

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

**Molekulare Typisierung 128 Vancomycin-resistenter  
*Enterococcus faecium*-Isolate von zwei deutschen Kliniken  
in Essen und Nürnberg zwischen 2011 und 2018**

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Laura Cornelia Nürnberger

aus Gummersbach

2022

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/77241

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230330-112059-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. P.-M. Rath  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. E. Gulbins

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2022

## **Publikation**

Nürnberg L, Schmidt D, Szumlanski T, Kirchhoff L, Ross B, Steinmann J, Rath PM.  
Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from  
two German hospitals. *GMS Hyg Infect Control*. 2021;16:Doc13.  
DOI:10.3205/dgkh000384, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh000384

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Enterokokken .....	6
1.2	Klinische Bedeutung.....	6
1.2.1	Klinische Bedeutung der Enterokokken .....	6
1.2.2	Klinische Bedeutung von <i>Enterococcus faecium</i> .....	7
1.3	Therapie .....	8
1.3.1	Vancomycin.....	9
1.3.1.1	Wirkung.....	9
1.3.1.2	Vancomycin-Resistenz.....	10
1.3.1.3	Prävalenz der Vancomycin-Resistenz.....	14
1.4	Molekulargenetische Typisierungsverfahren.....	16
1.4.1	Multilocus-Sequenztypisierung (MLST).....	16
1.4.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	18
2	Fragestellung .....	19
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Materialien.....	20
3.1.1	Chemikalien.....	20
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.3	Geräte.....	25
3.1.4	Datenbanken und Software.....	27
3.2	Methoden .....	28
3.2.1	Isolate.....	28
3.2.2	DNA Extraktion für PCR .....	28
3.2.3	Enterokokken-PCR.....	29
3.2.4	Multilocus-Sequenztypisierung (MLST).....	31
3.2.4.1	MLST-PCR .....	31
3.2.4.2	Aufreinigung der Amplifikate.....	33
3.2.4.3	Sequenzierung .....	34
3.2.4.4	Ergebnisse .....	34
3.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	34
3.2.5.1	Vorbereitung und Präparation (1. Tag) .....	35
3.2.5.2	Restriktionsverdau (2. Tag).....	36

3.2.5.3	Gelelektrophorese (3. Tag).....	37
3.2.5.4	Färbung des Gels (4. Tag).....	38
3.2.5.5	Auswertung .....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Selektion der Isolate mithilfe der Enterokokken-PCR.....	39
4.2	Charakterisierung mittels Multilocus-Sequenztypisierung.....	40
4.2.1	Verteilung der Sequenz-Typen.....	40
4.2.2	Phylogenetische Analyse der Ergebnisse .....	42
4.3	Charakterisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese .....	44
4.4	Vergleich der Ergebnisse .....	52
5	Diskussion .....	53
5.1	Interpretation der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung.....	53
5.2	Einordnung der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung.....	53
5.3	Interpretation der Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese .....	54
5.4	Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen .....	55
5.5	Vergleich der Methoden in Bezug auf diese Studie.....	56
6	Fazit .....	58
7	Zusammenfassung .....	59
7	Abstract.....	60
8	Literaturverzeichnis .....	61
9	Anhang.....	70
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	70
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	72
9.3	Tabellenverzeichnis .....	73
9.4	Danksagung.....	74

# **1 Einleitung**

## **1.1 Enterokokken**

Die Gattung *Enterococcus* gehört zur Familie der *Enterococcaceae* (Zhong et al., 2017). Enterokokken sind grampositive, katalasenegative, kokkenförmige Bakterien, die als opportunistische Pathogene gelten (Bourdon et al., 2011a; Klare et al., 2012; Zhong et al., 2017). Sie sind fakultativ anaerob und als Besiedler des Intestinaltrakts in der normalen Flora des Menschen zu finden (Arias and Murray, 2012; Bourdon et al., 2011a; Kramer et al., 2018). Auch in der Natur sind sie weit verbreitet und kommen sowohl in einer Vielzahl von Tieren als auch in Boden und Wasser vor (Sparo et al., 2018; Zhong et al., 2017). Sie besitzen die Fähigkeit, auch unter schwierigen Umweltbedingungen wie extremen Temperaturen und großen pH-Schwankungen zu überleben (Klare et al., 2012; Lee et al., 2019; Sparo et al., 2018). Des Weiteren zeigen Enterokokken intrinsische Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen (Brandt et al., 2018).

## **1.2 Klinische Bedeutung**

### **1.2.1 Klinische Bedeutung der Enterokokken**

Durch Enterokokken ausgelöste Infektionen treten vor allem bei immungeschwächten Patienten auf (Murray, 1990). Zu diesen Infektionen gehören Endokarditis, Blutstrominfektionen, Harnwegsinfektionen, neonatale Infektionen, Infektionen des zentralen Nervensystems und intraabdominale Infektionen (Murray, 1990). Der Großteil der in Deutschland dem Robert-Koch-Institut (RKI) zugeschickten Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE)-Isolate stammte dabei 2016 aus Stuhlproben/Rektalabstrichen (43,5%), Urinproben (16,5%), Wund- und anderen nicht näher bezeichneten Abstrichen (7,4% und 13,4%) sowie Blutkulturen (5,1%) (Klare et al., 2017). Die entsprechenden Patienten lagen auf Stationen der Chirurgie, der inneren Medizin, der Hämatologie/ Onkologie und dabei insgesamt vor allem auf den intensivmedizinischen Stationen (Klare et al., 2017). Insgesamt machten Enterokokken-Infektionen laut einer deutschen nationalen Punkt-Prävalenzerhebung im Jahr 2016 zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung des nationalen Referenzzentrums für die Surveillance von Nosokomialen Infektionen 12,6% aller einbezogenen nosokomialen Infektionen aus (Aghdassi et al., 2017). Wundinfektionen waren sogar zu

19,9% durch Enterokokken ausgelöst, Harnwegsinfektionen zu 16,9% und primäre Septitiden zu 11,6% (Aghdassi et al., 2017).

Inwieweit die Infektionen mit Enterokokken die Letalität signifikant erhöhen, ist fraglich (Frickmann et al., 2017). Eine Enterokokken-Bakteriämie scheint im Vergleich zu durch *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* ausgelöste Bakteriämien einen Risikofaktor für einen vorzeitigen Tod darzustellen (Frickmann et al., 2017). Durch die im Vergleich relativ geringe Pathogenität der Enterokokken sind sie jedoch möglicherweise nicht als Haupttodesursache, sondern eher als Begleiterscheinung einzustufen (Frickmann et al., 2017).

Enterokokken sind intrinsisch resistent gegenüber verschiedenen Antibiotika wie Cephalosporinen (Kristich et al., 2014; Pallares et al., 1993), Aminoglykosiden (Moellering and Weinberg, 1971), semisynthetischen Penicillinen, Monobactamen, Lincosamiden und Polymyxinen (Brandt et al., 2018). Auch der Anteil der Enterokokken, die eine Resistenz gegen Glykopeptide wie Vancomycin entwickeln, nimmt seit Jahren immer weiter zu (Aghdassi et al., 2017). Ob die Infektion mit VRE tatsächlich die Letalität für betroffene Patienten erhöht, scheint aber ebenfalls unklar (Prematunge et al., 2016). Prematunge *et al.* verglichen 2016 die Letalität von Patienten mit VRE-Bakteriämie mit Patienten, die mit Vancomycin-sensiblen Enterokokken (VSE) infiziert waren. Dabei ging die Infektion mit VRE im Vergleich zur Infektion mit VSE mit einer erhöhten Letalität einher (Prematunge et al., 2016). Dies könnte allerdings auch darauf zurückzuführen sein, dass Patienten mit VRE ernstere Grunderkrankungen und Komorbiditäten aufwiesen (Prematunge et al., 2016).

