenom betrachtet wird und ein bei Enterokokken relativ häufiges, einzelnes Ereignis einer Rekombination bereits ein völlig anderes PFGE-Muster generieren kann, werden im Rahmen des MLSTs interne DNS-Fragmente sieben verschiedener Haushaltsgene von *E. faecium* typisiert (Homan et al. 2002, <http://www.mlst.net>) und der MLST-Typ bleibt von einem solchen Ereignis meist unbeeinträchtigt. Die PFGE diskriminiert also bei Enterokokken stärker als das MLST (teilweise vielleicht sogar zu stark – Überdiskriminierung). Die Diskriminie-

rungsfähigkeit des MLSTs bei Enterokokken wird als sehr gut bewertet (Werner et al. 2007). Diese Methode ist prädestiniert für ihren Einsatz bei epidemiologischen Langzeitstudien (Homan et al. 2002) und gilt als „Goldener Standard“ was Populationsanalysen betrifft. Sie verfügt über eine exzellente Reproduzierbarkeit und bietet exzellente Möglichkeiten zum Datenaustausch (Werner et al. 2007).

Die Darstellung der erhaltenen Sequenztypen, sowie aller derzeit in der öffentlichen MLST-Database unter <http://www.mlst.net> hinterlegten Sequenztypen von *E. faecium*, erfolgte mit Hilfe der goeBURST 1.2.1-Software. Während die eBURST-Software Ergebnisse zwar lokal aber nicht global optimiert, löst die goeBURST-Software dieses Problem durch die Formalisierung desselben als graphisches Matroid und den Einsatz eines neuen Algorithmus, wodurch eine globale Optimierung ermöglicht und die (e)BURST-Regeln optimal umgesetzt werden (Francisco et al. 2009).

Die Charakterisierung ausgewählter Isolate mittels MLST widerlegte eine Überdiskriminierung seitens der PFGE und bestätigte die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit. Die verschiedenen Resistenzprofile und die unterschiedliche Verteilung des Virulenzmarkers *hyl*, sowie der *van*-Gene ließen bereits ein polyklonales Geschehen vermuten. Die Ergebnisse der PFGE bestärkten diese Vermutung dann aufgrund der Heterogenität der DNS-Bandenmuster und der Vielzahl an Clustern, die sich gebildet hatten. Der Nachweis mehrerer verschiedener MLST-Sequenztypen bestätigte letztendlich eine polyklonale Prävalenz Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus. Diese lässt auf verschiedene Infektionsquellen und eine interhospitalen Ausbreitung der Stämme schließen.

Die Typisierung ausgewählter Isolate per MLST diente nicht nur der Bestätigung bisheriger Ergebnisse, sondern auch der Einordnung der untersuchten Isolate anhand ihres Sequenztyps innerhalb der *E. faecium*-Population: Alle erhaltenen Sequenztypen gehören zum klonalen Komplex 17, der Hospital-assoziierte Vancomycin-resistente/-sensible *E. faecium*-Stämme umfasst (RKI 2010, Werner et al. 2007, Willems et al. 2005), wobei die nachgewiesenen MLST-Typen 17, 18, 78, 117, 192 und 202 zu den Sequenztypen gehören, die in deutschen Kliniken durch Ausbruchgeschehen vermehrt aufgetreten sind (Abele-Horn et al. 2006, Klare et al. 2005, Werner et al. 2007).

4.6.3 Kombination genotypischer und epidemiologischer Daten

Molekulare Methoden sind wichtige Hilfsmittel zur Bestimmung genetischer Verwandtschaften zwischen einzelnen Isolaten. Der alleinige Einsatz dieser Methoden ohne Berücksichtigung epidemiologischer Fakten kann leicht zu Fehlinterpretationen bezüglich der vorliegenden Situation führen. Tenover et al. empfehlen, beiderlei Daten-Sets unabhängig voneinander zu erheben und dann gemeinsam zu analysieren (Tenover et al. 1995).

Zusätzlich zur genotypischen Charakterisierung der Isolate wurden auch in dieser Arbeit zugehörige epidemiologische Daten erhoben. Es sei hier auf Abbildung 3j verwiesen, diese kombiniert beide Daten-Sets. Die Charakterisierung mittels PFGE lässt eine große Heterogenität innerhalb der untersuchten Isolate erkennen, identifiziert aber auch Cluster genetisch enger verwandter Stämme. Einige dieser Cluster stehen auch epidemiologisch in engerem Zusammenhang, bei anderen lässt sich ein Zusammenhang der epidemiologischen Daten nur in weiterem Sinne erkennen, da Zeitpunkt bzw. Station (Fachgebiet) des Patienten bei Probenentnahme nicht übereinstimmen. Für Erstes ist eventuell eine Persistenz entsprechender Stämme über einen längeren Zeitraum innerhalb des Klinikums bzw. einzelner Stationen verantwortlich. Die große räumliche Nähe, sowie die Interaktion zwischen einzelnen Stationen/Fachgebieten und die gemeinsame Nutzung von Funktionsbereichen und Intensivstationen könnten Zweites erklären. Eine Übertragung Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme durch Patienten(-verlegung), Personal und kontaminierte Gegenstände ist durchaus vorstellbar.

Bei diesen Überlegungen darf nicht vergessen werden, dass es nicht das Anliegen dieser Arbeit ist, VRE-Ausbrüche auf verschiedenen Stationen des beschriebenen Krankenhauses im Einzelnen zu analysieren, sowie einzelne für eine eventuelle intra-/ interhospitalen Ausbreitung verantwortliche Infektionsträger zu identifizieren. Der Aufbau dieser Arbeit, beginnend bei der Auswahl der zu untersuchenden Stämme bis hin zur Auswahl der mit PFGE und MLST zu typisierenden Isolate, ist hierfür ungeeignet und hätte zur Klärung dieser Fragen auf andere Art und Weise gestaltet werden müssen. Desweiteren muss man beachten, dass jedes Isolat, das mittels PFGE untersucht wurde, stellvertretend für eine größere Gruppe von Isolaten mit gleichen geno- und phänotypischen Eigenschaften steht.

4.6.4 Hospitale Assoziation

Bei den in dieser Arbeit untersuchten *E. faecium*-Isolaten handelt es sich um Hospital-assoziierte Stämme dieser Spezies, da alle Isolate von Patienten einer klinischen Einrichtung stammen, Ampicillin-resistent, *esp*- sowie teils *hyl*-positiv sind und – soweit analysiert – ihre Zugehörigkeit zum klonalen Komplex 17 bestätigt wurde (siehe Punkt 4.2.1, 4.4, 4.5 und 4.6.2).

Interessant wäre in diesem Zusammenhang eventuell auch der Nachweis der Insertionssequenz *IS16* gewesen. Diese scheint ebenfalls charakteristisch für Hospital-assoziierte *E. faecium*-Isolate zu sein, wie Untersuchungen des Robert Koch-Instituts zeigen (RKI 2010).

4.7 Auswertung der erhobenen klinischen Daten

Die klinischen Daten, die zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten erhoben wurden, zeigen, dass es sich bei den Untersuchten hinsichtlich Geschlecht, Alter und Fachgebiet, in dem die Behandlung an dem beschriebenen Krankenhaus erfolgte, um eine heterogene Personengruppe handelt (siehe Punkt 3.10.1-3.10.3). Die Erhebung des Wohnorts lässt keinen epidemiologischen Zusammenhang, z. B. hinsichtlich der krankenhausexternen Gesundheitsversorgung, zwischen den untersuchten Patienten erkennen, da diese aus verschiedenen Städten, Bundesländern und Ländern stammen (siehe Punkt 3.10.5). Punkt 3.10.6 zeigt zudem, dass alle in dieser Arbeit untersuchten VRE-Patienten an einer Grundkrankheit leiden (siehe auch Bjørkeng et al. 2011). Patienten mit schweren Grunderkrankungen sowie immunsupprimierte Menschen zählen hinsichtlich der Entwicklung einer Enterokokken- bzw. VRE-Infektion zur Gruppe der Risikopatienten. Hierzu gehören u. a. onkologische und Transplantationspatienten (Simon et al. 2004, Vonberg et al. 2007, Wendt et al. 1998a), die auch einen großen Anteil an den in dieser Arbeit untersuchten Personen ausmachen.

4.8 Epidemiologie animaler und humaner VRE-Stämme inklusive Populations-analytischer Aspekte

Eine Verbindung zwischen dem Einsatz von Avoparcin in der Nutztierhaltung und dem Auftreten nosokomialer Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken wurde oft diskutiert. Eine Pressemitteilung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin fasst die Ergebnisse der damals laufenden

Diskussionen zusammen: „Obwohl eine Verbindung zwischen einer nunmehr nachweislich durch die Tierhaltung verursachten spezifischen Glycopeptid-Resistenz und der auftretenden Resistenz in Krankenhäusern noch immer nicht eindeutig belegt ist, haben sich die Verdachtsmomente gegen das Avoparcin [...] entscheidend erhärtet [...].“ (BgVV 1996a). Doch dieser Verdacht konnte nicht bestätigt werden. Klein et al. beispielsweise konnten aufgrund der von ihnen durchgeführten Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen VRE-Isolaten, die man aus Hackfleisch isoliert hatte, und klinischen Isolaten aus humanen nosokomialen VRE-Infektionen herstellen (Klein et al. 1998). Vielmehr kam man zu dem Schluss, dass neben dem Reservoir *vanA*-positiver VRE, das sich in gesunden Menschen außerhalb der Krankenhäuser entwickelt hatte und das letztendlich auf den Einsatz von Avoparcin in der Tierernährung, die dadurch entstandene Selektion Vancomycin-resistenter Enterokokken in Nutztieren und eine Ausbreitung via Nahrungskette zurückzuführen war (Klare et al. 1995a, 1995b und 1999), eine Subpopulation Hospital-assoziiertes *E. faecium*-Stämme existieren muss (Leavis et al. 2003, Willems et al. 2001 und 2005). Diese Hospital-assoziierten Isolate unterscheiden sich von anderen Stämmen durch das statistisch gehäufte Auftreten einer Ampicillin-Resistenz, Fluorchinolon-Hochresistenz, sowie durch den Besitz spezifischer Virulenzfaktoren, wie *esp* und *hyl* (Klare et al. 2005, Leavis et al. 2003 und 2006, Rice et al. 2003, Werner et al. 2008a, Willems et al. 2001 und 2005). Mit Hilfe des Einsatzes molekularer Methoden, wie z. B. des MLSTs, konnte man Informationen bezüglich der Populationsstruktur von *E. faecium* gewinnen und erkannte, dass Stämme dieser Spezies zwar weit verbreitet, aber durchaus wirtsspezifisch sind. Das heißt, es besteht eine Assoziation zwischen bestimmten MLST-Typen und bestimmten Habitaten. Laut Werner et al. ist die „[...] Übertragung eines Isolates vom Tier auf den Menschen [somit] zwar möglich, wird aber nur in seltenen Fällen zu einer langen Kolonisierung oder einer langfristigen Persistenz des Erregers in anderen Milieus (z. B. im Krankenhaus) führen.“ (Homan et al. 2002, Werner et al. 2007, Willems et al. 2000). Untersuchungen von Freitas et al. zeigen, dass klonale Komplexe durchaus Stämme unterschiedlicher Herkunft umfassen können. Sie identifizierten CC17-Stämme in Kliniken, gesunden Freiwilligen, Schweinen und Schweinefarmen sowie in der Umwelt Portugals. Stämme des klonalen Komplex 5 wurden nicht nur aus Bodenproben von Schweinefarmen, sondern auch in Krankenhäusern isoliert (Freitas et al. 2009). Auch Studien aus Spanien identifizierten CC17-*E. faecium* nicht nur innerhalb von Kliniken,

sondern auch außerhalb, beispielsweise in Lebensmittelproben (López et al. 2009, Valdezate et al. 2009). Eine Kontamination nicht-klinischer Ressourcen und gesunder Personen außerhalb der Kliniken ausgehend von hospitalen CC17-Stämmen, z. B. durch Entlassung von VRE-Trägern, ist durchaus vorstellbar. Die Existenz eines möglichen Reservoirs außerhalb von medizinischen Einrichtungen könnte zur Ausbreitung von *E. faecium*-Stämmen des klonalen Komplex 17 beitragen (Freitas et al. 2009).