### **1.2.2 Klinische Bedeutung von *Enterococcus faecium***

Die größte klinische Bedeutung unter den Enterokokken haben die Spezies *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (Klare et al., 2012; Sparo et al., 2018). Während zwischen 1970 und 1990 *E. faecalis* den Großteil der aus klinischem Material isolierten Enterokokken ausmachte, verschob sich ab dem Zeitpunkt langsam das Verhältnis zwischen *E. faecalis* und *E. faecium* (Arias and Murray, 2012). Heutzutage ist *E. faecium* deutlich häufiger Auslöser nosokomialer Infektionen (Klare et al., 2017)

und ist im Vergleich zu *E. faecalis* mit einer höheren Krankenhauserblichkeit bei Blutstrominfektionen assoziiert (Kramer et al., 2018).

*E. faecium* gehört zu den sogenannten ESKAPE-Pathogenen, einer Gruppe von Keimen, die für einen Großteil der nosokomialen Infektionen verantwortlich sind und durch ihre Antibiotikaresistenzen ein therapeutisches Problem darstellen (Rice, 2008). Vancomycin-resistente *E. faecium* wurden von der World Health Organization (WHO) auf der „Global priority list of antibiotic-resistant bacteria“ als „high priority“ Pathogene gelistet (Tacconelli and Magrini, 2017). Die große Plastizität ihres Genoms, für die Rekombination eine wichtige Rolle spielt, macht sie besonders anpassungsfähig und trägt zu ihrem erfolgreichen Überleben in Krankenhäusern bei (de Been et al., 2013; Schaik et al., 2013).

### **1.3 Therapie**

Zur Therapie der Enterokokken-Infektionen werden verschiedene Antibiotika-Klassen eingesetzt (Linden, 2007). Da Enterokokken Teil der normalen Darmflora sind, muss bei ihrem Nachweis die Notwendigkeit einer antimikrobiellen Therapie kritisch abgewogen werden, um den unnötigen Einsatz von Antibiotika zu vermeiden (O'Driscoll and Crank, 2015). Für die Wahl des geeigneten Therapeutikums ist bei der kalkulierten Therapie wichtig zu überlegen, mit welcher Wahrscheinlichkeit die infektionsauslösenden Enterokokken eine Vancomycin-Resistenz aufweisen (Linden, 2007). Risikofaktoren für eine VRE-Infektion sind unter anderem längere Krankenhausaufenthalte (>7 d), der Wechsel zwischen verschiedenen Stationen eines Krankenhauses und die Vorbehandlung mit Antibiotika (z. B. Vancomycin, Cephalosporine der 3. Generation) (Tornieporth et al., 1996). Diese Kriterien dürften allerdings sehr viele Patienten erfüllen.

Das typische Vorgehen bei Infektionen mit Ampicillin- und Glykopeptid-sensiblen Enterokokken stellt die Therapie mit einem Zellwand-aktiven Penicillin-Derivat, bei endovaskulären Infektionen möglicherweise in Kombination mit einem Aminoglykosid-Antibiotikum wie Gentamycin, dar (Linden, 2007; O'Driscoll and Crank, 2015). Als Alternative für Patienten mit einer Penicillin-Intoleranz kann Vancomycin eingesetzt werden (Linden, 2007). Allerdings ist der Großteil von *E. faecium* mittlerweile resistent

gegenüber Penicillin und Ampicillin, die einst eine effektive Therapie darstellten (Klare et al., 1992; Kramer et al., 2018).

Bei Vorliegen einer Infektion mit VRE ist als Reserveantibiotikum bislang in Deutschland nur das Oxazolidinon Linezolid zugelassen (Brandt et al., 2018). Aber auch gegen Linezolid zeigen Enterokokken mittlerweile Resistenzen, was die Therapiemöglichkeiten weiter einschränkt (Linden, 2007; Remschmidt et al., 2017). Der Einsatz des Tetracyclins Tigecyclin und des Lipopeptids Daptomycin ist nur bedingt wirksam und wird nur sehr eingeschränkt empfohlen (Brandt et al., 2018). Das Präparat Quinupristin/Dalfopristin ist eine Kombination aus 70% des Streptogramins Typ A (Dalfopristin) und 30% des Streptogramins Typ B (Quinupristin) (O'Driscoll and Crank, 2015). Es wirkt bakterizid auf *E. faecium*, verlor die Zulassung für die Behandlung von VRE-Infektionen jedoch wieder aufgrund eines fehlenden Nachweises der klinischen Wirksamkeit (O'Driscoll and Crank, 2015). In Deutschland ist diese Substanz auch seit längerem nicht mehr verfügbar (Klare et al., 2017).

### **1.3.1 Vancomycin**

Vancomycin gehört wie Teicoplanin zu den Glykopeptid-Antibiotika (Kristich et al., 2014). Diese werden vor allem zur Behandlung schwererer Infektionen mit gram-positiven Bakterien eingesetzt (Kristich et al., 2014). Gegen gram-negative Keime zeigen sie keine Wirkung, da diese durch ihre äußere Membran geschützt sind (Arthur and Courvalin, 1993).

#### **1.3.1.1 Wirkung**

Die Wirkung der Glykopeptide beruht auf der Störung der Zellwandsynthese (Miller et al., 2014). Im Cytoplasma wandelt eine Racemase L-Alanin in D-Alanin (D-Ala) um, eine D-Alanin-D-Alanin-Ligase (Ddl) fügt zwei Moleküle D-Ala zu einem Dipeptid (D-Ala-D-Ala) zusammen, bevor es an Uracildiphosphat-N-Acetylmuramyl-Tripeptid gebunden wird (Abbildung 1) (Courvalin, 2005). Das entstehende Pentapeptid bindet N-Acetyl-D-Glucosamin, bevor ein Undecaprenol-Lipidtransporter die Vorläufermoleküle durch die Zellmembran nach außen transportiert (Courvalin, 2005). Dort wird N-

Acetylmuramyl-Pentapeptid durch Transglykosylierung in die wachsende Peptidoglykan-Kette eingebaut und quervernetzt (Walsh et al., 1996).

Die Glykopeptide binden an den D-Ala-D-Ala Terminus des Peptidoglykan-Vorläufers und verhindern so das Fortführen der Peptidoglykan-Kette durch Transglykosylierung an dieser Stelle (Kristich et al., 2014), was die Zellwand schwächt und das Bakterium anfälliger für osmotischen Stress macht (Walsh et al., 1996).