Die MLST-Typen von *E. faecium*-Stämmen, die man im Rahmen nosokomialer Ausbrüche, Infektionen und Besiedlungen isoliert, gehören jedoch meist zum klonalen Komplex 17 (Werner et al. 2007, Willems et al. 2005). Besiedlungsisolate gesunder Menschen außerhalb medizinischer Einrichtungen sowie animale Isolate hingegen lassen sich meist anderen Komplexen (z. B. Schwein CC5, Geflügel CC9, Mensch CC22; Freitas et al. 2009) zuordnen und somit von nosokomialen Isolaten abgrenzen (siehe auch Werner et al. 2008b). Willems et al. untersuchten 96 animale Vancomycin-resistente und -sensible *E. faecium*-Isolate mittels MLST. Nur eines dieser Isolate konnte dem klonalen Komplex 17 zugeordnet werden. Desweiteren typisierten sie 57 Vancomycin-resistente und -sensible *E. faecium*-Isolate aus der Surveillance gesunder Menschen außerhalb des Krankenhauses, wobei allein 3 Isolate dem klonalen Komplex 17 angehörten. Dagegen zählten 15 der hospitalen Surveillance-Isolate (n=64), 95 der klinischen Isolate (n=162) und 28 der Ausbruch-Isolate (n=32) der Spezies *E. faecium* zum klonalen Komplex 17 (Willems et al. 2005). Von den 24 im Rahmen dieser Arbeit mit MLST charakterisierten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen konnten alle dem klonalen Komplex 17 zugeordnet werden. Desweiteren zeigen alle 179 an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus isolierten und untersuchten Ausbruchs-, Infektions- und Besiedlungsisolate die für Hospital-assoziierte Stämme typischen Eigenschaften: Sie sind Ampicillin-resistent, *esp*-positiv und viele der Isolate tragen das *hyl*-Gen. Diese Charakteristika differenzieren die untersuchten Isolate eindeutig von animalen Stämmen der Spezies *E. faecium* und zeigen, dass es sich bei den untersuchten Isolaten um Hospital-assoziierte Stämme handelt.

Die Hospital-assoziierten *E. faecium*-Stämme des klonalen Komplex 17 mit den eben aufgeführten Eigenschaften zeigen eine erhöhte Ausbreitungsfähigkeit im nosokomialen Bereich. Der Besitz der Determinanten für die Glycopeptid-Resistenz ist dabei keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Ausbreitung in nosokomialen Bereichen

(Werner et al. 2008a, Willems et al. 2005). Verschiedene Studien, sowie Erkenntnisse über die Populationsstruktur von *E. faecium* lassen folgendes Modell bezüglich der Entstehung und Verbreitung Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme im nosokomialen Bereich als wahrscheinlich erscheinen: Ampicillin-resistente, oft *esp*- und *hyl*-positive Isolate des klonalen Komplex 17 breiten sich im Krankenhaus aus und werden erst durch den späteren Erwerb der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten auffällig (Kawalec et al. 2000 und 2001, Klare et al. 2005, Leavis et al. 2003, Rice et al. 2003, Suppola et al. 1999, Werner et al. 2008a, Willems et al. 2001 und 2005). All diese neuen Erkenntnisse drängen die These, die VRE-Problematik in deutschen Krankenhäusern sei auf den Einsatz von Avoparcin in der Tierernährung und eine Übertragung bereits Vancomycin-resistenter Enterokokken zurückzuführen ins Abseits.

Untersuchungen von Werner et al. zeigen allerdings, dass trotz des unterschiedlichen ökologischen Ursprungs von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen, die man aus animalen Kotproben, gesunden Menschen ohne Krankenhauskontakt, Infektionen hospitalisierter Patienten, Abwasserproben und Fleischprodukten isolierte, teilweise identische *vanA*-Gencluster nachgewiesen werden können (Werner et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse erhielten auch van den Braak und Jensen et al. (van den Braak et al. 1998, Jensen et al. 1998). Dies spricht für die Existenz eines sektorübergreifenden Genpools. Inwiefern allerdings eine Übertragung der Determinanten für Glycopeptid-Resistenz zwischen den einzelnen Habitaten (Tier, gesunder Mensch außerhalb des Krankenhauses, Patient in Krankenhaus) stattgefunden hat bzw. stattfindet, ist aufgrund der weiten Verbreitung dieser Gencluster nicht zu beantworten, zumal außerhalb von *E. faecium* noch weitere Reservoirs für die *van*-vermittelte Glycopeptid-Resistenz zu existieren scheinen (siehe Punkt 4.3.2). Ein gemeinsames Reservoir, aus dem Isolate verschiedener Sektoren die Determinanten für Glycopeptid-Resistenz erhalten, ist durchaus vorstellbar (siehe auch Jensen et al. 1998).

Zu beachten ist allerdings, dass bei animalen VRE aus den 90ern (hauptsächlich) das *vanA*-Gen nachgewiesen wurde (Klare et al. 1995b, Witte 1997). Eine *vanB*-dominierte VRE-Situation wie beispielsweise an dem hier beschriebenen Krankenhaus lässt sich mit der Übertragung dieser animalen Gencluster nicht erklären, da kein nachweisliches Reservoir an *vanB* in animalen Enterokokken existiert.

Doch auch wenn der Einsatz von Avoparcin in der Tierernährung letztendlich nicht für das Auftreten und den Anstieg nosokomialer VRE-Infektionen verantwortlich zu sein scheint, so ist dessen Verbot doch als durchaus positiv zu bewerten, denn es führte zur Minimierung des Reservoirs der übertragbaren *van*-vermittelten Glycopeptid-Resistenz außerhalb deutscher Kliniken. Während man in Deutschland 1994/1995 regelmäßig Vancomycin-resistente Enterokokken vom *vanA*-Typ aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs isolieren konnte, ließ sich bereits Ende 1997 – fast zwei Jahre nachdem Avoparcin in Deutschland verboten worden war – eine Abnahme dieser VRE in gefrorenem und frischem Geflügelfleisch deutscher Herkunft erkennen: VRE wurden nur noch in rund 25 % der untersuchten Proben nachgewiesen. Ähnliches konnte bei gesunden Menschen ohne Krankenhausaufenthalt aus Sachsen-Anhalt beobachtet werden, denn auch hier nahm die VRE-Prävalenz ab. Während 1994 12 % der untersuchten Personen VRE-positiv waren, waren es 1996 nur noch 6 % und 1997 sogar nur noch 3 % (Klare et al. 1999). Eine Studie von Wendt et al. dokumentiert die Prävalenz von VRE in Personengruppen außerhalb von Krankenhäusern in Berlin mit 0,9-4,2 % (Wendt et al. 1999). Aktuellere deutsche Studien, die sich mit der momentanen Prävalenz und Eigenschaften Vancomycin-resistenter *E. faecium* in Nutztierbeständen oder gesunden Menschen außerhalb der Kliniken beschäftigen, sind leider nicht verfügbar. Auch wenn die Untersuchungen von Klare et al. eine Abnahme der VRE-Prävalenz bei Menschen ohne Krankenhauskontakt und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nach Avoparcin-Verbot belegen (Klare et al. 1999), wobei letzteres für eine Abnahme der VRE-Prävalenz in deutschen Nutztierbeständen spricht, ist eine aktuelle, abschließende Beurteilung aufgrund einer fehlenden validen Datenbasis nicht möglich.

Studien aus Ungarn und Dänemark belegen ebenfalls eine Abnahme der Prävalenz Vancomycin-resistenter Enterokokken nach dem Verbot von Avoparcin. In Ungarn bestimmte man im Rahmen des Resistenzüberwachungssystem die Prävalenz des *vanA*-Gens in Enterokokken bei geschlachteten Hühnchen zwischen 2001 und 2004. Während 2001 noch 8,6 % (n=25) der 289 untersuchten Stämme (11 *E. faecium*) und 2002 23 % (n=20) der 87 untersuchten Stämme (9 *E. faecium*) *vanA*-positiv waren, wurden 2003 und 2004, also fünf Jahre nachdem der Einsatz von Avoparcin verboten worden war, keine Vancomycin-resistenten Enterokokken mehr isoliert (Ghidán et al. 2008a). Eine 2005 ebenfalls im Rahmen des ungarischen Resistenzüber-

wachungssystems durchgeführte Studie identifizierte VRE in geschlachtetem Geflügel. Dieses ließ sich scheinbar auf einzelne Farmen zurückführen, die möglicherweise als Reservoir fungieren (Ghidán et al. 2008b). In Dänemark wurde der Einsatz von Avoparcin bereits 1995 verboten. Bager et al. untersuchten den Effekt des Avoparcin-Verbots auf die Glycopeptid-Resistenz in *E. faecium* in Masthähnchen und Schweinen. Unter den Proben, die von Masthähnchen isoliert wurden, kam es bezüglich des Auftretens Glycopeptid-resistenter Enterokokken zu einem statistisch signifikanten Abfall zwischen 1995 und der ersten Hälfte von 1998, während man bei den von Schweinen isolierten Proben einen solchen Effekt trotz des Avoparcinverbots nicht beobachtete (Bager et al. 1999). Aarestrup et al. kamen bei Untersuchungen im Rahmen eines dänischen Monitoring-Programms zu ähnlichen Ergebnissen. Zwischen 1995 und 2000 kam es zu einem Abfall der VRE-Prävalenz in Masthähnchen von 72,7 % auf 5,8 %. Unter Isolaten, die von Schweinen isoliert worden waren, kam es zwischen 1995 und 1997 hingegen zu keiner Abnahme der VRE-Prävalenz. Grund hierfür ist ein genetischer Link zwischen den Genen, welche die Glycopeptid-Resistenz, und denen, welche die Makrolid-Resistenz kodieren. Dementsprechend kam es erst nach Abnahme des Verbrauchs des Makrolid-Antibiotikums Tylosin zu einem Abstieg der VRE-Prävalenz in Schweinen von 20 % (1997) auf 6 % (2000; Aarestrup 2000b und Aarestrup et al. 2001).

Was in der Studie von Bager sowie Aarestrup et al. bereits angedeutet wird, bestätigen Untersuchungen von De Niederhäusern, Borgen und Nilsson et al.: Das Avoparcin-Verbot kann, muss aber nicht zwingend zu einer Verbesserung der VRE-Problematik (außerhalb der Kliniken) führen.

In Italien untersuchte man acht Jahre nach Avoparcinverbot das Vorkommen Vancomycin-resistenter Enterokokken in Pferd und Schwein. 6,7 % bzw. 16 % der untersuchten Isolate zeigten sich Glycopeptid-resistent (De Niederhäusern et al. 2007). Eine norwegische Studie dokumentiert auch drei Jahre nachdem Avoparcin verboten wurde, eine hohe Prävalenz *vanA*-positiver Enterokokken in Geflügel-Schlachtkörpern. Ohne Voranreicherung wurden in 30 % der Proben von Farmen, wo Avoparcin eingesetzt wurde, VRE isoliert, während bei Geflügel von Farmen, die kein Avoparcin einsetzten, keine VRE gefunden wurden (Borgen et al. 2001). In Schweden wurde Avoparcin seit 1986 nicht mehr in der Tierernährung eingesetzt. Während der 90er Jahre wurden im Gegensatz zu anderen europäischen Ländern nur vereinzelt VRE in Nutztieren nachgewiesen (Kühn et al. 2005). Seit 2000 kommt es allerdings ohne

einen offensichtlichen Selektionsdruck zur Ausbreitung eines VRE-Klons in der Masthähnchenproduktion. Während 2000 weniger als 1 % der untersuchten Proben VRE-positiv waren, waren es 2005 mehr als 40 % und 2006/2007 etwa 30 %. Die isolierten Stämme gehören zur Spezies *E. faecium* und tragen das *vanA*-Gen. Diese Entwicklung ist nicht auf den früheren Einsatz von Avoparcin zurückzuführen (Nilsson et al. 2009).

Nichtsdestotrotz ist die Einschränkung des Einsatzes von Antibiotika als Leistungsförderer in der Tierernährung zu befürworten. Sie stellt einen wichtigen Schritt in Richtung Reduzierung des Reservoirs verschiedener Antibiotika-Resistenzen in der Nutztierpopulation dar. Dies zeigen u. a. oben aufgeführte Untersuchungen für Glycopeptid-Antibiotika und – unter Vielen – Aarestrup et al. für andere Antibiotika, beispielsweise Streptogramine (Aarestrup et al. 2001). Eine Minimierung dieses Reservoirs durch eine Reduzierung des Einsatzes von antibiotischen Leistungsförderern ist vor allem vor dem Hintergrund der Übertragung resistenter Erreger oder ihrer Resistenzgene auf den Menschen sinnvoll, besonders wenn Stoffe aus der gleichen Antibiotikagruppe als Therapeutika in der Humanmedizin eingesetzt werden (siehe auch BgVV 1996b, RKI 2010). Seit 2006 ist der Einsatz antibiotischer Leistungsförderer in der Tierernährung EU-weit verboten (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 Artikel 11 Absatz 2).

4.9 VRE-Management am Durchführungsort der Studie – einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland

Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen hinsichtlich der betrachteten Charakteristika keine Veränderung der molekularen Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus zwischen 2005 und 2010 erkennen: Es handelt sich bei allen Isolaten um Hospital-assoziierte Stämme der Spezies *E. faecium*. Die hauptsächlich *vanB*-positiven Vancomycin-resistenten Isolate sind darüber hinaus unempfindlich gegenüber einer Vielzahl weiterer Antibiotika (siehe Punkt 3.3-3.6 und 3.9). Die vorliegenden Ergebnisse lassen hinsichtlich der untersuchten Charakteristika keine Veränderung des von diesen Erregern ausgehenden epidemischen bzw. Risiko-Potentials (erhöhte Ausbreitungstendenz mit VRE-Kolonisierung und Möglichkeit der VRE-Infektion) erkennen und vermuten.