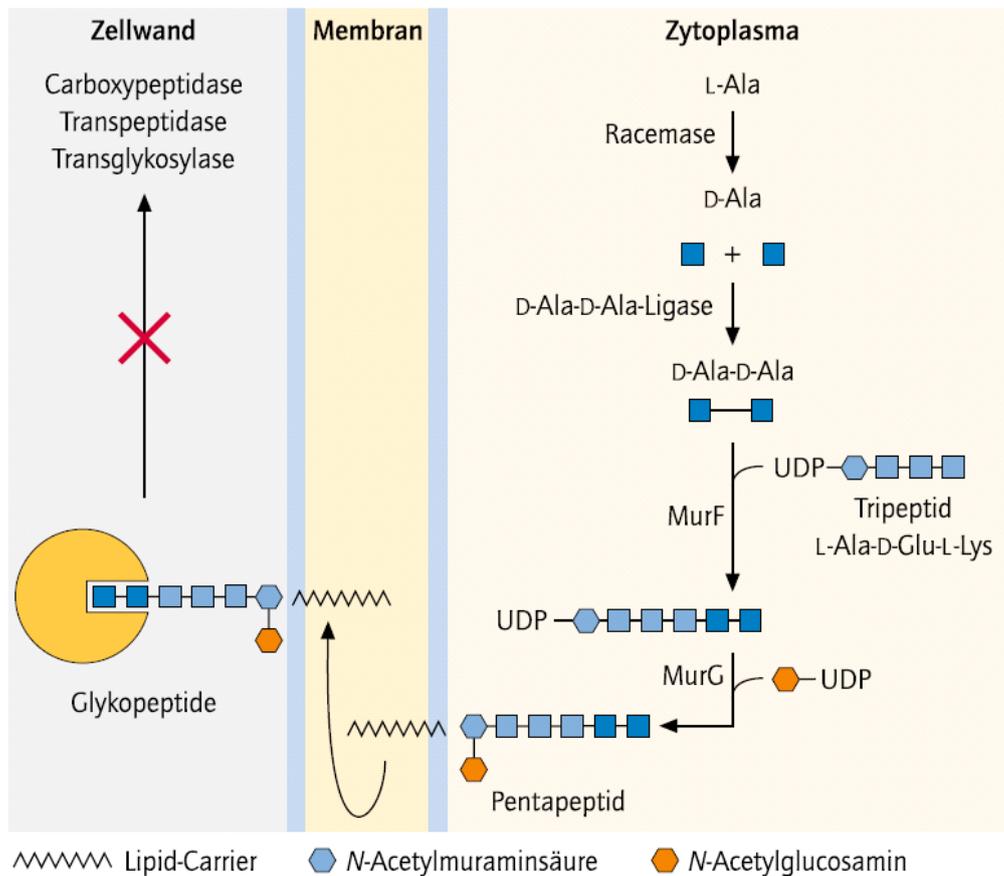


Abbildung 1: Peptidoglykan-Synthese und Wirkweise der Glykopeptid-Antibiotika in Enterokokken. Abkürzungen: Ala: Alanin, UDP: Uracildiphosphat, MurF/MurG: Synthasen, Glu: Glukose, Lys: Lysin. Abbildung aus: (Werner et al., 2008b)

### 1.3.1.2 Vancomycin-Resistenz

Die Resistenz der Enterokokken gegenüber Glykopeptiden wird durch die sogenannten van-Gene vermittelt (Lee et al., 2019). Mittlerweile sind neun verschiedene van-Gen-Cluster identifiziert worden, die nach den zentralen Ligasen, für die sie kodieren, benannt

sind (vanA – vanN) (Bender et al., 2016). Dabei haben die vanA- und vanB-Resistenz die höchste klinische Relevanz, da Isolate mit diesen Resistenz-Typen für einen Großteil der Infektionen mit VRE verantwortlich sind (Bender et al., 2016). Während die vanA-Typ-Resistenz durch hohe Dosen an Vancomycin und Teicoplanin induziert wird, wird die Resistenz vom Typ vanB nur durch Vancomycin ausgelöst (Arthur et al., 1996). Der in Deutschland mittlerweile seit 2010 am häufigsten isolierte Typ ist vanB (Klare et al., 2017).

Die van-Operons kodieren für 3 wichtige Funktionen: Die erste Funktion beinhaltet die Regulation der Enzymsynthese (Arthur et al., 1992; Kristich et al., 2014). Die zweite Funktion ist die Synthese von Enzymen, die die Peptidoglykan-Vorläufer so verändern, dass sie nicht mehr in D-Ala-D-Ala enden, sondern in D-Ala-D-Laktat (D-Lac) oder D-Ala-D-Serin, was die Affinität der Glykopeptide für die Substrate um ein Vielfaches verringert (Kristich et al., 2014). Als drittes codieren van-Operons für Enzyme, die die Vorläufer, die noch auf D-Ala-D-Ala enden und für die die Glykopeptide eine hohe Affinität haben, eliminieren (Courvalin, 2005; Kristich et al., 2014).

Die vanA-Resistenz wird durch das Transposon Tn1546 vermittelt, welches sowohl auf Plasmiden als auch auf Chromosomen vorkommt (Kristich et al., 2014). Die Resistenzgene können über diese mobilen Elemente zwischen den Bakterien übertragen werden (Arthur and Courvalin, 1993). Patrice Courvalin und seiner Arbeitsgruppe gelang es 1993, die sieben offenen Leserahmen (vanR, vanS, vanA, vanH, vanX, vanY, vanZ) (Abbildung 2b) des Operons zu identifizieren, von denen die ersten fünf notwendig für die Vancomycin-Resistenz sind (Arthur and Courvalin, 1993).

Die vanS- und vanR-Komponente des Clusters ist für die Synthese-Regulation der für die Resistenz verantwortlichen Enzyme zuständig (Abbildung 2) (Arthur et al., 1992). Eine von vanH kodierte gleichnamige Dehydrogenase reduziert Pyruvat zu D-Lac (Arthur et al., 1996; Bugg et al., 1991). Die Ligase VanA bindet dann D-Lac mit einer Esterbindung an D-Ala (Bugg et al., 1991). Das resultierende D-Ala-D-Lac Depsipeptid kann dann statt D-Ala-D-Ala an das Uracil-Diphosphat-N-Acetylmuramyl-Tripeptid angehängt und an der Zellaußenseite in die Peptidoglykan-Kette eingebaut werden (Bugg et al., 1991). Die entstehenden Vorläufer-Moleküle, die auf D-Ala-D-Lac enden, erlauben eine Fortsetzung der Zellwandsynthese (Reynolds et al., 1994), binden aber Vancomycin mit deutlich

geringerer Affinität als die auf D-Ala-D-Ala endenden Moleküle (Arthur et al., 1996). Solange diese Vancomycin-sensiblen Vorläufer-Moleküle aber noch simultan gebildet werden, kommt es nicht zu einer effektiven Glykopeptid-Resistenz (Arthur et al., 1996). Dafür bedarf es eines weiteren Enzyms: VanX (Reynolds et al., 1994). Wie in Abbildung 2a zu sehen, hydrolysiert diese durch das vanX-Gen codierte D-Alanin-D-Alanin-Dipeptidase (D,D-Dipeptidase) die D-Ala-D-Ala-Dipeptide und verhindert so die Synthese der Vancomycin-sensiblen Vorläufermoleküle (Reynolds et al., 1994). Die D-Alanin-D-Alanin-Carboxypeptidase (D,D-Carboxypeptidase) vanY entfernt die danach noch übrig gebliebenen D-Ala-Reste vom C-Terminus der Peptidoglykan-Kette (Arthur et al., 1998). Neben VanY gibt es mit VanZ ein weiteres zusätzliches Protein, das nicht für die Glykopeptid-Resistenz notwendig ist (Arthur and Courvalin, 1993). Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht genau bekannt (Kristich et al., 2014), auch wenn Arthur *et al.* 1995 zeigten, dass das VanZ-Protein eine separate Resistenz gegen geringe Dosen von Teicoplanin vermittelt (Arthur et al., 1995).

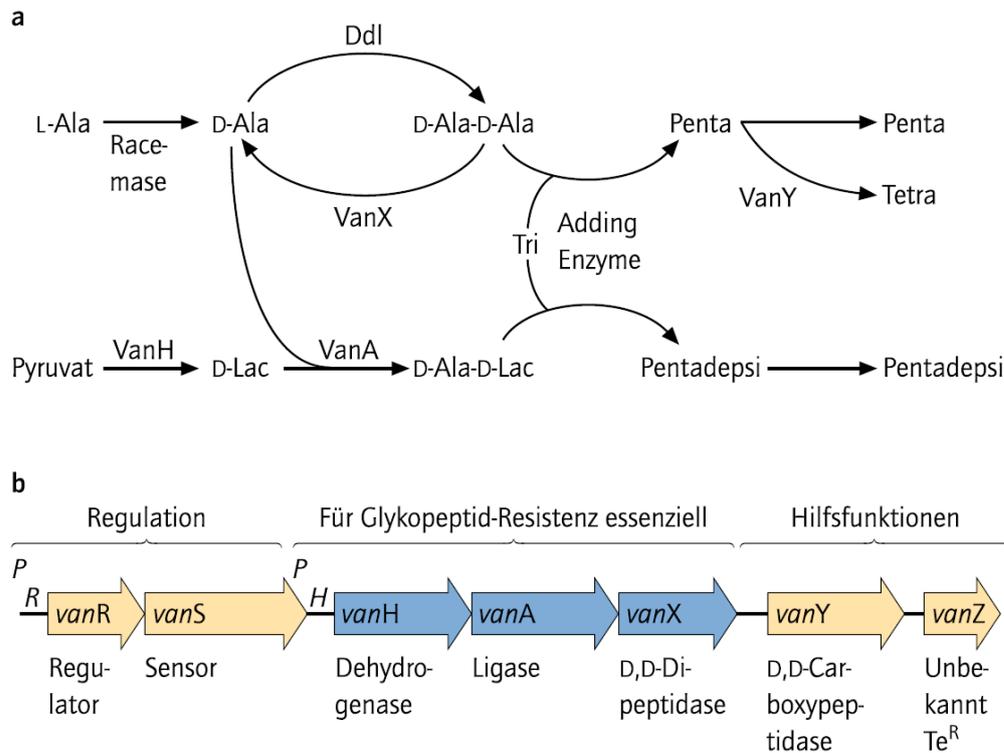


Abbildung 2: Glykopeptid-Resistenz vom *vanA*-Typ. a) Mechanismus der Synthese von Peptidoglykan-Vorläufer-Molekülen bei Enterokokken mit *vanA*-Resistenz. b) Aufbau des *vanA*-Operons. Abkürzungen: Ala: Alanin, Ddl: D-Alanin-D-Alanin-Ligase, Lac: Laktat,  $P_R/P_H$ : Promotoren. Abbildung aus: (Werner et al., 2008b)

Die *vanB*-Resistenz wird durch die Transposons Tn5382/Tn1549 vermittelt, welche wie das *vanA*-Operon sowohl auf Plasmiden als auch auf Chromosomen vorkommen (Kristich et al., 2014). Es wurden drei verschiedene Subtypen des *vanB*-Clusters gefunden: *vanB1*, *vanB2* und *vanB3* (Dahl et al., 1999). Diese haben jedoch keinen Bezug zur Stärke der Vancomycin-Resistenz (Dahl et al., 1999). Sowohl der Aufbau des *vanB*-Operons als auch der Resistenzmechanismus ist dem des *vanA*-Typs sehr ähnlich (Evers et al., 1994). Auch das *vanB*-Cluster enthält Gene, die für eine Dehydrogenase (*vanH<sub>B</sub>*), eine Ligase (*vanB*) und eine D,D-Dipeptidase (*vanX<sub>B</sub>*) codieren, welche eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit den entsprechenden Proteinen des *vanA*-Operons aufweisen (Evers and Courvalin, 1996). Hingegen sind die *vanS<sub>B</sub>*- und *vanR<sub>B</sub>*-Gene, die für ein 2-Komponenten Regulationssystem codieren, nur entfernt mit den *vanS*- und *vanR*-Genen des *vanA*-Clusters verwandt (Arthur et al., 1996). Die durch *vanY* und *vanY<sub>B</sub>* codierten D,D-Carboxypeptidasen sind ebenfalls nicht eng verwandt (Arthur et al., 1996). Statt des akzessorischen *vanZ*-Gens gibt es im *vanB*-Operon das offene Leseraster *vanW*, dessen

Funktion gleichermaßen noch nicht verstanden wird (Arthur et al., 1996; Kristich et al., 2014).

### **1.3.1.3 Prävalenz der Vancomycin-Resistenz**

Enterokokken, die eine hochgradige Resistenz gegenüber Glykopeptid-Antibiotika zeigen, wurden in Europa das erste Mal 1986 gefunden (Leclercq et al., 1988). Dies wurde auf den Gebrauch des Vancomycin-ähnlichen Glykopeptid-Antibiotikums Avoparcin in der Tierzucht zurückgeführt (Bonten et al., 2001). Die Prävalenz an VRE hat sowohl in Europa als auch in Deutschland in den letzten Jahren signifikant zugenommen (Aghdassi et al., 2017; ECDC, 2018). Dieser Anstieg ist vor allem auf die Zunahme der Vancomycin-Resistenz in *E. faecium* zurückzuführen; Vancomycin-resistente *E. faecalis* sind dagegen selten (ECDC, 2018; Werner et al., 2008a).

Der Jahresbericht des European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) zeigte für Europa eine durchschnittliche Zunahme der Vancomycin-Resistenz in invasiven *E. faecium* - Isolaten von 10,4% im Jahr 2014 auf 14,9% im Jahr 2017 (ECDC, 2018). Für Deutschland lag dabei die Prävalenz an invasiven *E. faecium*-Isolaten mit Vancomycin-Resistenz 2017 bei 10-25% (ECDC, 2018).

Dies deckt sich weitestgehend mit anderen Studien: In einer deutschen nationalen Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung des nationalen Referenzzentrums für die Surveillance von Nosokomialen Infektionen im Jahr 2016 waren 23,1% der untersuchten *E. faecium*-Isolate Vancomycin-resistent (Aghdassi et al., 2017). Dies entspricht einer Zunahme von über 126% im Vergleich zum Jahr 2011 (10,2%) (Behnke et al., 2013).

Auch in anderen Studien wurde eine Zunahme der VRE-Inzidenz beobachtet: Remschmidt *et al.* zeigten zwischen 2007/2008 und 2015/2016 eine Zunahme von 1,4% auf 10% (Remschmidt et al., 2018). Bei den aus Blutkulturen isolierten Enterokokken war die Zunahme an VRE mit einer Steigerung von 5,9% auf 16,7% noch deutlicher (Remschmidt et al., 2018).

In der sogenannten SARI-Studie (Surveillance of Antibiotic Use and Resistance in Intensive Care Units) zeigte sich zwischen 2001 und 2015 eine Zunahme der

Vancomycin-Resistenz in *E. faecium* auf Intensivstationen von 2,3% auf 13,3% (Remschmidt et al., 2017). Im Jahr 2015 waren damit 75% aller eingeschlossenen Intensivstationen von VRE betroffen (Remschmidt et al., 2017). Diese Zunahme von VRE führten Remschmidt *et al.* auf einen gleichzeitig steigenden Gebrauch von Glykopeptid-Antibiotika und Piperacillin/Tazobactam (Penicillin +  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor) zurück (Remschmidt et al., 2017).

Der Anteil des vanA- und vanB-Typs an der Vancomycin-Resistenz in *E. faecium* hat sich dabei in den letzten Jahren umgekehrt, wobei nun die vanB-Resistenz in *E. faecium* dominiert (Klare et al., 2017). Während vor 2016 mehr *E. faecium*-Isolate vanA-positiv waren, berichtete das RKI 2016 zum ersten Mal über einen deutlich höheren Anteil an eingesendeten vanB-VRE (45%) im Vergleich zu vanA (37%) (Klare et al., 2017).

Zu der VRE-Prävalenz außerhalb von Krankenhäusern in Europa gibt es nur wenige aktuelle Studien, die teilweise sehr verschiedene Ergebnisse aufweisen. Insgesamt lag die Prävalenz in verschiedenen Studien zwischen 1992 und 2013 bei 0-12% (Balzereit-Scheuerlein and Stephan, 2001; Endtz et al., 1997; Gambarotto et al., 2000; Jordens et al., 1994; Kaarme et al., 2015; Klare et al., 1995; Kolar et al., 2004; Kolar et al., 2006; Trajkovska-Dokic et al., 2015; Wendt et al., 1999). Zwei ältere Studien aus den 1990er Jahren zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse in zwei Gebieten in Deutschland: Klare *et al.* fanden 1995 VRE in 12% der getesteten Stuhlproben von ländlichen Bewohnern Sachsen-Anhalts (Klare et al., 1995). 1999 wurden in einer anderen deutschen Studie aus Berlin Analabstriche verschiedener Bevölkerungsgruppen untersucht. Bei Medizinstudenten lag die VRE-Prävalenz dabei bei 0,95%, bei ambulanten Patienten bei 1,54% und bei Bewohnern eines Pflegeheims bei 4,26% (Wendt et al., 1999).