Um sich einen Überblick über den Nutzen der 2007 eingeführten Hygienemaßnahmen zu verschaffen, wurde die Inzidenz der VRE-Bakteriämien an dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus während dreier Perioden mit unterschiedlichem VRE-Management verglichen. Zwischen Januar 2007 und September 2009 wurde ein VRE-Screening durchgeführt und es galt eine klinikweite Isolierungsempfehlung für alle VRE-Patienten nach Hygieneplan. Von Oktober 2009 bis Januar 2010 lag keine VRE-Screening-Empfehlung der Hygienekommission, wohl aber eine Isolierungsempfehlung für bekannte (Alt-) VRE-Fälle vor. Ab Februar 2010 lagen weder eine VRE-Screening- noch eine Isolierungsempfehlung nach Hygieneplan vor (eine Ausnahme stellen lediglich VRE-negative Lebertransplantierte Patienten dar, die nicht mit VRE-Patienten zusammengelegt werden). Die Inzidenz der VRE-Bakteriämien lag zwischen Januar 2007 und September 2009 bei 1,5, zwischen Oktober 2009 und Januar 2010 bei 2,0 und von Februar 2010 bis Ende 2010 bei 1,3 Fällen pro Monat. Während der drei Perioden mit unterschiedlichem VRE-Management kam es also zu keiner richtungsweisenden Veränderung der Inzidenz von VRE-Bakteriämien (Daten nicht publiziert). Dass es durch aufwendige Screening- und Isolierungsmaßnahmen zu keiner Minimierung bzw. durch ihre Aufhebung zu keiner Erhöhung der Fallzahlen gekommen ist, lässt die ergriffenen Hygienemaßnahmen wenig effektiv erscheinen. Ergebnisse einer Studie von Russell et al. suggerieren ebenfalls, dass Hygienemaßnahmen wie Screening und Isolierungsvorkehrungen hinsichtlich einer Kontrolle von VRE-Kolonisierungen und -Infektionen weniger effektiv sind, als beispielsweise bei MRSA. Von 2001 bis 2006 war es hier auf bestimmten Stationen einer Klinik trotz dieser Maßnahmen zu einem leichten Anstieg nosokomialer VRE-Infektionen gekommen (Russell et al. 2008). Man sollte allerdings bedenken, dass keine Aussagen darüber vorliegen, wie sich die VRE-Situation ohne Durchführung eines Screenings und von Isolierungsmaßnahmen entwickelt hätte. Schmidt-Hieber et al. hingegen berichten von einer erfolgreichen Eindämmung eines Ausbruchs Vancomycin-resistenter Enterokokken auf einer Hämato-Onkologischen Station u. a. durch systematisches Screening und Isolierung VRE-positiver Patienten (Schmidt-Hieber et al. 2007). Ansichten und Erfahrungen scheinen hier durchaus kontrovers zu sein. Der Nutzen diverser Hygienemaßnahmen ist darüber hinaus im Einzelnen oft nur schwer zu bestimmen, häufig ist erst durch eine Kombination verschiedener Maßnahmen ein positiver Effekt zu erzielen (Simon et al. 2004, Werner et al. 2008a). Bezüglich des Vergleichs der Inzidenz der VRE-Bakteriämie an der

beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung sei Folgendes erwähnt: Die klinischen Daten zeigen bisher nach Umstellung des VRE-Managements keinen Anstieg der Inzidenz von VRE-Bakteriämien. Bedenkt man aber, dass eine klinisch relevante Enterokokken-Infektion oft aus einer asymptomatischen Besiedlung des Intestinaltrakts hervorgeht (Zirakzadeh und Patel 2006), so sollte die Inzidenz der VRE-Bakteriämien/Infektionen weiterhin beobachtet werden. Bei Risikopatienten (siehe Punkt 1.2.10) kann darüber hinaus ein engmaschiges Monitoring der VRE-Situation von Vorteil sein. Es lässt sich nicht ausschließen, dass es durch die Einstellung des VRE-Screenings sowie durch die Aufhebung von Isolierungsmaßnahmen bei VRE-positiven Patienten zu einer Ausbreitung von VRE und einem Anstieg der VRE-Kolonisierungsrate an diesem Krankenhaus kommt, die sich langfristig in einer erhöhten Inzidenz von VRE-Bakteriämien und -Infektionen, v. a. bei immunsupprimierten Patienten, niederschlagen könnte.

Weitere Aspekte, die im Hinblick auf den Umfang der Hygienemaßnahmen im Rahmen des VRE-Managements berücksichtigt werden müssen, sind der Arbeits- und Zeitaufwand, der für ihre Umsetzung aufgebracht werden muss, die Kosten, die diesbezüglich anfallen, sowie die Belastung des Patienten durch Untersuchungen und Isolierungsmaßnahmen. Darüber hinaus darf man nicht vergessen, dass es neben VRE eine Vielzahl weiterer bakterieller Erreger gibt, von denen eventuell sogar eine größere Gefahr für den Patienten ausgeht, und welche Maßnahmen, die über die Standardhygiene hinausgehen, verlangen (z. B. MRSA, gram-negative ESBL- und Carbapenemase-Bildner). Eventuell müssen Prioritäten gesetzt werden, um die Kapazitäten einer klinischen Einrichtung nicht zu überschreiten.

Unter Berücksichtigung aller Fakten ging man an dem beschriebenen Krankenhaus der Maximalversorgung 2010 im VRE-Management auf die Standardhygiene zurück. Darüberhinaus werden Transplantationspatienten weiterhin auf VRE gescreent und auch Isolierungsmaßnahmen nach wie vor durchgeführt, denn Transplantationspatienten gehören neben anderen zur Gruppe der Risikopatienten für VRE-Infektionen (Vonberg et al. 2007). Russell et al. untersuchten, welche Folgen eine Kolonisierung mit VRE für den Patienten hat. Sie zeigten, dass bei Lebertransplantationspatienten, die mit VRE kolonisiert sind, im Gegensatz zu nicht-kolonisierten Patienten

ein höheres VRE-Infektions-Risiko besteht und auch die Mortalität höher liegt (Russell et al. 2008).

Doch auch wenn von VRE derzeit für den größten Teil der Patienten der beschriebenen südwestdeutschen Einrichtung keine klinisch relevante Gefährdung auszugehen scheint, dürfen diese multiresistenten Erreger nicht unterschätzt werden, vor allem vor dem Hintergrund ihres langen Persistierens im Intestinaltrakt (Baden et al. 2001, Montecalvo et al. 1995, Roghmann et al. 1997) sowie auf unbelebten Flächen (Kramer et al. 2006), der Übertragung von Resistenzen auf gefährlichere Erreger (Chang et al. 2003, Miller et al. 2002) und dem Wissen, dass zumindest bei bestimmten Patientengruppen bereits eine Kolonisierung mit VRE das VRE-Infektionsrisiko erhöht sowie zu einer erhöhten Mortalität führt (Russell et al. 2008).

5. Zusammenfassung

Vancomycin-resistente *E. faecalis*- und *E. faecium*-Stämme traten erstmals 2005 in einem südwestdeutschen Krankenhaus der Maximalversorgung auf und blieben auch in den darauf folgenden Jahren prävalent. Neben VRE-Infektionen einzelner Patienten wurden kleinere Ausbrüche dokumentiert. 2007 wurden aufgrund der anhaltenden Problematik ein VRE-Screening für Risikopatienten und Isolierungsmaßnahmen eingeführt. VRE-Isolate aus diesem Zeitraum wurden im Hinblick auf verschiedene Charakteristika untersucht, die mutmaßlich relevant für Virulenz und erhöhte Ausbreitungstendenz bei Stämmen der Spezies *E. faecium* sind, und um mögliche Übertragungswege (inter-/intra-hospitale Ausbreitung) zu identifizieren. Dabei wurde eine infektions-epidemiologische Datenerfassung mit einer molekular-biologischen Analyse der Erreger kombiniert.

Insgesamt wurden 180 Vancomycin-resistente Enterokokken-Isolate aus den Jahren 2005-2010 von 179 Patienten untersucht, darunter 1 *E. faecalis*- und 179 *E. faecium*-Stämme. Die Speziesidentifizierung sowie Empfindlichkeitstests für zwölf Antibiotika erfolgten nach mikrobiologischen Routineverfahren. Weiterhin wurden die Resistenzgene *vanA/vanB* und die Virulenzfaktoren/epidemischen Marker *esp* und *hyl* per PCR detektiert. Eine repräsentative Auswahl der untersuchten Isolate wurde mit PFGE und MLST typisiert. Zusätzlich wurden die klinischen und epidemiologischen Daten eines jeden Patienten eruiert.

Alle *E. faecium*-Isolate zeigten sich Ampicillin-resistent, desweiteren wurde bei allen Isolaten das *esp*-Gen nachgewiesen. Beide Eigenschaften sind typische Charakteristika Hospital-assoziiierter *E. faecium*-Stämme, ebenso wie das Vorhandensein des *hyl*-Gens, das in 145 Isolaten detektiert wurde. In 38 Fällen wurde die Vancomycin-Resistenz durch das *vanA*-Gencluster, in 142 Fällen durch das *vanB*-Gencluster kodiert. Die Charakterisierung mittels PFGE ließ eine große genotypische Heterogenität unter den untersuchten Isolaten erkennen, identifizierte aber auch Cluster näher verwandter Stämme. Bei einzelnen Isolaten aus PFGE-Subclustern wurde zusätzlich der zugehörige MLST-Sequenztyp bestimmt. Die Ergebnisse bestätigen das heterogene Bild, das die PFGE zeichnet, da verschiedene Sequenztypen nachgewiesen wurden. Diese gehören jedoch alle zum klonalen Komplex 17, der ausschließlich Hospital-assoziierte *E. faecium*-Stämme repräsentiert.

Diese Studie identifizierte ein polyklonales Geschehen mit Hospital-assoziierten Vancomycin-resistenten, hauptsächlich *vanB*-positiven *E. faecium*-Stämmen (78,8 %), was für einen frequenten Eingang von *E. faecium*-Stämmen aus anderen klinischen Einrichtungen und somit für eine interhospitalen Ausbreitung (zusätzlich zu einer intrahospitalen Ausbreitung einzelner Stämme) spricht. Die Rate *vanB*-positiver VRE ist im Vergleich zu Surveillance-Ergebnissen anderer deutscher Kliniken der letzten Jahre, wo *vanA*-positive *E. faecium*-Stämme das Geschehen dominieren, recht hoch. Der horizontale Transfer des *vanB*-Genclusters (auch in Vancomycin-sensible *E. faecium*-Stämme), zusätzlich zu einer klonalen Ausbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken des *vanB*-Typs könnte zu der bestehenden VRE-Prävalenz beitragen. Neben der Glycopeptid- und Ampicillin-Resistenz zeigten sich die untersuchten Isolate unempfindlich gegen eine Vielzahl weiterer Antibiotika, was deren Ausbreitung unter Antibiotika-Selektionsdruck begünstigt. Die Abgrenzung der untersuchten von animalen VRE-Isolaten wurde anhand der Gegenüberstellung relevanter Stammeigenschaften bestätigt.

6. Abstract

Vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium* (VRE) first appeared in 2005 and remained with increased frequencies in subsequent years in a tertiary care center in southwestern Germany. VRE scenarios included some smaller outbreaks and, unfortunately, also fatal single cases. VRE screening and an isolation policy was applied in 2007. We investigated VRE isolates from this time period to identify relevant strain characteristics suspiciously involved in enterococcal virulence and/or epidemic spread and to follow supposed routes of transmission.

Vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolates dating from 2005 until 2010 from 179 patients were selected for investigation. Species and antibiotic susceptibility for 12 antibiotics was identified by routine microbiological procedures. Isolates were further characterized by PCRs for *vanA*, *vanB* and virulence genes/epidemic markers (*esp*, *hyl*). Moreover, PFGE and MLST were applied for typing of a representative subset of isolates. In addition, clinical and epidemiological data of each patient were collected.

In total, 180 vancomycin-resistant enterococcal isolates (1 *E. faecalis*, 179 *E. faecium*) were selected. All *E. faecium* isolates were resistant to ampicillin and carried the *esp*-gene. These are typical characteristics of hospital-associated *E. faecium* and accordingly the *hyl*-gene was detected in 145 strains. Vancomycin resistance was encoded by *vanA* (n=38) and *vanB* (n=142). Characterization by PFGE demonstrated a high genotypical heterogeneity among the investigated isolates but also identified clusters of related strains. MLST types were determined for isolates of PFGE sub-clusters revealing various sequence types but all representing hospital-associated strains (MLST CC17).

Our study identified a polyclonal setting with vancomycin-resistant hospital-associated *E. faecium* mainly of the *vanB* type (78,8 %) thus demonstrating a frequent introduction (interhospital spread) of *E. faecium*. The comparably high rate of *vanB*-VRE is contrary to other German hospital surveillance results from recent years where *vanA*-type *E. faecium* dominate. Horizontal transfer of *vanB* (also into vancomycin-susceptible *E. faecium*) in addition to a clonal spread of *vanB* type VRE might contribute to the present VRE prevalence. The isolates were not only resistant to ampicillin and the glycopeptides vancomycin and teicoplanin but also to many other antibiotics which might support their spread under antibiotic selective pressure.