In Oxford waren im Jahr 1992 2% der Patienten aus allgemeinmedizinischen Praxen mit VRE kolonisiert (Jordens et al., 1994). In den Niederlanden beschrieben Endtz *et al.* 1997 eine VRE-Prävalenz von 2% bei Personen, die sich wegen Durchfall in einer Krankenhausambulanz vorstellten (Endtz et al., 1997). Bei der Untersuchung von Analabstrichen von Mitarbeitern in nicht-klinischen Bereichen eines Krankenhauses in Frankreich zeigte sich 1997 eine VRE-Prävalenz von 11,8% (Gambarotto et al., 2000). In der Schweiz fand sich 1998 und 1999 in 4,9% der Stuhlproben von Angestellten in der Nahrungsmittelindustrie VRE (Balzereit-Scheuerlein and Stephan, 2001). Bei einer

tschechischen Studie wurden zwischen 2002 und 2003 etwa 3.000 Analabstriche aus der gesunden Bevölkerung eines Kreises auf VRE untersucht, wobei die Prävalenz bei 0,4% lag (Kolar et al., 2006). Dies bestätigte eine andere Studie, die 2003 in über 5.000 Analabstrichen aus der gesunden Bevölkerung einer tschechischen Stadt nur in neun Proben (0,17%) VRE fand (Kolar et al., 2004). Bei einer Untersuchung von Stuhlproben von 313 Kindern aus 46 verschiedenen Vorschulen in Uppsala, Schweden konnte 2010 kein VRE nachgewiesen werden (Kaarme et al., 2015). In einer weiteren europäischen Studie ließ sich 2013 in Mazedonien in 7,7% der getesteten Stuhlproben von nicht-hospitalisierten Patienten aus der Bevölkerung VRE nachweisen (Trajkovska-Dokic et al., 2015).

## **1.4 Molekulargenetische Typisierungsverfahren**

Für die Aufklärung nosokomialer Ausbrüche ist es hilfreich, die infektiösauslösenden Erreger zu typisieren (Wichelhaus et al., 2000). So lässt sich bestimmen, ob epidemiologisch verwandte Isolate auch genetisch verwandt sind, die mögliche Ausbreitung klonaler Isolate nachverfolgen und es lassen sich idealerweise weitere Infektionen verhindern (Wichelhaus et al., 2000).

Mögliche Methoden zur Typisierung von Enterokokken umfassen unter anderem Genom Sequenzierung (Raven et al., 2017), Ribotypisierung, Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-basierte Typisierung, Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP), Multiple locus variable number of tandem repeat Analyse (MLVA) und Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) (Werner, 2013). Die PFGE und MLST wurden in dieser Arbeit zur molekulargenetischen Typisierung der VRE-Isolate verwendet und werden deshalb hier kurz beschrieben.

### **1.4.1 Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)**

Die MLST ist eine auf DNA-Sequenzierung basierende Methode, bei der die Nukleotidsequenzen interner Fragmente von sieben Haushaltsgenen (Housekeeping genes) bestimmt werden (Feil et al., 2004). Haushaltsgene haben den Vorteil, dass sie in allen Isolaten einer Spezies vorkommen und der auf ihnen lastende Selektionsdruck

relativ gering ist (Ranjbar et al., 2014). Deshalb wird davon ausgegangen, dass die genetischen Unterschiede innerhalb dieser Loci durch Mutationen (und nicht durch Rekombination) entstanden sind und die entsprechende Mutationsrate proportional zur Zeit ist (Francisco et al., 2009). Den unterschiedlichen Allelen der Haushaltsgene können über eine Online-Datenbank Nummern und jeder Kombination von Allelen ein Sequenztyp (ST) zugeordnet werden (Francisco et al., 2009). Über die Datenbank können Isolate der gleichen Spezies weltweit miteinander verglichen werden (de Been et al., 2015). Für die Typisierung von *E. faecium* wurde 2002 ein MLST-Schema veröffentlicht (Homan et al., 2002).

Die Ergebnisse der MLST können anschließend mithilfe des enhanced Based Upon Related Sequence Types (eBURST)-Algorithmus phylogenetisch ausgewertet werden (Feil et al., 2004). Dieser teilt die Isolate nach Verwandtschaftsgrad in Gruppen, sogenannte Clonal Complexes (CC), ein und bestimmt die wahrscheinlichen Ursprungsisolate, von denen die anderen Isolate des CC abstammen (Feil et al., 2004). Die Verwandtschaftsgrade können dann als Baum-Diagramm dargestellt werden (Francisco et al., 2009). Eine Weiterentwicklung des eBURST-Algorithmus stellt global optimal eBURST (goeBURST) dar, der für eine globale Verwendung optimiert wurde (Francisco et al., 2009).

Die MLST ist durch ihre Möglichkeit der eindeutigen Zuordnung von Isolaten zu definierten ST besonders geeignet für überregionale und weltweite epidemiologische Studien, die die Ausbreitung multiresistenter Keime verfolgen und analysieren (Homan et al., 2002).

Die weltweit für nosokomiale Infektionen verantwortlichen VRE-Isolate gehören größtenteils zu CC 17 (Willems et al., 2005). Diese offensichtlich speziell an Krankenhäuser adaptierte Subpopulation zeichnet sich durch eine besonders hohe Pathogenität aus (Kramer et al., 2018). CC 17 angehörende VRE-Stämme sind zusätzlich gegen Ampicillin resistent (Willems et al., 2005), weisen das *purK*-Allel 1 auf (Willems et al., 2001) und besitzen eine spezielle Pathogenitätsinsel, die das Virulenz-Gen *esp* enthält (Leavis et al., 2004). Die Entwicklung dieser Subpopulation wurde wahrscheinlich durch den hohen in Krankenhäusern herrschenden Selektionsdruck gefördert (Willems et al., 2005).

In Deutschland sind einige ST besonders verbreitet. Zwischen 2011 und 2014 war ST 192 mit 33% der vom Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken des RKI in Deutschland am häufigsten nachgewiesene ST von *E. faecium*, vor ST 117 (25%) und ST 17 (16%) (Bender et al., 2016). Im Jahr 2015 sah diese Verteilung anders aus: ST 117 war der häufigste ST vor ST 203 und ST 80 (Klare et al., 2017). Dieser Trend bestätigte sich 2016: Mit 53% war mehr als die Hälfte der *E. faecium*-Einsendungen vom ST 117 (Klare et al., 2017). ST 203 machte 14% und ST 80 11% aus (Klare et al., 2017).

#### **1.4.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

PFGE gilt als der Goldstandard für die Genotypisierung von VRE (Brandt et al., 2018; Lytsy et al., 2017). Durch ihre hohe Diskriminierungsfähigkeit und Reproduzierbarkeit wird sie zu epidemiologischen Untersuchungen bei Ausbrüchen verschiedenster Erreger eingesetzt (Ranjbar et al., 2014).

Die Methode basiert auf der Auftrennung besonders großer DNA-Moleküle bis hin zu einer Größe von 10 Megabasenpaaren (Mbp) (Herschleb et al., 2007). Das gesamte bakterielle Genom wird mit einem selten schneidenden Restriktionsenzym verdaut und die entstehenden Fragmente mithilfe eines elektrischen Felds aufgetrennt (Ranjbar et al., 2014). Die Richtung dieses elektrischen Felds wird dabei periodisch alterniert, sodass sich die Moleküle immer wieder neu ausrichten müssen (Herschleb et al., 2007). Die Länge der Pulszeiten korreliert dabei mit der Größe der ideal aufgetrennten Moleküle: Je kürzer die Pulszeiten, desto größer ist der Vorteil kürzerer DNA-Moleküle, die dann besser aufgetrennt werden und damit auf dem Gel deutlicher voneinander zu unterscheiden sind (Herschleb et al., 2007). Die entstehenden Bandenprofile können anschließend mithilfe verschiedener Computersysteme ausgewertet werden (Ranjbar et al., 2014). Durch die geringe Anzahl an Banden (in der Regel 10-25) ist ein Vergleich der Profile mehrerer Isolate relativ einfach möglich (Miranda et al., 1991). Miranda *et al.* verwendeten diese Methode 1991 das erste Mal erfolgreich zu Typisierung von *E. faecium*-Isolaten (Miranda et al., 1991).