The differentiation of the investigated isolates from animal VRE-strains was confirmed by relevant strain-characteristics.

7. Literaturverzeichnis

- a) F. M. **Aarestrup**, Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, L. B. Jensen. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**; 37: 127-137
- b) F. M. **Aarestrup**. Characterization of Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from Broilers and Pigs in Denmark: Genetic Evidence that Persistence of GRE in Pig Herds is associated with Coselection by Resistance to Macrolides. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 2774-2777
- F. M. **Aarestrup**, A. M. Seyfarth, H.-D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, F. Bager. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 2054-2059
- F. M. **Aarestrup**, P. Butaye, W. Witte. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: M. S. Gilmore (Hrsg.). *The enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press. Washington, D.C. **2002**: 55-100
Zitiert nach Werner et al. 2008a
- ABBIODISK**. EAS 009 – Etest® Application Sheet 009. Online in Internet: <http://www.abbiodisk.com/pdf/eas/M0000148.pdf> (Datenstand 19.10.2011)
- M. **Abele-Horn**, U. Vogel, I. Klare, C. Konstabel, R. Trabold, R. Kurihara, W. Witte, W. Kreth, P.-G. Schlegel, H. Claus. Molecular Epidemiology of Hospital-Acquired Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 4009-4013
- G. **Amit**, P. Cohen, Z. Ackerman. Nitrofurantoin-induced chronic active hepatitis. *Isr Med Assoc J* **2002**; 4: 184-186
- J. M. **Andrews**. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *J Antimicrob Chemother* **2008**; 62: 256-278
- M. **Arthur**, C. Molinas, F. Depardieu, P. Courvalin. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* **1993**; 175: 117-127
- M. **Arthur**, F. Depardieu, G. Gerbaud, M. Galimand, R. Leclercq, P. Courvalin. The vanS sensor negatively controls vanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J Bacteriol* **1997**; 179: 97-106
- M. **Arthur**, R. Quintiliani Jr. Regulation of VanA- and VanB-Type Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 375-381
- AWMF – Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften – Arbeitskreis “Krankenhaus- und Praxishygiene”**. Maßnahmen beim Auftreten multiresistenter Erreger (MRE). *Hyg Med* **2009**; 34: 287-292

- L. R. **Baden**, W. Thiemke, A. Skolnik, R. Chambers, J. Strymish, H. S. Gold, R. C. Moellering Jr., G. M. Eliopoulos. Prolonged Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in Long-Term Care Patients and the Significance of "Clearance". Clin Infect Dis **2001**; 33: 1654-1660
- S. **Bärwolff**, H. Grundmann, F. Schwab, A. Tami, M. Behnke, C. Geffers, E. Halle, U. Göbel, R. Schiller, D. Jonas, I. Klare, K. Weist, W. Witte, E. Dinger, K. Beilecke, H. Rüden, P. Gastmeier. Inzidenz der Übertragung von Infektionserregern von einem Intensivpatienten zum anderen. Ergebnisse der SIR-3-Studie. Anaesthesist **2005**; 54: 560-566
- F. **Bager**, F. M. Aarestrup, M. Madsen, H. C. Wegener. Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecium* from Broilers and Pigs Following Discontinued Use of Avoparcin. Microb Drug Resist **1999**; 5: 53-56
- L. **Baldassarri**, L. Bertuccini, M. G. Ammendolia, G. Gherardi, R. Creti. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. Lancet **2001**; 357: 1802
- a) S. A. **Ballard**, K. K. Pertile, M. Lim, P. D. R. Johnson, M. L. Grayson. Molecular Characterization of *vanB* Elements in Naturally Occurring Gut Anaerobes. Antimicrob Agents Chemother **2005**; 49: 1688-1694
- b) S. A. **Ballard**, E. A. Grabsch, P. D. R. Johnson, M. L. Grayson. Comparison of Three PCR Primer Sets for Identification of *vanB* Gene Carriage in Feces and Correlation with Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci: Interference by *vanB*-Containing Anaerobic Bacilli. Antimicrob Agents Chemother **2005**; 49: 77-81
- H. von **Baum**, M. Dettenkofer, A.-M. Fahr, P. Heeg, C. Wendt. Konsensusempfehlung Baden-Württemberg: Umgang mit Patienten mit Glycopeptid-resistenten Enterokokken (GRE)/Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). Hyg Med **2006**; 31: 30-32
- M. C. **Bertolami**, A. A. Faludi, M. Batlouni. Evaluation of the effects of a new fermented milk product (Gaio) on primary hypercholesterolemia. Eur J Clin Nutr **1999**; 53: 97-101
- BfR – Bundesinstitut für Risikobewertung**. Enterokokken – Mikroorganismen mit positiven und negativen Eigenschaften. Online in Internet: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2002/B/enterokokken___mikroorganismen_mit_positiven_und_negativen_eigenschaften-1456.html (Erscheinungsdatum 31.05.2002, Hintergrundinformation B/2002; Datenstand 19.10.2011)
- a) **BgVV – Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin**. Avoparcin als Futterzusatzstoff in der Tierernährung vorläufig verboten. Online in Internet: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1996/01/avoparcin_als_futterzusatzstoff_in_der_tierernaehrung_vorlaeufig_verboten-780.html (Erscheinungsdatum 29.01.1996, Pressedienst 01/1996; Datenstand 17.10.2011)
- b) **BgVV – Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und**

- Veterinärmedizin.** Einsatz des Futterzusatzstoffes Avoparcin wird europaweit verboten. Online in Internet:
http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1996/24/einsatz_des_futterzusatzstoffes_avoparcin_wird_europaweit_verboten-803.html (Erscheinungsdatum 20.12.1996, Pressedienst 24/1996; Datenstand 17.10.2011)
- E. **Bjørkeng**, G. Rasmussen, A. Sundsfjord, L. Sjöberg, K. Hegstad, B. Söderquist. Clustering of polyclonal VanB-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a low-endemic area was associated with CC17-genogroup strains harbouring transferable *vanB2*-Tn5382 and pRUM-like *repA* containing plasmids with *axe-txe* plasmid addiction systems. *APMIS* **2011**; 119: 247-258
- M. **Bonten**, S. Slaughter, M. Hayden, C. Nathan, R. A. Weinstein. The interaction among infection control compliance, prevalence of colonized patients, and risk of spread of vancomycin-resistant enterococci (VRE). 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans **1996**: J9
Zitiert nach Wendt et al. 1998a
- M. J. M. **Bonten**, S. Slaughter, M. K. Hayden, C. Nathan, J. van Voorhis, R. A. Weinstein. External sources of vancomycin-resistant enterococci for intensive care units. *Crit Care Med* **1998**; 26: 2001-2004
- M. J. M. **Bonten**, R. Willems, R. A. Weinstein. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* **2001**; 1: 314-325
- K. **Borgen**, M. Sørum, Y. Wasteson, H. Kruse. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int J Food Microbiol* **2001**; 64: 89-94
- S. **Borgmann**, B. Schulte, C. Wolz, H. Gruber, G. Werner, C. Goerke, I. Klare, K. Beyser, P. Heeg, I. B. Autenrieth. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptid-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect* **2007**; 67: 49-55
- N. **Bourdon**, M. Fines-Guyon, J.-M. Thiolet, S. Maugat, B. Coignard, R. Leclercq, V. Cattoir. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66: 713-721
- J. M. **Boyce**, S. M. Opal, J. W. Chow, M. J. Zervos, G. Potter-Bynoe, C. B. Sherman, R. L. Romulo, S. Fortna, A. A. Medeiros. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 1148-1153
- D. A. **Boyd**, B. M. Willey, D. Fawcett, N. Gillani, M. R. Mulvey. Molecular Characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with Low-Level Vancomycin Resistance Harboring a Novel D-Ala-D-Ser Gene Cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 2667-2672
- N. van den **Braak**, A. van Belkum, M. van Keulen, J. Vliegthart, H. A. Verbrugh,

- H. P. Endtz. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospitalized Patients and Poultry Products in The Netherlands. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 1927-1932
- Brockhaus**, Enzyklopädie in 24 Bänden. Großstadt. Neunter Band. 19. Auflage. F. A. Brockhaus GmbH. Mannheim **1989**
- Brockhaus**, Enzyklopädie in 24 Bänden. Kleinstadt. Zwölfter Band. 19. Auflage. F. A. Brockhaus GmbH. Mannheim **1990**
- Brockhaus**, Enzyklopädie in 24 Bänden. Mittelstadt. Vierzehnter Band. 19. Auflage. F. A. Brockhaus GmbH. Mannheim **1991**
- A. M. **Butler**, M. A. Olsen, L. R. Merz, R. M. Guth, K. F. Woeltje, B. C. Camins, V. J. Fraser. Attributable Costs of Enterococcal Bloodstream Infections in a Nonsurgical Hospital Cohort. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2010**; 31: 28-35
- R. **Callewaert**, M. Hugas, L. de Vuyst. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* **2000**; 57: 33-42
- L. L. **Carias**, S. D. Rudin, C. J. Donskey, L. B. Rice. Genetic Linkage and Cotransfer of a Novel, *vanB* Containing Transposon (Tn5382) and a Low Affinity Penicillin-Binding-Protein 5 Gene in a Clinical Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolate. *J Bacteriol* **1998**; 180: 4426-4434
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention**. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin – United States, 1989-1993. *MMWR* **1993**; 42: 597-599
- J. A. **Centeno**, S. Menéndez, J. L. Rodríguez-Otero. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int J Food Microbiol* **1996**; 33: 307-313
- Y. **Cetinkaya**, P. Falk, C. G. Mayhall. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13: 686-707
- S. **Chang**, D. M. Sievert, J. C. Hageman, M. L. Boulton, F. C. Tenover, F. P. Downes, S. Shah, J. T. Rudrik, G. R. Pupp, W. J. Brown, D. Cardo, S. K. Fridkin. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *N Engl J Med* **2003**; 348: 1342-1347
- S. **Cheng**, F. K. McCleskey, M. J. Gress, J. M. Petroziello, R. Liu, H. Namdari, K. Beninga, A. Salmen, V. G. Del Vecchio. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 1248-1250
- K. J. **Christiansen**, P. A. Tibbett, W. Beresford, J. W. Pearman, R. C. Lee, G. W. Coombs, I. D. Kay, F. G. O'Brien, S. Palladino, C. R. Douglas, P. D. Montgomery, T. Orrell, A. M. Peterson, F. P. Kosaras, J. P. Flexman,

- C. H. Heath, C. A. McCullough. Eradication of a Large Outbreak of a Single Strain of *vanB* Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* at a Major Australian Teaching Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2004**; 25: 384-390
- Y.-C. **Chuang**, J.-T. Wang, M.-L. Chen, Y.-C. Chen. Comparison of an Automated Repetitive-Sequence-Based PCR Microbial Typing System with Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **2010**; 48: 2897-2901
- L. M. **Cintas**, P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, I. F. Nes. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel *sec*-Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Appl Environ Microbiol* **1997**; 63: 4321-4330
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, Pennsylvania, USA) **2008**
- T. M. **Coque**, R. Willems, R. Cantón, R. Del Campo, F. Baquero. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother* **2002**; 50: 1035-1038
- A. C. **Corso**, P.S. Gagetti, M. M. Rodriguez, R. G. Melano, P. G. Ceriana, D. F. Faccone, M. F. Galas. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis* **2007**; 11: 69-75
- P. **Courvalin**. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin Infect Dis* **2006**; 42 (S1): 25-34
- R. **Creti**, M. Imperi, L. Bertuccini, F. Fabretti, G. Orefici, R. Di Rosa, L. Baldassarri. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* **2004**; 53: 13-20
- K. H. **Dahl**, E. W. Lundblad, T. P. Røkenes, Ø. Olsvik, A. Sundsfjord. Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiology* **2000**; 146: 1469-1479
- K. H. **Dahl**, T. P. Røkenes, E. W. Lundblad, A. Sundsfjord. Nonconjugative Transposition of the *vanB* Containing Tn5382-Like Element in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 786-789
- S. **DeLisle**, T. M. Perl. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Road Map on How To Prevent the Emergence and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Chest* **2003**; 123 (S): 504-518
- S. **De Niederhäusern**, C. Sabia, P. Messi, E. Guerrieri, G. Manicardi, M. Bondi. VanA-Type Vancomycin-Resistant Enterococci in Equine and Swine Rectal Swabs and in Human Clinical Samples. *Curr Microbiol* **2007**; 55: 240-246