## 2 Fragestellung

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, macht *E. faecium* mittlerweile den größten Anteil der isolierten VRE aus. Dabei ist seit wenigen Jahren die vanB-Resistenz in *E. faecium* deutlicher häufiger als die vanA-Resistenz. VanB-positive *E. faecium* haben damit größte klinische Relevanz und stellen durch immer neue Antibiotika-Resistenzen ein großes therapeutisches Problem dar (Kapitel 1.2.1). Um die Verbreitung dieser Pathogene nachverfolgen, dieser entgegenwirken und Ausbrüche frühzeitig eindämmen zu können, sind Typisierungen der Bakterien im Zuge von epidemiologischen Studien von großer Bedeutung (Wichelhaus et al., 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll eine epidemiologische Typisierung von vanB-positiven *E. faecium*-Isolaten von zwei deutschen Kliniken, dem Universitätsklinikum (UK) Essen und dem Klinikum Nürnberg, durchgeführt werden. Dabei werden alle Isolate mithilfe der bereits etablierten molekularbiologischen Methoden Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) charakterisiert und mögliche genotypische Ähnlichkeiten und Verwandtschaftsgrade, Abstammungen und mögliche Ausbreitungswege bestimmt.

Mithilfe der MLST wird die Frage beantwortet, welche Sequenztypen in den beiden Krankenhäusern zu finden sind und wie die Isolate genotypisch miteinander in Beziehung stehen. Über die Sequenztypen werden die Isolate in Clonal Complexes eingeteilt und diskutiert, welches die möglichen Ursprungsisolate sein könnten. Es wird außerdem analysiert, wie sich die gefundenen Ergebnisse der MLST in die aktuell in Deutschland herrschende Situation einordnen lassen.

Mithilfe der PFGE wird untersucht, welche PFGE-Typen die Isolate aufweisen und ob sich durch die PFGE monoklonale Ausbrüche bestätigen lassen.

Die Ergebnisse der MLST und PFGE werden miteinander in Beziehung gesetzt und die sich ergebenden Übereinstimmungen und Diskrepanzen analysiert.

Zusätzlich soll anhand der Ergebnisse diskutiert werden, inwieweit die beiden Methoden sich für die hier vorliegende Arbeit eignen und welche Vor- und Nachteile die beiden Methoden in dem Bezug mit sich bringen.

### 3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien tabellarisch dargestellt und die in dieser Arbeit angewendeten Methoden beschrieben.

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Hersteller, dessen Standort und Chargen-Nummer des Produkts.

Produktname	Hersteller	Standort	CAS-Nummer
Elutionspuffer: RNA-Lysis Buffer	Promega	Fitchburg (USA)	0000307303
Nuklease-freies Wasser (Nuclease free water)	Promega	Fitchburg (USA)	0000334315
Primer Enterokokken PCR <ul style="list-style-type: none"> <li>• ddIE. faecium</li> <li>• ddIE. faecalis</li> <li>• vanA</li> <li>• vanB</li> </ul>	TIB Molbiol ®	Berlin	vorwärts: 1900060 rückwärts: 1900061  vorwärts: 1900062 rückwärts: 1900063  vorwärts: 1900064 rückwärts: 1900065  vorwärts: 1900066 rückwärts: 1900067
Taq PCR Core Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>• QIAGEN PCR-Puffer 10-fach konzentriert</li> <li>• Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP-Mix)</li> </ul>	Qiagen	Hilden	1600413224

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>	<b>CAS-Nummer</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Taq DNA Polymerase (5 Units/<math>\mu</math>l)</li> </ul>			
Agarose <ul style="list-style-type: none"> <li>Biozym LE Agarose</li> <li>Low-Melting-Point-Agarose</li> <li>Pulse Field Certified Agarose</li> </ul>	Biozym BioRad BioRad	Potsdam München München	0000520836 BRM00004 64115665
TRIS-Borat-EDTA-Puffer 10-fach konzentriert	BioRad	München	64123600
TRIS-Borat-EDTA-Puffer 0,5-fach konzentriert (verdünnt mit VE-Wasser)			
PeqGreen	peqlab	Erlangen	105123600
Größenmarker: DNA Ladder short-run 50 $\mu$ g	Carl Roth GmbH	Karlsruhe	805
Primer MLST <ol style="list-style-type: none"> <li>atpA</li> <li>ddl</li> <li>gdh</li> <li>purK</li> <li>gyd</li> <li>pstS</li> <li>adk</li> </ol>	TIB Molbiol ®	Berlin	1) 1: 1909189 / 2: 1909190 2) 1: 1909191 / 2: 1909192 3) 1: 1909193 / 2: 1909194 4) 1: 1909195 / 2: 1909196 5) 1: 1909197 / 2: 1909198 6) 1: 1909199 / 2: 1909200 7) 1: 1909201 / 2: 1909202

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>	<b>CAS-Nummer</b>
DNA-Aufreinigung: ExS-Pure™ Enzymatic PCR cleanup kit	NimaGen BV	Nijmegen, Niederlande	NG170818K
Zell-Suspensions-Puffer: Cell Suspension Buffer (500 ml) - 0,6 g Tris - 0,55 g NaCl - 9,3 g EDTA - pH 7,2 mit HCl	BioRad	München	64096367
Lysozym Puffer: Lysozyme Solution Buffer (500 ml) - 0,6 g Tris - 1,45 g EDTA - 1 g Natrium-Desoxycholat - pH 7,2 mit HCl - nach Autoklavieren + 2,5 g Natrium- Lauroylsarcosin	BioRad	München	64035566
Proteinase K-Puffer (500 ml) - 18,61 g EDTA - 2 g NaOH - 1 g Natrium-Desoycholat - pH 8,0 mit HCl/ NaOH - nach Autoklavieren + 5 g Natrium- Lauroylsarcosin	BioRad	München	64084311
Wasch Puffer 10-fach konzentriert (500 ml) - 12,1 g Tris - 93,05 g EDTA - 10 g NaOH - pH 8,0 mit HCl/NaOH	BioRad	München	64089340

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>	<b>CAS-Nummer</b>
Wasch Puffer 1-fach konzentriert (verdünnt mit Aqua B. Braun)			
Wasch Puffer 0,1-fach konzentriert (verdünnt mit Aqua B. Braun)			
Lysozym	Roth	Karlsruhe	437264302
Lysostaphin - 1 mg= 250 Units - in 1 ml 50% Glycerin auflösen	Sigma	Steinheim	108M4041V
Proteinase K	Roth	Karlsruhe	261166601
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (1000 mM) - 174,2 mg - in 10 ml 2-Propanol auflösen	Sigma	Steinheim	8OH5023
Restriktionspuffer 10-fach konzentriert - 33 mM Tris - 10 mM Mg - 66 mM K-Acetat - 0,5 mM Dithiothreitol (DTT)			
Restriktionspuffer 1-fach konzentriert (verdünnt mit Aqua B. Braun)			
Restriktionskit • Restriktionspuffer 10-fach konzentriert	Roche	Mannheim	25712900  27722820

Produktname	Hersteller	Standort	CAS-Nummer
<ul style="list-style-type: none"> <li>Restriktionsenzym <i>Sma</i>I</li> </ul>			
Bovines Serumalbumin (BSA) 0,1%	Sigma	Steinheim	57H1089
PFGE Größenmarker Lambda PFG Ladder	Roth	Karlsruhe	0041712
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Roth	Karlsruhe	38722975

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und dessen Standort.