- L. A. **Devriese**, A. van de Kerckhove, R. Kilpper-Bälz, K. H. Schleifer. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. *Int J Syst Bacteriol* **1987**; 37: 257-259
- L. A. **Devriese**, J. Hommeze, R. Wijfels, F. Haesebrouck. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J Appl Bacteriol* **1991**; 71: 46-50
- L. A. **Devriese**, L. Laurier, P. De Herdt, F. Haesebrouck. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J Appl Bacteriol* **1992**; 72: 29-31
- L. A. **Devriese**, B. Pot, M. D. Collins. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* **1993**; 75: 399-408
- C. A. **DiazGranados**, S. M. Zimmer, M. Klein, J. A. Jernigan. Comparison of Mortality Associated with Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococcal Bloodstream Infections: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis* **2005**; 41: 327-333
- DIMDI – Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information.** Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification (ICD-10-GM), Version **2011**. Online in Internet:
<http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2011/index.htm>
(Datenstand 19.10.2011)
- M.-C. **Domingo**, A. Huletsky, R. Giroux, K. Boissinot, F. J. Picard, P. Lebel, M. J. Ferraro, M. G. Bergeron. High Prevalence of Glycopeptide Resistance Genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* Not Associated with Enterococci in Human Fecal Flora. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 4784-4786
- T. J. **Eaton**, M. J. Gasson. A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* **2002**; 216: 269-275
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. European antimicrobial resistance surveillance system – EARSS.** EARSS Annual Report **2008**. Online in Internet:
http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ears-net/documents/2008_earss_annual_report.pdf (Datenstand 21.09.2011)
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009.** Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Online in Internet:
http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf (Datenstand 21.09.2011)
- J.-S. **Eom**, I.-S. Hwang, B.-Y. Hwang, J.-G. Lee, Y.-J. Lee, H.-J. Cheong, Y.-H. Park,

- S.-C. Park, W.-J. Kim. Emergence of vanA Genotype Vancomycin-Resistant Enterococci with Low or Moderate Levels of Teicoplanin Resistance in Korea. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 1785-1786
- a) **Eucast** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 1.1, April 2010. Online in Internet:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.1.pdf (Datenstand 19.10.2011)
- b) **Eucast** – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Online in Internet:
<http://217.70.33.99/Eucast2/adminShowBreakpoints.jsp> (Datenstand 19.10.2011)
- M. E. **Evans**, K. J. Kortas. Vancomycin Use in a University Medical Center: Comparison with Hospital Infection Control Practices Advisory Committee Guidelines. *Infect Control Hosp Epidemiol* **1996**; 17: 356-359
- A.-M. **Fahr**, I. Klare, U. Eigner, A. Turnwald-Maschler, M. Holfelder, G. Porsch, W. Witte. Increasing incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in German hospitals. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V., Münster **2004**: IKP002 (Poster)
Zitiert nach Klare et al. 2005
- P. S. **Falk**, J. Winnike, C. Woodmansee, M. Desai, C. G. Mayhall. Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Burn Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2000**; 21: 575-582
- K. **Fehlhaber**. Streptokokken- und "unspezifische" Lebensmittelvergiftungen. In: H.-J. Sinell (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene. 4. Auflage. Parey Verlag. Stuttgart **2004**: 79-80
- M. H. **Fraher**, G. D. Corcoran, S. Creagh, E. Feeney. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with no prior exposure to daptomycin. *J Hosp Infect* **2007**; 65: 376-378
- A. P. **Francisco**, M. Bugalho, M. Ramirez, J. A. Carriço. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* **2009**; 10: 152
- A. R. **Freitas**, C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, T. M. Coque, L. Peixe. Dispersion of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates Belonging to Major Clonal Complexes in Different Portuguese Settings. *Appl Environ Microbiol* **2009**; 75: 4904-4908
- A. R. **Freitas**, A. P. Tedim, C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, G. Werner, J. A. Laverde-Gomez, R. Cantón, L. Peixe, F. Baquero, T. M. Coque. Global Spread of the *hyl*_{Efm} Colonization-Virulence Gene in Megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 2660-2665

- J. **Freney**, S. Bland, J. Etienne, M. Desmonceaux, J. M. Boeufgras, J. Fleurette. Description and evaluation of the semiautomated 4-hour rapid ID 32 Strep method for identification of streptococci and members of related genera. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 2657-2661
- R. **Geisel**, F.-J. Schmitz, T. A. Wichelhaus. Aminoglycoside. In: T. A. Wichelhaus. *Antibiotika – Moderne Therapiekonzepte*. 1. Auflage. UNI-MED-Verlag. Bremen **2004/2005**: 61-67
- a) Á. **Ghidán**, É. J. Kaszanyitzky, O. Dobay, K. Nagy, S. G. B. Amyes, F. Rozgonyi. Distribution and genetic relatedness of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from healthy slaughtered chickens in Hungary from 2001 to 2004. *Acta Vet Hung* **2008**; 56: 13-25
- b) Á. **Ghidán**, O. Dobay, É. J. Kaszanyitzky, P. Samu, S. G. B. Amyes, K. Nagy, F. Rozgonyi. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) still persist in slaughtered poultry in Hungary 8 years after the ban on avoparcin. *Acta Microbiol Immunol Hung* **2008**; 55: 409-417
- N. N. T. **Goemaere**, K. Grijm, P. T. W. van Hal, M. A. den Bakker. Nitrofurantoin-induced pulmonary fibrosis: a case report. *J Med Case Reports* **2008**; 2: 169
- R. V. **Goering**, T. D. Duensing. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. *J Clin Microbiol* **1990**; 28: 426-429
- R. V. **Goering**. The Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: An Overview of Principles, Applications and Interpretation. In: S. Specter, M. Bendinelli, H. Friedman (Hrsg.). *Infectious Agents and Pathogenesis: Rapid Detection of Infectious Agents*. Plenum Press. New York **1998**: 131-158
- J. W. **Gray**, D. Stewart, S. J. Pedler. Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**; 35: 1943-1945
- U. **Groß**. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart **2006**: 99-100, 175
- H. **Grundmann**, S. Bärwolff, A. Tami, M. Behnke, F. Schwab, C. Geffers, E. Halle, U. B. Göbel, R. Schiller, D. Jonas, I. Klare, K. Weist, W. Witte, K. Beck-Beilecke, M. Schumacher, H. Rüden, P. Gastmeier. How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Crit Care Med* **2005**; 33: 946-951
- L. **Guardabassi**, H. Christensen, H. Hasman, A. Dalsgaard. Members of the Genera *Paenibacillus* and *Rhodococcus* Harbor Genes Homologous to Enterococcal Glycopeptide Resistance Genes *vanA* and *vanB*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 4915-4918
- L. **Guardabassi**, B. Perichon, J. van Heijenoort, D. Blanot, P. Courvalin. Glyco-

- peptide Resistance *vanA* Operons in *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. Antimicrob Agents Chemother **2005**; 49: 4227-4233
- L. **Guardabassi**, Y. Agersø. Genes homologous to glycopeptide resistance *vanA* are widespread in soil microbial communities. FEMS Microbiol Lett **2006**; 259: 221-225
- E. **Halle**, J. Padberg, S. Rosseau, I. Klare, G. Werner, W. Witte. Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolated from a Septic Patient: Report of First Isolates in Germany. Infection **2004**; 32: 182-183
- J. M. T. **Hamilton-Miller**, S. Shah. Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL Crystal systems. J Med Microbiol **1999**; 48: 695-696
- V. J. **Harwood**, M. Brownell, W. Perusek, J. E. Whitlock. Vancomycin-Resistant *Enterococcus spp.* Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. Appl Environ Microbiol **2001**; 67: 4930-4933
- E. **Heikens**, M. J. M. Bonten, R. J. L. Willems. Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162. J Bacteriol **2007**; 189: 8233-8240
- B. H. **Heintz**, J. Halilovic, C. L. Christensen. Vancomycin-Resistant Enterococcal Urinary Tract Infections. Pharmacotherapy **2010**; 30: 1136-1149
- S. **Henard**, V. Gendrin, L. Simon, N. Jouzeau, N. Vernier, J.-M. Thiolet, B. Coignard, C. Rabaud. Control of a regional outbreak of *vanA* glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium*, Eastern France, 2004-2009. Int J Hyg Environ Health **2011**; 214: 265-270
- I. A. **Herrero**, N. C. Issa, R. Patel. Nosocomial Spread of Linezolid-Resistant, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. N Engl J Med **2002**; 346: 867-869
- HICPAC – Hospital Infection Control Practices Advisory Committee.**
Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Infect Control Hosp Epidemiol **1995**; 16: 105-113
- W. L. **Homan**, D. Tribe, S. Poznanski, M. Li, G. Hogg, E. Spalburg, J. D. A. van Embden, R. J. L. Willems. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol **2002**; 40: 1963-1971
- IfSG – Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz)**, vom 20. Juli **2000** (BGBl. I S. 1045), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S. 1622)
- L. B. **Jensen**, P. Ahrens, L. Dons, R. N. Jones, A. M. Hammerum, F. M. Aarestrup.

- Molecular Analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* Isolated from Animals and Humans. J Clin Microbiol **1998**; 36: 437-442
- C. A. **Kauffman**. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother **2003**; 51 (S3): 23-30
- M. **Kawalec**, M. Gniadkowski, W. Hryniewicz. Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Hospital in Gdańsk, Poland, due to Horizontal Transfer of Different Tn1546-Like Transposon Variants and Clonal Spread of Several Strains. J Clin Microbiol **2000**; 38: 3317-3322
- M. **Kawalec**, M. Gniadkowski, M. Zaleska, T. Ozorowski, L. Konopka, W. Hryniewicz. Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* of the Phenotype VanB in a Hospital in Warsaw, Poland: Probable Transmission of the Resistance Determinants into an Endemic Vancomycin-Susceptible Strain. J Clin Microbiol **2001**; 39: 1781-1787
- F. H. **Kayser**. Bakterien als Krankheitserreger: *Streptococcus* und *Enterococcus*. In: F. H. Kayser, K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie: Verstehen – Lernen – Nachschlagen. 10. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart **2001**: 245-254
- KGU – Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität**. Das Universitätsklinikum Frankfurt in **2009** in Zahlen. Online in Internet: <http://www.kgu.de/klinikum/d/daten-fakten-zahlen/das-universitaetsklinikum-frankfurt-in-2009-in-zahlen.html> (Datenstand 20.10.2011)
- a) I. **Klare**, H. Heier, H. Claus, G. Böhme, S. Marin, G. Seltmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova, W. Witte. *Enterococcus faecium* Strains with *vanA*-Mediated High-Level Glycopeptide Resistance Isolated from Animal Foodstuffs and Fecal Samples of Humans in the Community. Microb Drug Resist **1995**; 1: 265-272
- b) I. **Klare**, H. Heier, H. Claus, R. Reissbrodt, W. Witte. *VanA*-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiol Lett **1995**; 125: 165-172
- I. **Klare**, D. Badstübner, C. Konstabel, G. Böhme, H. Claus, W. Witte. Decreased Incidence of VanA-Type Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Meat and from Fecal Samples of Humans in the Community after Discontinuation of Avoparcin Usage in Animal Husbandry. Microb Drug Resist **1999**; 5: 45-52
- I. **Klare**, C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner, W. Witte. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol **2003**; 88: 269-290
- I. **Klare**, W. Witte, T. A. Wichelhaus. Glycopeptide. In: T. A. Wichelhaus. Antibiotika – Moderne Therapiekonzepte. 1. Auflage. UNI-MED-Verlag. Bremen **2004/2005**: 93-98

- I. **Klare**, C. Kostabel, S. Mueller-Bertling, G. Werner, B. Strommenger, C. Kettlitz, S. Borgmann, B. Schulte, D. Jonas, A. Serr, A. M. Fahr, U. Eigner, W. Witte. 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: 815-825
- I. **Klare**, G. Werner, U. Geringer, C. Fleige, W. Witte. Resistance frequencies to 18 antibiotics in *vanA*- and *vanB*-positive *E. faecium* isolates from German hospitals between 2008 and 2010. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V., Essen **2011**: ERP14 (Poster). Gedruckte Zusammenfassung: *Int J Med Microbiol* **2011**; 301 (S1): 21
- J. **Kleer**. Mikroorganismen in Lebensmitteln: Bedeutung. In: H.-J. Sinell (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene. 4. Auflage. Parey Verlag. Stuttgart **2004**: 9-11
- G. **Klein**, A. Pack, G. Reuter. Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany. *Appl Environ Microbiol* **1998**; 64: 1825-1830
- M. **Knoll**, G. Daeschlein, J. Okpara-Hofmann, I. Klare, D. Wilhelms, H.-H. Wolf, M. Borneff-Lipp. Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in a Hematological Oncology Ward and Hygienic Preventive Measures. A Long-Term Study. *Onkologie* **2005**; 28: 187-192
- K. S. **Ko**, J. Y. Baek, J.-Y. Lee, W. S. Oh, K. R. Peck, N. Y. Lee, W. G. Lee, K. Lee, J.-H. Song. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Korea. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 2303-2306
- A. **Kramer**, I. Schwebke, G. Kampf. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* **2006**; 6: 130
- M. **Kresken**, E. Leitner, H. Seifert, G. Peters, C. von Eiff. Susceptibility of clinical isolates of frequently encountered bacterial species to tigecycline one year after the introduction of this new class of antibiotics: results of the second multicentre surveillance trial in Germany (G-TEST II, 2007). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2009**; 28: 1007-1011
- R. **Kroker**, R. Scherkl, F. R. Ungemach. Chemotherapie bakterieller Infektionen: Nitrofurane. In: H.-H. Frey, W. Löscher (Hrsg.). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 2. Auflage. Enke Verlag. Stuttgart **2002**: 387-388
- I. **Kühn**, A. Iversen, M. Finn, C. Greko, L. G. Burman, A. R. Blanch, X. Vilanova, A. Manero, H. Taylor, J. Caplin, L. Domínguez, I. A. Herrero, M. A. Moreno, R. Möllby. Occurrence and Relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci in Animals, Humans, and the Environment in Different European Regions. *Appl Environ Microbiol* **2005**; 71: 5383-5390
- T.-L. **Lauderdale**, L. C. McDonald, Y.-R. Shiau, P.-C. Chen, H.-Y. Wang, J.-F. Lai,

- M. Ho. Vancomycin-Resistant Enterococci from Humans and Retail Chickens in Taiwan with Unique VanB Phenotype – *vanA* Genotype Incongruence. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 525-527
- J. A. **Laverde-Gomez**, W. van Schaik, A. R. Freitas, T. M. Coque, K. E. Weaver, M. V. Francia, W. Witte, G. Werner. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hyl*_{Efm} genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *Int J Med Microbiol* **2011**; 301: 165-175
- H. L. **Leavis**, R. J. L. Willems, J. Top, E. Spalburg, E. M. Mascini, A. C. Fluit, A. Hoepelman, A. J. de Neeling, M. J. M. Bonten. Epidemic and Nonepidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium*. *Emerging Infectious Diseases* **2003**; 9: 1108-1115
- H. L. **Leavis**, R. J. L. Willems, J. Top, M. J. M. Bonten. High-Level Ciprofloxacin Resistance from Point Mutations in *gyrA* and *parC* Confined to global Hospital-Adapted Clonal Lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 1059-1064
- F. **Lebreton**, F. Depardieu, N. Bourdon, M. Fines-Guyon, P. Berger, S. Camiade, R. Leclercq, P. Courvalin, V. Cattoir. D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55: 4606-4612
- R. **Leclercq**, E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* **1988**; 319: 157-161
- S. W. **Lemmen**, H. Häfner, D. Zolldann, S. Stanzel, R. Lütticken. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect* **2004**; 56: 191-197
- C. H. **Lester**, N. Frimodt-Møller, T. L. Sørensen, D. L. Monnet, A. M. Hammerum. In Vivo Transfer of the *vanA* Resistance Gene from an *Enterococcus faecium* Isolate of Animal Origin to an *E. faecium* Isolate of Human Origin in the Intestines of Human Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 596-599
- P. K. **Linden**, A. W. Pasculle, R. Manez, D. J. Kramer, J. J. Fung, A. D. Pinna, S. Kusne. Differences in Outcomes for Patients with Bacteremia Due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* or Vancomycin-Susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis* **1996**; 22: 663-670
- P. K. **Linden**. Treatment Options for Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *Drugs* **2002**; 62: 425-441
- L. Y. **Lior**, M. Litt, J. Hockin et al. Vancomycin-resistant enterococci arrives in Canada: a case-control analysis of the call bell outbreak. 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans **1996**: C15
Zitiert nach Wendt et al. 1998a
- L. L. **Livornese Jr.**, S. Dias, C. Samel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May,

- P. Pitsakis, G. Woods, D. Kaye, M. E. Levison, C. C. Johnson. Hospital-acquired Infection with Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Transmitted by Electronic Thermometers. *Ann Int Med* **1992**; 117: 112-116
- a) H. **Lode**, R. Stahlmann (Hrsg.); G. Höffken, R. Schoeller-Wiley, M. Kresken, H. Pretorius. Wichtige Erreger in Klinik und Praxis – *Enterococcus faecalis*. *ZCT* **2005**; 3: 19
- b) H. **Lode**, R. Stahlmann (Hrsg.); G. Höffken, R. Schoeller-Wiley, M. Kresken, H. Pretorius. Wichtige Erreger in Klinik und Praxis – *Enterococcus faecium*. *ZCT* **2005**; 4: 27
- B. A. **Logsdon**, K. R. Lee, G. Luedtke, F. F. Barrett. Evaluation of Vancomycin Use in a Pediatric Teaching Hospital Based on CDC Criteria. *Infect Control Hosp Epidemiol* **1997**; 18: 780-782
- J. K. **Long**, T. K. Choueiri, G. S. Hall, R. K. Avery, M. A. Sekeres. Daptomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in a Patient with Acute Myeloid Leukemia. *Mayo Clin Proc* **2005**; 80: 1215-1216
- M. **López**, Y. Sáenz, B. Rojo-Bezarez, S. Martínez, R. del Campo, F. Ruiz-Larrea, M. Zarazaga, C. Torres. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol* **2009**; 133: 172-178
- D. E. **Low**, N. Keller, A. Barth, R. N. Jones. Clinical Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Geographic Resistance Patterns of Enterococci: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* **2001**; 32 (S2): 133-145
- W. **Ludwig**, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman. Taxonomic outline of the phylum *Firmicutes*. In: P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. B. Whitman (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3, The Firmicutes*. 2. Auflage. Springer Verlag. Dordrecht, Heidelberg, London, New York **2009**: 15-18
- B. **Lund**, C. Edlund. Bloodstream Isolates of *Enterococcus faecium* Enriched with the Enterococcal Surface Protein Gene, *esp*, Show Increased Adhesion to Eukaryotic Cells. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 5183-5185
- G. L. **Mandell**, D. Kaye, M. E. Levison, E. W. Hook. Enterococcal Endocarditis: An Analysis of 38 Patients Observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center. *Arch Intern Med* **1970**; 125: 258-264
- E. M. **Mascini**, M. J. M. Bonten. Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11 (S4): 43-56
- M. **Mielke**, G. Werner, Y. Pfeiffer, W. Witte. Das Problem der nosokomialen Infektionen und Antibiotikaresistenz. Online in Internet:

http://www.rki.de/clin_226/nn_206444/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/No_sokomiale__Infektionen/Uebersicht__NI,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Uebersicht_NI.pdf (Erscheinungsdatum 10.03.2011; Datenstand 17.10.2011)

- D. **Miller**, V. Urdaneta, A. Weltman, S. Park. Public Health Dispatch: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania, 2002. MMWR **2002**; 51: 902
- A. G. **Miranda**, K. V. Singh, B. E. Murray. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gelelectrophoresis may be a useful epidemiological tool. J Clin Microbiol **1991**; 29: 2752-2757
- R. C. **Moellering** Jr. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Infect Dis **1998**; 26: 1196-1199
- M. A. **Montecalvo**, H. Horowitz, C. Gedris, C. Carbonaro, F. C. Tenover, A. Issah, P. Cook, G. P. Wormser. Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. Antimicrob Agents Chemother **1994**; 38: 1363-1367
- M. A. **Montecalvo**, H. de Lencastre, M. Carraher, C. Gedris, M. Chung, K. VanHorn, G. P. Wormser. Natural History of Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. Infect Control Hosp Epidemiol **1995**; 16: 680-685
- D. **Morrison**, N. Woodford, S. P. Barrett, P. Sisson, B. D. Cookson. DNA Banding Pattern Polymorphism in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Criteria for Defining Strains. J Clin Microbiol **1999**; 37: 1084-1091
- a) B. E. **Murray**. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev **1990**; 3: 46-65
- b) B. E. **Murray**, K. V. Singh, J. D. Heath, B. R. Sharma, G. M. Weinstock. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol **1990**; 28: 2059-2063
- T. **Naas**, N. Fortineau, R. Snanoudj, C. Spicq, A. Durrbach, P. Nordmann. First Nosocomial Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Expressing a VanD-Like Phenotype Associated with a *vanA* Genotype. J Clin Microbiol **2005**; 43: 3642-3649
- A. N. **Neely**, M. P. Maley. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. J Clin Microbiol **2000**; 38: 724-726
- D. P. **Nicolau**, M. N. Marangos, C. H. Nightingale, K. B. Patel, B. W. Cooper, R. Quintiliani Jr, P. Courvalin, R. Quintiliani. Efficacy of vancomycin and teicoplanin alone and in combination with streptomycin in experimental, low-level vancomycin-resistant, VanB-type *Enterococcus faecalis* endocarditis. Antimicrob Agents Chemother **1996**; 40: 55-60
- O. **Nilsson**, C. Greko, J. Top, A. Franklin, B. Bengtsson. Spread without known

selective pressure of a vancomycin-resistant clone of *Enterococcus faecium* among broilers. J Antimicrob Chemother **2009**; 63: 868-872

NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, Issued June 1999. Am J Infect Control **1999**; 27: 520-532

A. H. **Norris**, J. P. Reilly, P. H. Edelstein, P. J. Brennan, M. G. Schuster. Chloramphenicol for the Treatment of Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. Clin Infect Dis **1995**; 20: 1137-1144

G. A. **Noskin**, V. Stosor, I. Cooper, L. R. Peterson. Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci on Fingertips and Environmental Surfaces. Infect Control Hosp Epidemiol **1995**; 16: 577-581

C. **Oancea**, I. Klare, W. Witte, G. Werner. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Antimicrob Chemother **2004**; 54: 232-235

D. **Panesso**, M. C. Montealegre, S. Rincón, M. F. Mojica, L. B. Rice, K. V. Singh, B. E. Murray, C. A. Arias. The *hyl_{Efm}* gene in pHyl_{Efm} of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. BMC Microbiology **2011**; 11: 20

J. W. **Pearman**. 2004 Lowbury Lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci – from disaster to ongoing control. J Hosp Infect **2006**; 63: 14-26

PEG – Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V., Arbeitsgemeinschaft „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“. **PEG-Studien 2001/2004/2007.** Online in Internet: http://www.p-e-g.org/ag_resistenz/main.htm (Datenstand 17.05.2011)

A. **Petersen**, M. S. Chadfield, J. P. Christensen, H. Christensen, M. Bisgaard. Characterization of Small-Colony Variants of *Enterococcus faecalis* Isolated from Chickens with Amyloid Arthropathy. J Clin Microbiol **2008**; 46: 2686-2691

A. **Podbielski**, R. Lütticken. Die Familie der Streptococcaceae: Enterokokken. In: W. Köhler, H. J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, H. Pfister, G. Pulverer (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag. München, Jena **2001**: 273-274

T. L. **Poole**, M. E. Hume, L. D. Campbell, H. M. Scott, W. Q. Alali, R. B. Harvey. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Community Wastewater from a Semiclosed Agri-Food System in Texas. Antimicrob Agents Chemother **2005**; 49: 4382-4385

L. A. **Puzniak**, K. N. Gillespie, T. Leet, M. Kollef, L. M. Mundy. A Cost-Benefit Analysis of Gown Use in Controlling Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Transmission: Is It Worth the Price? Infect Control Hosp Epidemiol **2004**; 25:

418-424

Zitiert nach Simon et al. 2004

- J. **Quale**, D. Landman, G. Saurina, E. Atwood, V. DiTore, K. Patel. Manipulation of a Hospital Antimicrobial Formulary to Control an Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis* **1996**; 23: 1020-1025
- R. **Quintiliani Jr.**, P. Courvalin. Characterization of Tn 1547, a composite transposon flanked by the IS 16 and IS256-like elements, that confers vancomycin-resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. *Gene* **1996**; 172: 1-8
- I. I. **Raad**, H. A. Hanna, R. Y. Hachem, T. Dvorak, R. B. Arbuckle, G. Chaiban, L. B. Rice. Clinical-Use-Associated Decrease in Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* to Linezolid: a Comparison with Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 3583-3585
- S. **Rahim**, S. K. Pillai, H. S. Gold, L. Venkataraman, K. Inghima, R. A. Press. Linezolid-Resistant, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Infection in Patients without Prior Exposure to Linezolid. *Clin Infect Dis* **2003**; 36: e146-e148
- L. B. **Rice**, L. L. Carias, C. L. Donskey, S. D. Rudin. Transferable, Plasmid-Mediated VanB-Type Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 963-964
- L. B. **Rice**, L. Carias, S. Rudin, C. Vael, H. Goossens, C. Konstabel, I. Klare, S. R. Nallapareddy, W. Huang, B. E. Murray. A Potential Virulence Gene, *hyl*_{EFM}, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *J Infect Dis* **2003**; 187: 508-512
- L. B. **Rice**, V. Laktičova, L. L. Carias, S. Rudin, R. Hutton, S. H. Marshall. Transferable Capacity for Gastrointestinal Colonization in *Enterococcus faecium* in a Mouse Model. *J Infect Dis* **2009**; 199: 342-349
- RKI – Robert Koch-Institut**. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007 – Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin* **2008**; 23: 179-189
- RKI – Robert Koch-Institut**. Antibiotika-Resistenz-Surveillance **ARS 2008-2010**. Online in Internet: <https://ars.rki.de> (Datenstand: 17.05.2011)
- RKI – Robert Koch-Institut**. Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009. *Epidemiologisches Bulletin* **2010**; 44: 427-436
- M.-C. **Roghamann**, S. Qaiyumi, J. A. Johnson, R. Schwalbe, J. G. Morris Jr. Recurrent Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Bacteremia in a Leucemia Patient Who Was Persistently Colonized with Vancomycin-Resistant Enterococci for Two Years. *Clin Infect Dis* **1997**; 24: 514-515
- Rosko Diagnostica**. Identification of Enterococci. Online in Internet:

http://rosco.dk/pdf/productsheet_-_Enterococci_-_GODKENDT_SVN_140105-B_web-version.pdf (Datenstand 08.07.2012)