Produktname	Hersteller	Standort
innuSPEED Lysis Tube B	Analytik Jena	Jena
automatische Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen 10-1000 µl	STARLAB GmbH	Hamburg
Impfösen 1 µl + 10 µl	Sarstedt	Nürnbergrecht
Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>Kartuschen</li> <li>Spatel</li> <li>Elutionsgefäße (0,5 ml)</li> </ul>	Promega	Fitchburg, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg
Schraubgefäße <ul style="list-style-type: none"> <li>2 ml</li> <li>13 ml</li> <li>50 ml</li> </ul>	Sarstedt	Nürnbergrecht
PCR-Gefäße: PCR Tubes 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG	Steinfurt
Pergamin Papier	Whatman - Schleicher & Schuell	Dassel

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Messzylinder 100	DWK Life Sciences - Duran	Wertheim
Messzylinder 1000	Kartell Labware	Noviglio, Italy
Erlenmeyerkolben <ul style="list-style-type: none"> <li>• 250 ml</li> <li>• 3000 ml</li> </ul>	Bohemia Cristal – Simax	Selb (Bayern)
96-Well ELISA Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Austria
Untersuchungshandschuhe Nitril Blau	Remesco - Dermagrip	Wien, Austria
PCR-Gefäß-Streifen: PCR-Tube-Caps (8er-Streifen)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG	Steinfurt
Versandmaterialien für MLST <ul style="list-style-type: none"> <li>• Barcode-Etiketten</li> <li>• Briefumschläge</li> </ul>	LGC Genomics	Berlin
Klebeband	tesa	Norderstedt
MicroScan Gefäße: MicroScan-Tubes 3 ml (B1015-2, Inoculation Water)	Beckman Coulter	Krefeld
CELLSTAR Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Glasflasche 5000 ml	Schott	Mainz
Alufolie	Roth	Obergerlafingen
Agarplatten mit Schafsblut	Oxoid Deutschland GmbH	Wesel

### 3.1.3 Geräte

*Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Hersteller und dessen Standort.*

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Brutschrank KB 720	Binder	Tuttlingen
Kühlschränke 4°C	Liebherr	Bulle FR, Schweiz

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
-20°C Gastro-Gefrierschrank-Profi-Line Ventiliert	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riß
Rüttler: MagNA Lyser	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5415C</li> <li>• Tischzentrifuge</li> </ul>	Eppendorf Biozym	Hamburg Hessisch Oldendorf
DNA-Aufreiniger: Maxwell16 MDx	Promega	Madison, USA
Thermocycler <ul style="list-style-type: none"> <li>• TOne</li> <li>• Modell PTC-100TM Programmable Thermal Controller</li> </ul>	Biometra MJ Research, Inc	Göttingen Watertown Massachusetts, USA
Gelkammer mit Probenkamm	Roth	Obergerlafingen
Elektrophoresekammer	Roth	Obergerlafingen
Photodokumentierer BioVision	Vilter	Cudahy, USA
Spektrophotometer: NanoDrop 1000™ UV/VIS Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Wilmington, USA
Vortex-Mischer	Oehmen	Essen
Agaroseblöckchen-Form (Plug-Molds)	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Densitometer: DENSILAMETER II	Erba Lachema s.r.o.	Brno, Tschechische Republik
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG	Uetze
Thermoblocks <ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermomixer Comfort</li> <li>• Mixing Block</li> </ul>	Eppendorf Bioer	Hamburg Hangzhou, China

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Gelkammer PFGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Rahmen für Elektrophoresekammer PFGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Elektrophoresegerät PFGE <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kammer</li> <li>• Steuereinheit</li> <li>• Pumpe</li> <li>• Kühlmodul</li> <li>• Schläuche</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Mikrowelle	Sharp	Osaka, Japan

### 3.1.4 Datenbanken und Software

*Tabelle 4: Verwendete Datenbanken und Softwares mit Internetadresse/ Hersteller und Standort.*

<b>Name</b>	<b>Website/ Hersteller</b>	<b>Standort</b>
pubMed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>	Bethesda MD, USA
LGC Genomics Shop	<a href="https://shop.lgcgenomics.com/">https://shop.lgcgenomics.com/</a>	Berlin
pubMLST	<a href="https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_efaecium_isolates">https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_efaecium_isolates</a>	Oxford, England
CLIQS 1D Pro 1.3.063	TotalLab	Newcastle upon Tyne, England
PHYLOViZ	<a href="http://www.phyloviz.net/">http://www.phyloviz.net/</a>	

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Isolate**

Die 128 untersuchten VRE-Isolate wurden zwischen 2011 und 2013 sowie 2017 und 2018 im UK Essen und 2018 im Klinikum Nürnberg gesammelt. 81 der Isolate stammen aus Essen, 47 aus Nürnberg, die dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. med Jörg Steinmann zur Verfügung gestellt wurden. Die Isolate stammen aus verschiedenen Materialien, die in Tabelle 13 (Kapitel 4.3) dargestellt sind. Zum größten Teil wurden die Isolate aus Analabstrichen, Blutkulturen und Urin isoliert. Es wurden nur patientenbereinigte Isolate verwendet, die zu der Spezies *E. faecium* gehören und vanB-positiv sind. Für eine einfache Handhabung wurden diese mit den Zahlen 1-128 kodiert. Zu Forschungszwecken für diese Arbeit wurden die Isolate in Kryoröhrchen im Tiefkühlschrank bei -20°C konserviert.

### **3.2.2 DNA Extraktion für PCR**

Sowohl für die folgende Enterokokken-PCR als auch für die MLST wurde die DNA der Isolate extrahiert. Dafür wurde der Maxwell16 nach Vorgaben des Herstellers verwendet (Schagat et al., 2007).

20 bis 30 Isolate wurden über Nacht auf Agarplatten mit Schafsblut im Brutschrank bei 36°C kultiviert. Pro Isolat wurden 500 µl Elutionspuffer in ein innuSPEED Lysis Tube B pipettiert und drei Mal mit 1 µl Impfösen Kulturmaterial eingerieben. Die Tubes wurden dann 2x90 s bei 5000 rpm im MagNa Lyser geschüttelt, um die Zellwände aufzubrechen und die DNA freizusetzen und anschließend 30 s bei 140000 rpm zentrifugiert (Chen et al., 2005). Die Kartuschen wurden in den vorgegebenen Rahmen des Maxwell16 eingeklinkt und die Spatel und Elutionsgefäße in die entsprechenden Öffnungen eingesetzt. 50 µl Nuklease-freies Wasser wurde in die Elutionsgefäße gegeben. 300 µl des DNA-haltigen Überstands wurde aus den Lysis Tubes in die entsprechende Vertiefung der Kartuschen überführt. Das Programm zur DNA-Extraktion wurde nach Herstellerangaben gestartet und nach 39 Minuten konnten die Elutionsgefäße mit der in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluierten DNA entnommen werden.

Anschließend wurde mittels NanoDrop 1000™ UV/VIS Spectrophotometer die DNA-Konzentration bestimmt. Eine minimale Konzentration von 30 ng/μl wurde zur Weiterverarbeitung benötigt.

### 3.2.3 Enterokokken-PCR

Da in dieser Arbeit nur Isolate der Spezies *E. faecium* und mit dem Resistenz-Typ vanB verwendet wurden, mussten zunächst die Isolate herausgefiltert werden, die einer anderen Art zugeordnet werden konnten oder einen anderen van-Status besaßen. Es wurde eine PCR durchgeführt, die gleichzeitig den Nachweis des Genotyps der Glykopeptid-Resistenz und die Identifikation der Spezies der Isolate erlaubt (Dutka-Malen et al., 1995). Dafür wurden vier Primer-Paare eingesetzt. Die zur Identifizierung des Stamms benötigten Sequenzen befinden sich auf den sogenannten ddl-Genen, die für die D-Alanin-D-Alanin-Ligasen codieren und jeweils spezifisch für die Arten *E. faecalis* und *E. faecium* sind (Dutka-Malen et al., 1995). Um den Genotyp der Glykopeptid-Resistenz zu ermitteln, wurden Teile der vanA- und vanB-Gene amplifiziert (Dutka-Malen et al., 1995).

Tabelle 5: Primer für die Enterokokken-PCR.

Name	Richtung	Sequenz
ddl <sub>E. faecium</sub>	Vorwärts	5'-ATC AAG TAC AGT TAG TCT T (19 mer)
	Rückwärts	5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG (18 mer)
ddl <sub>E. faecalis</sub>	Vorwärts	5'-GCA AGG CTT CTT AGA GA (17 mer)
	Rückwärts	5'-CAT CGT GTA AGC TAA CTT C (19 mer)
vanA	Vorwärts	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC (17 mer)
	Rückwärts	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA (17 mer)
vanB	Vorwärts	5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC (17 mer)
	Rückwärts	5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC (17 mer)

Für den Reaktionsansatz der PCR wurde die eluierte DNA zunächst mit Nuklease-freiem Wasser auf 1 ng/μl verdünnt. Dann wurde der Master-Mix angesetzt.