- K. L. **Ruoff**, L. de la Maza, M. J. Murtagh, J. D. Spargo, M. J. Ferraro. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **1990**; 28: 435-437
- D. L. **Russell**, A. Flood, T. E. Zaroda, C. Acosta, M. M. S. Riley, R. W. Busuttill, D. A. Pegues. Outcomes of Colonization with MRSA and VRE Among Liver Transplant Candidates and Recipients. *Am J Transplant* **2008**; 8: 1737-1743
- T. **Rybkin**, J.-L. Mainardi, W. Sougakoff, E. Collatz, L. Gutmann. Penicillin-Binding Protein 5 Sequence Alterations in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* with Different Levels of β -Lactam Resistance. *J Infect Dis* **1998**; 178: 159-163
- C. D. **Salgado**, B. M. Farr. Outcomes Associated With Vancomycin-Resistant Enterococci: A Meta-Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2003**; 24: 690-698
- P. **Sarantinopoulos**, C. Andrighetto, M. D. Georgalaki, M. C. Rea, A. Lombardi, T. M. Cogan, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int Dairy J* **2001**; 11: 621-647
- V. **Schäfer**, P. M. Shah, T. A. Wichelhaus. Anhang/Tabellen: Erregerspezifische Antibiotikatherapie. In: T. A. Wichelhaus. Antibiotika – Moderne Therapiekonzepte. 1. Auflage. UNI-MED-Verlag. Bremen **2004/2005**: 187, 190-193
- K. H. **Schleifer**, R. Kilpper-Bälz. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **1984**; 34: 31-34
- M. **Schmidt-Hieber**, I. W. Blau, S. Schwartz, L. Uharek, K. Weist, T. Eckmanns, D. Jonas, H. Rüden, E. Thiel, C. Brandt. Intensified Strategies to Control Vancomycin-Resistant Enterococci in Immunocompromised Patients. *Int J Hematol* **2007**; 86: 158-162
- M. A. **Schouten**, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje, J. F. G. Meis, A. Voss. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2000**; 19: 816-822
- J. **Seedat**, G. Zick, I. Klare, C. Konstabel, N. Weiler, H. Sahly. Rapid Emergence of Resistance to Linezolid during Linezolid Therapy of an *Enterococcus faecium* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 4217-4219
- K. S. **Seo**, J. Y. Lim, H. S. Yoo, W. K. Bae, Y. H. Park. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. *Vet Microbiol* **2005**; 106: 225-233

- (SFM). Communiqué 2005, Edition de Janvier **2005**. Online in Internet:
http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/Casfm_2005.pdf
(Datenstand 19.10.2011)
- SFM – Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM)**. Recommandations 2008, Edition de Janvier **2008**. Online in Internet:
http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2008.pdf
(Datenstand 19.10.2011)
- V. **Shankar**, A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl, M. S. Gilmore. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun* **1999**; 67: 193-200
- N. **Shankar**, C. V. Lockett, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore, D. E. Johnson. Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein *Esp* in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. *Infect Immun* **2001**; 69: 4366-4372
- J. M. **Sherman**. The streptococci. *Bacteriol Rev* **1937**; 1: 3-97
- A. **Simon**, N. Gröger, S. Engelhart, G. Molitor, M. Exner, U. Bode, G. Fleischhack. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) – Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie. *Hyg Med* **2004**; 29: 259-275
- T. **Söderblom**, O. Aspevall, M. Erntell, G. Hedin, D. Heimer, I. Hökeberg, K. Kidd-Ljunggren, Å. Melhus, B. Olsson-Liljequist, I. Sjögren, J. Smedjegård, J. Struwe, S. Sylvan, K. Tegmark-Wisell, M. Thore. Alarming spread of vancomycin resistant enterococci in Sweden since 2007. *Euro Surveill* **2010**; 15 (29): pii=19620. Online in Internet:
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19620> (Datenstand 30.12.2011)
- X. **Song**, A. Srinivasan, D. Plaut, T. M. Perl. Effect of Nosocomial Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia on Mortality, Length of Stay, and Costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2003**; 24: 251-256
- J.-H. **Song**, K. S. Ko, W. S. Oh, S. Park, S. T. Heo, K. T. Kwon, S. Y. Ryu, K. R. Peck, N. Y. Lee. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and *vanA* genotype in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2006**; 56: 401-406
- P. D. **Stamper**, M. Cai, C. Lema, K. Eskey, K. C. Carroll. Comparison of the BD GeneOhm VanR Assay to Culture for Identification of Vancomycin-Resistant Enterococci in Rectal and Stool Specimens. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 3360-3365
- M. E. **Stiles**, N. W. Ramji, L.-K. Ng, D. C. Paradis. Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organisms in meats. *Canadian J Microbiol* **1978**; 24: 1502-1508
- T. P. **Stinear**, D. C. Olden, P. Johnson, J. K. Davies, M. L. Grayson. Enterococcal

- vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. Lancet **2001**; 357: 855-856
- V. **Stosor**, L. R. Peterson, M. Postelnick, G. A. Noskin. *Enterococcus faecium* Bacteremia: Does Vancomycin Resistance Make a Difference? Arch Intern Med **1998**; 158: 522-527
- M. J. **Struelens**, Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect **1996**; 2: 2-11
zitiert nach Morrison et al. 1999
- J. P. **Suppola**, E. Kolho, S. Salmenlinna, E. Tarkka, J. Vuopio-Varkila, M. Vaara. VanA and *vanB* Incorporate into an Endemic Ampicillin-Resistant Vancomycin-Sensitive *Enterococcus faecium* Strain: Effect on Interpretation of Clonality. J Clin Microbiol **1999**; 37: 3934-3939
- S. **Swaminathan**, G. J. Alangaden. Treatment of Resistant Enterococcal Urinary Tract Infections. Curr Infect Dis Rep **2010**; 12: 455-464
- L. M. **Teixeira**, R. R. Facklam, A. G. Steigerwalt, N. E. Pigott, V. L. Merquior, D. J. Brenner. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. J Clin Microbiol **1995**; 33: 1520-1523
- A. R. **Tenorio**, S. M. Badri, N. B. Sahgal, B. Hota, M. Matushek, M. K. Hayden, G. N. Trenholme, R. A. Weinstein. Effectiveness of Gloves in the Prevention of Hand Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococcus Species by Health Care Workers after Patient Care. Clin Infect Dis **2001**; 32: 826-829
- F. C. **Tenover**, R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J Clin Microbiol **1995**; 33: 2233-2239
- M. E. **Thiercelin**. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. C R Seances Soc Biol Fil **1899**; 51: 269-271
- A. **Toledo-Arana**, J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penadés, I. Lasa. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol **2001**; 67: 4538-4545
- J. **Top**, R. Willems, H. Blok, M. De Regt, K. Jalink, A. Troelstra, B. Goorhuis, M. Bonten. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect **2007**; 13: 316-319
- A. N. **Treitman**, P. R. Yarnold, J. Warren, G. A. Noskin. Emerging Incidence of *Enterococcus faecium* among Hospital Isolates (1993 to 2002). J Clin Microbiol **2005**; 43: 462-463

- TrinkwV** – Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung), vom 21. Mai **2001** (BGBl. I S. 959), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Mai 2011 (BGBl. I S. 748)
- G. C. **Turtura**, P. Lorenzelli. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res* **1994**; 149: 203-213
- A. H. C. **Uttley**, C. H. Collins, J. Naidoo, R. C. George. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1988**; 331: 57-58
- S. **Valdezate**, C. Labayru, A. Navarro, M. A. Mantecón, M. Ortega, T. M. Coque, M. García, J. A. Saéz-Nieto. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 63: 17-20
- a) P. **Valentin-Weigand**. Grundlagen: Wachstum und Kultur. In: H.-J. Selbitz, U. Truyen, P. Valentin-Weigand (Hrsg.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 9. Auflage. Enke-Verlag. Stuttgart **2011**: 102-107
- b) P. **Valentin-Weigand**. Grundlagen: Genetik. In: H.-J. Selbitz, U. Truyen, P. Valentin-Weigand (Hrsg.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 9. Auflage. Enke-Verlag. Stuttgart **2011**: 107-112
- c) P. **Valentin-Weigand**. Antimikrobielle Wirkstoffe: Resistenzmechanismen und -entstehung. In: H.-J. Selbitz, U. Truyen, P. Valentin-Weigand (Hrsg.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 9. Auflage. Enke-Verlag. Stuttgart **2011**: 126-127
- d) P. **Valentin-Weigand**. Grampositive Kokken: Gattung *Enterococcus*. In: H.-J. Selbitz, U. Truyen, P. Valentin-Weigand (Hrsg.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 9. Auflage. Enke-Verlag. Stuttgart **2011**: 269
- Verordnung (EG) Nr. 1831/2003** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (Text von Bedeutung für den EWR). ABl. L 268 vom 18.10.2003, S. 29–43 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT, FI, SV)
- R.-P. **Vonberg**, I. F. Chaberny, A. Kola, F. Mattner, S. Borgmann, M. Dettenkofer, D. Jonas, A.-M. Fahr, I. Klare, G. Werner, K. Weist, C. Wendt, P. Gastmeier. Prävention und Kontrolle der Ausbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken. *Anaesthesist* **2007**; 56: 151-157
- J. J. **Wade**, N. Desai, M. W. Casewell. Hygienic hand disinfection for the removal of epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and gentamicin-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* **1991**; 18: 211-218
- a) C. **Wendt**, H. Rüden, M. Edmond. Vancomycin-resistente Enterokokken:

- Epidemiologie, Risikofaktoren und Prävention. Dt Ärzteblatt **1998**; 95: A 1604-1611
- b) C. **Wendt**, B. Wiesenthal, E. Dietz, H. Rüden. Survival of Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococci on Dry Surfaces. J Clin Microbiol **1998**; 36: 3734-3736
- C. **Wendt**, C. Krause, L. U. Xander, D. Löffler, H. Floss. Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. J Hosp Infect **1999**; 42: 193-200
- G. **Werner**, I. Klare, W. Witte. Arrangement of the *vanA* gene cluster in enterococci of different ecological origin. FEMS Microbiol Lett **1997**; 155: 55-61
- G. **Werner**, I. Klare, W. Witte. Large Conjugative *vanA* Plasmids in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol **1999**; 37: 2383-2384
- G. **Werner**, I. Klare, B. Strommenger, W. Witte. Vancomycin-resistente Enterokokken – Epidemiologie, Diagnostik, Typisierung, Trends. Der Mikrobiologe **2007**; 17: 57-74
- a) G. **Werner**, I. Klare, J. Hübner, W. V. Kern, W. Witte. Vancomycin-resistente Enterokokken. Chemother J **2008**; 17: 183-193
- b) G. **Werner**, T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, N. Woodford. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill **2008**; 13: pii 19046. Online in Internet: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19046> (Datenstand 17.10.2011)
- T. A. **Wichelhaus**. Nitrofurane. In: T. A. Wichelhaus. Antibiotika – Moderne Therapiekonzepte. 1. Auflage. UNI-MED-Verlag. Bremen **2004/2005**: 109-110
- R. J. L. **Willems**, J. Top, N. van den Braak, A. van Belkum, H. Endtz, D. Mevius, E. Stobberingh, A. van den Bogaard, J. D. A. van Embden. Host Specificity of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. J Infect Dis **2000**; 182: 816-823
- R. J. L. **Willems**, W. Homan, J. Top, M. van Santen-Verheувel, D. Tribe, X. Manziros, C. Gaillard, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, E. M. Mascini, E. van Kregten, J. D. A. van Embden, M. J. M. Bonten. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. Lancet **2001**; 357: 853-855
- R. J. L. **Willems**, J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann, M. J. M. Bonten. Global Spread of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex. Emerging Infectious Diseases **2005**; 11: 821-828

- W. **Witte**. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. *Ciba Found Symp* **1997**; 207: 61-71; discussion 71-75
- N. **Woodford**, P. R. Chadwick, D. Morrison, B. D. Cookson. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their *van* genotypes during an outbreak. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2966-2968
- X. **Xu**, D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F. Wang, G. A. Jacoby, M. Wang. *VanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54: 4643-4647
- H. L. **Young**, S. A. Ballard, P. Roffey, M. L. Grayson. Direct detection of *vanB2* using the Roche LightCycler *vanA/B* detection assay to indicate vancomycin-resistant enterococcal carriage – sensitive but not specific. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 59: 809-810
- R. C. **Zanella**, M. C. C. Brandileone, S. Bokermann, S. C. G. Almeida, F. Valdetaro, F. Vitória, M. de F. A. Moreira, M. Villins, R. Salomão, A. C. C. Pignatari. Phenotypic and Genotypic Characterization of VanA *Enterococcus* Isolated During the First Nosocomial Outbreak in Brazil. *Microb Drug Resist* **2003**; 9: 283-291
- A. **Zirakzadeh**, R. Patel. Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Curr Opin Infect Dis* **2005**; 18: 507-512
- A. **Zirakzadeh**, R. Patel. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clin Proc* **2006**; 81: 529-536

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
BK	Blutkultur
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CC	Klonaler Komplex (clonal complex)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
d	Tag
DLV	Doppel-Locus-Variante
DNS	Desoxyribonukleinsäure (in Eigennamen teilweise englische Abkürzung: DNA – Deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen des Leibniz-Instituts DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance-Netzwerk
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Natrium-Ethylendiamintetraacetat-Sarcosyl
ESBL	beta-Lactamasen mit breitem Wirkungsspektrum (extended spectrum beta-lactamase)
ESP	Natrium-Ethylendiamintetraacetat-Sarcosyl-Proteinase K
et al.	et alii/et aliae
EU	Europäische Union

EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HICPAC	Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
Hrsg.	Herausgeber
i	intermediär-empfindlich
ICD-10-GM	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (International Classification of Diseases), 10. Revision, German Modifikation
l	Liter
M (Formelzeichen)	Molare Masse
M (Maßeinheit)	„Molar“, entspricht mol/l
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mol	Mol
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl
NCTC	National Collection of Type Cultures
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	potentia hydrogenii
pmol	Pikomol
r	resistent
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RKI	Robert Koch-Institut
RNase	Ribonuklease

rpm	revolutions per minute
S.	<i>Staphylococcus</i>
s	sensibel
sec	Sekunde
SLV	Single-Locus-Variante
spp.	Spezies (Plural)
ST	Sequenztyp
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat
U	Einheit (Unit)
u. a.	unter anderem
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
US	United States
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VSE	Vancomycin-sensible Enterokokken
x	-fach
z. B.	zum Beispiel
(US) \$	(US-) Dollar
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
§	Paragraph
∞	unendlich
>	größer
<	kleiner
≥	größer gleich
≤	kleiner gleich
α	Alpha

β	Beta
γ	Gamma
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Für Fachgebiete/Kliniken des beschriebenen Krankenhauses verwendete Abkürzungen:

Allgchi	Allgemeinchirurgie
Gastro	Gastroenterologie und Hepatologie
Gyn	Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Hämaonko	Hämatologie und Onkologie
Infekt	Infektiologie
Kardio	Kardiologie
Kpgchir	Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Nephro	Nephrologie
Neurochir	Neurochirurgie
Neurolog	Neurologie
Pädonko	Pädiatrische Onkologie
Pneumo	Pneumologie und Allergologie
Stroke	Stroke Unit (Neurologie)
Thgchir	Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie
Unfallchir	Unfall-, Hand-, Wiederherstellungschirurgie

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abb. 3a	Amplifizierte Genfragmente der <i>E. faecium</i> -Zielsequenz, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel	68
Abb. 3b	Resistenzdaten (<i>high level</i> -Resistenz bei Gentamicin) der 179 von 2005-2009/2010 untersuchten <i>E. faecium</i> -Stämme im Überblick (Ampicillin, Doxycyclin, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin, Nitrofurantoin, Rifampicin)	72
Abb. 3c	Resistenzdaten der 179 von 2005-2009/2010 untersuchten <i>E. faecium</i> -Stämme im Überblick (Reserve-Antibiotika Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin)	73
Abb. 3d	Amplifizierte <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel	75
Abb. 3e	Häufigkeitsverteilung des <i>vanA</i> - sowie <i>vanB</i> -Genotyps unter den 179 in die Untersuchung einbezogenen <i>E. faecium</i> -Isolaten	76
Abb. 3f	Amplifizierte <i>esp</i> -Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel	78
Abb. 3g	Amplifizierte <i>hyl</i> -Genfragmente, dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel	79
Abb. 3h	Ergebnisse der PFGE (Dice-Koeffizient und UPGMA-Berechnung mittels BioNumerics 6.0-Software) – Bandenmuster mit Dendrogramm sowie tabellarischer Auflistung der zugehörigen Isolate, Verteilung der epidemischen Marker <i>esp/hyl</i> , der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten <i>vanA/vanB</i> und epidemiologischer Daten	82
Abb. 3i	Ausschnitt aus der auf MLST-Daten basierenden Populationsstruktur von <i>E. faecium</i> mit Darstellung des CC17, erstellt mit Hilfe von goeBURST 1.2.1. Die neun Sequenztypen der untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate sind durch schwarze Umrandung gekennzeichnet	86
Abb. 3j	Ergebnisse der genotypischen Charakterisierung (MLST und PFGE) sowie tabellarische Auflistung der zugehörigen Isolate,	

	Verteilung der epidemischen Marker <i>esp/hyl</i> , der Glycopeptid-Resistenz-Determinanten <i>vanA/vanB</i> und epidemiologischer Daten	87
Abb. 3k	Verteilung der Patienten (n=179), deren Probenmaterial untersucht wurde, auf die einzelnen Fachgebiete eines Krankenhauses der Maximalversorgung in Südwestdeutschland	89
Abb. 3l	Grundleiden der 179 in die Arbeit einbezogenen Patienten	91

9.2 Tabellen

Tab. 1a	Natürliche und erworbene Resistenzen bei Enterokokken	8
Tab. 1b	Daten des EARSS/EARS-Net sowie verschiedener PEG-Studien zum Auftreten Vancomycin-resistenter <i>E. faecium</i> -Stämme in Deutschland	11
Tab. 1c	Patientenkollektiv für routinemäßige Screeningabstriche in dem beschriebenen südwestdeutschen Krankenhaus	20
Tab. 2a	In die Arbeit einbezogene Vancomycin-resistente <i>E. faecalis</i> - und <i>E. faecium</i> -Stämme	23
Tab. 2b	Numerische Auflistung des Probenmaterials, aus dem die einbezogenen <i>E. faecalis</i> - und <i>E. faecium</i> -Stämme isoliert wurden	24
Tab. 2c	Einbezogene Referenzstämme und Angabe ihrer Verwendung	25
Tab. 2d	Verwendete Etest [®] -Streifen	36
Tab. 2e	Verwendete Testblättchen (Inverness Medical Deutschland GmbH)	37
Tab. 2f	Verwendete Testblättchen (Oxoid Deutschland GmbH)	37
Tab. 2g	Verwendete Primer (Eurofins MWG Operon)	44
Tab. 2h	Verwendete Primer (metabion international AG)	45
Tab. 2i	Relation zwischen untersuchten Isolaten und Erstnachweisen Vancomycin-resistenter <i>E. faecium</i> -Stämme an einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland zwischen 2005 und 2010	47
Tab. 2j	Kriterien zur vorläufigen Speziesdifferenzierung	49
Tab. 2k	Evaluationskriterien zur Auswertung der Empfindlichkeitstestung mittels Antibiotika-Blättchen	53

Tab. 2l	Evaluationskriterien zur Auswertung der Empfindlichkeitstestung mittels Etest [®] -Streifen	54
Tab. 2m	Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf eine Spezies-spezifische <i>E. faecium</i> rDNS-Sequenz)	56
Tab. 2n	Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf <i>esp</i> oder <i>hyl</i>)	56
Tab. 2o	Mastermix für einen PCR-Ansatz (PCR auf <i>vanA</i> und <i>vanB</i> , Duplex-PCR)	56
Tab. 2p	Cyclerprofil zur Amplifizierung der Spezies-spezifischen <i>E. faecium</i> rDNS-Sequenz	57
Tab. 2q	Cyclerprofil zur Amplifizierung von <i>esp</i> , <i>vanA</i> und <i>vanB</i>	57
Tab. 2r	Cyclerprofil zur Amplifizierung von <i>hyl</i>	57
Tab. 2s	Reaktionsbedingungen der Pulsfeldgelelektrophorese	62
Tab. 2t	Haushaltsgene von <i>E. faecium</i> , die im Rahmen des MLSTs mittels PCR amplifiziert wurden	63
Tab. 2u	Mastermix für einen MLST-PCR-Ansatz	64
Tab. 2v	Cyclerprofil zur Amplifizierung der <i>E. faecium</i> -Haushaltsgene	64
Tab. 3a	Mit API rapid ID 32 Strep inklusive Apiweb [™] -Software und PCR erhaltene Identifizierungsergebnisse	67
Tab. 3b	Empfindlichkeit der 179 <i>E. faecium</i> -Isolate gegenüber den getesteten Antibiotika Ampicillin, Daptomycin, Doxycyclin, Erythromycin, Gentamicin, Levofloxacin, Linezolid, Nitrofurantoin, Rifampicin und Tigecyclin	70
Tab. 3c	Vergleich der Resistenzdaten der insgesamt von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolate und sonstigen Isolate der Spezies <i>E. faecium</i> (n=179)	71
Tab. 3d	Phänotypische Empfindlichkeitstestung der 179 <i>E. faecium</i> -Isolate – Vancomycin	74
Tab. 3e	Phänotypische Empfindlichkeitstestung der 179 <i>E. faecium</i> -Isolate – Teicoplanin	74
Tab. 3f	Vergleich der Resistenzdaten der insgesamt von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolate und sonstigen Isolate bezüglich Teicoplanin und Vancomycin	74

Tab. 3g	Jahrweise Auflistung der klinisch bedeutsamen <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Resistenztypen unter den 179 untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolaten	76
Tab. 3h	Anteile des <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Genotyps unter den insgesamt von 2005-2009/2010 untersuchten Blutkultur-Isolaten und sonstigen Isolaten	76
Tab. 3i	Tabellarische Auflistung der erhaltenen Allelprofile, sowie der zugehörigen Sequenztypen (STs)	83

10. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie

(DGHM) e. V., vom 25.-28. September 2011 in Essen:

K. Englert, A. Ehrhart, G. Werner, V. A. J. Kempf und C. Brandt. Characterization of hospital-associated Vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* in a tertiary care center in Hesse. PRV04 (Vortrag). Gedruckte Zusammenfassung: Int J Med Microbiol; 301 (S1): 101

11. Anhang

Inkludierte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien der verwendeten Kits:

- **Prolex™ streptococcal grouping latex kit** beinhaltet:
 - Blaue Latexsuspension Gruppe A/B/C/D/F/G
 - Extraktionsreagenz 1/2/3
 - Polyvalente Positivkontrolle
 - Misch-Sticks
 - Testkarten

- **PYR 50 Test Kit** beinhaltet:
 - Farbentwickler
 - PYR-Blättchen

- **QIAamp® DNA Mini Kit** beinhaltet:
 - AL-Puffer
 - ATL-Puffer
 - AW1-Puffer*
 - AW2-Puffer*
 - AE-Puffer
 - Proteinase K
 - Quiagensäulen mit Auffangtubes

*Konzentrat, vor Gebrauch Zugabe der angegebenen Menge Ethanol

- **Taq DNA Polymerase recombinant Kit** beinhaltet:
 - Taq DNA Polymerase (5 U/μl)
 - Magnesiumchlorid (50 mM)
 - 10x PCR-Puffer ohne Magnesiumchlorid

- **HotStarTaq Master Mix** beinhaltet:
 - HotStarTaq DNA Polymerase (5 U/μl)
 - dNTPs (je 400 μM)
 - 10x PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid (Magnesiumchlorid 3 mM)

12. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. (em.) Dr. Dr. habil. Georg Baljer. Nicht nur für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, sondern auch für seine Unterstützung, fachliche Anregungen und seine stete Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Volkhard A. J. Kempf danke ich für die Aufnahme als Doktorandin am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die ausgezeichneten Möglichkeiten, die mir gegeben wurden, dieses Thema zu bearbeiten und die umfassende Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Christian Brandt, der mir dieses interessante Thema zur Bearbeitung überließ. Vor allem aber möchte ich mich für seine stete Diskussions- und Gesprächsbereitschaft sowie seine Anleitung, Unterstützung, unendliche Geduld und die vielen Anregungen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an das Robert Koch-Institut Wernigerode und hier im Speziellen an Herrn Dr. Guido Werner und Frau Karola Fleige, die mir die Durchführung von PFGE und MLST ermöglichten, mich diesbezüglich unterstützten und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat beiseite standen. Herrn Dr. Guido Werner danke ich zudem für die Durchsicht dieser Arbeit und für die wertvollen Hinweise, die er mir im Laufe ihrer Fertigstellung gab.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Annabelle Ehrhart für die fachkundige Einarbeitung, ihre stete Hilfs- und Gesprächsbereitschaft sowie die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für ihre stete Hilfsbereitschaft, für wertvolle Tipps und die schöne Zeit bedanken, an die ich mich gerne zurück erinnern werde.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6030-5



9 783835 196030 5