Tabelle 6: Master-Mix für die Enterokokken-PCR (Menge für 5 Ansätze).

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
QIAGEN PCR-Puffer 10-fach konzentriert	10
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP-Mix)	2
Taq DNA Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)	0,5
Nuklease-freies Wasser	69,5
8 Primer (100 $\mu$ M)	je 1
	<b>90</b>

Pro PCR-Ansatz wurden 18  $\mu$ l Master-Mix und 2  $\mu$ l DNA (1 ng/ $\mu$ l) in ein 0,2 ml PCR-Gefäß pipettiert und zur Amplifizierung in den TOne Thermocycler von Biometra gegeben.

Tabelle 7: PCR-Zyklen für die Enterokokken-PCR.

	Schritt	Zyklenzahl	Zeit [s]	Temperatur [ $^{\circ}$ C]
1	Denaturierung	1	120	94
2	Denaturierung	19	45	94
	Primerhybridisierung		45	50
	Elongation		45	72
3	Elongation	1	300	72

Anschließend wurden die Amplifikate mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Für ein 1%iges Gel wurden 0,3 g Agarose mit 30 ml 0,5-fach konzentriertem TRIS-Borat-EDTA-Puffer (0,5x TBE-Puffer) aufgekocht, nach dem Abkühlen mit 3  $\mu$ l PeqGreen versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erhärten wurde das Gel in die mit 300 ml 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und 3  $\mu$ l Größenmarker (DNA Ladder short-run 50  $\mu$ g) in die erste und letzte Geltasche sowie 7  $\mu$ l der auf einer Mikrotiterplatte mit 3  $\mu$ l blauem Probenpuffer gemischten PCR-Amplifikate in die restlichen Geltaschen aufgetragen. Das Gel wurde bei 100 V für 30-45 min laufen gelassen und anschließend mit dem BioVision photodokumentiert.

Als Kontrollen wurden drei Isolate bekannter Spezies und mit bekanntem van-Status verwendet: Ein Isolat der Art *E. faecalis* ohne van-Gen (K1) und zwei der Art *E. faecium* jeweils vanA- (K2) oder vanB-positiv (K3). Deren DNA wurde bei jedem PCR-Durchlauf mit amplifiziert und die Amplifikate mit auf die Gele aufgetragen. Durch Vergleich der Bandengrößen konnten so die Spezies und der van-Status der Test-Isolate identifiziert werden.

### **3.2.4 Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)**

Als erste Methode zur Charakterisierung der Isolate wurde die MLST eingesetzt. Dabei werden Gen-Sequenzen von sieben Haushaltsgenen amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert (Homan et al., 2002). So können die Allele der jeweiligen Loci bestimmt und die Allel-Kombinationen ST zugeordnet werden (Ranjbar et al., 2014).

#### **3.2.4.1 MLST-PCR**

Für die Amplifikation der Loci wurden sieben Primer-Paare verwendet. Die entsprechenden Loci befinden sich auf den folgenden sieben Haushaltsgenen: *adk* (Adenylat-Kinase), *atpA* (Adenosintriphosphat-Synthase, alpha Subunit), *ddl* (D-Alanin-D-Alanin-Ligase), *gyd* (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), *gdh* (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), *purK* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, ATPase Subunit) und *pstS* (Phosphat- ATP-bindende Kasette Transporter) (Homan et al., 2002).

Tabelle 8: Primer für die MLST-PCR.

Name	Richtung	Sequenz
adk	vorwärts	5'-TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG (21 mer)
	rückwärts	5'-GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT (20 mer)
atpA	vorwärts	5'-CGGTTC ATA CGG AAT GGC ACA (21 mer)
	rückwärts	5'-AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG (20 mer)
ddl	vorwärts	5'-GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G (22 mer)
	rückwärts	5'-AAA AAG AAA TCG CAC CG (17 mer)
gdh	vorwärts	5'-GGC GCA CTA AAAGAT ATG GT (20 mer)
	rückwärts	5'-CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA (24 mer)
gyd	vorwärts	5'-CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C (22 mer)
	rückwärts	5'-CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC (21 mer)
purK	vorwärts	5'-GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT (21 mer)
	rückwärts	5'-TAC ATA AAT CCC GCC TGT TTY (21 mer)
pstS	vorwärts	5'-TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G (22 mer)
	rückwärts	5'-CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC (20 mer)

Die DNA der Isolate wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 1 ng/μl verdünnt. Für jeden Locus wurde ein Master-Mix angesetzt, der das entsprechende Primer-Paar enthielt, also sowohl das Vorwärts- als auch das Rückwärts-Oligonukleotid.

Tabelle 9: Master-Mix für die MLST-PCR (Menge für 4 Ansätze).

Reagenz	Menge [μl]
QIAGEN PCR-Puffer 10-fach konzentriert	10
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP-Mix)	2
Taq DNA Polymerase (5 Units/μl)	0,5
Nuklease-freies Wasser	65,5
Vorwärts-Primer (25 μM)	1
Rückwärts-Primer (25 μM)	1
	<b>80</b>

Pro Isolat wurden sieben PCR-Ansätze in einem PCR-Gefäß-Streifen (8er-Streifen) vorbereitet. In je ein PCR-Gefäß wurden 5 µl DNA (1 ng/µl) des Isolats und 20 µl von einem der sieben Master-Mixe pipettiert. Die Amplifikation im TOne Thermocycler von Biometra fand unter den in Tabelle 10 aufgeführten Bedingungen statt.

*Tabelle 10: PCR-Zyklus für die MLST-PCR.*

	<b>Schritt</b>	<b>Zyklenzahl</b>	<b>Zeit [s]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>
1	Denaturierung	1	900	95
2	Denaturierung	34	30	94
	Primerhybridisierung		30	50
	Elongation		30	72
3	Elongation	1	300	72

Bei den ersten Versuchen wurde nach Beendigung der PCR eine Gelelektrophorese zur Kontrolle der Amplifikate durchgeführt, bevor mit der Aufreinigung der Amplifikate fortgefahren wurde.

#### ***3.2.4.2 Aufreinigung der Amplifikate***

Bevor mit der Sequenzierung fortgefahren wurde, wurden die Amplifikate aufgereinigt. Dazu wurde das NimaGen's ExS-Pure™ Enzymatic PCR cleanup kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die beiden darin enthaltenen hydrolytischen Enzyme Exonuklease-1 and Shrimp-Alkaline-Phosphatase entfernen die Oligonukleotide und eliminieren alle übrigen dNTPs, welche die Sequenzierung beeinträchtigen würden (Nimagen, 2012).

Von den Amplifikaten wurden je 5 µl mit 2 µl Ex's Pure in PCR-Gefäß-Streifen (8er-Streifen) gemischt und in den Thermocycler PTC-100 von MJ Research, Inc gegeben (4 min bei 37°C und 1 min bei 90°C).

### **3.2.4.3 Sequenzierung**

Die aufgereinigten Amplifikate wurden zunächst 1:4 verdünnt. Dazu wurde zu den 7  $\mu$ l Amplifikat 28  $\mu$ l destilliertes Wasser hinzu pipettiert. Dann wurden die Sequenzierungsansätze vorbereitet: Pro Isolat wurden 14 1,5 ml Reaktionsgefäße bereitgestellt. In je zwei dieser Gefäße kamen 10  $\mu$ l des gleichen aufgereinigten und verdünnten Amplifikats von einem der sieben Loci und 4  $\mu$ l des entsprechenden Primers (5  $\mu$ M): zu dem ersten Amplifikat 4  $\mu$ l des Vorwärts-Primers und zu dem zweiten 4  $\mu$ l des Rückwärts-Primers. Pro Isolat erhielt man also 14 Sequenzierungsansätze, von denen immer zwei die Amplifikate eines der sieben Haushaltsgene enthielten.

Für die Sequenzierung wurden die Ansätze zu der Firma LGC Genomics nach Berlin geschickt. Dafür konnte auf der Internetseite von LGC Genomics (Link siehe Tabelle 4) eine Bestellung generiert werden. Die Reaktionsgefäße wurden dann mit den zugehörigen Barcode-Etiketten beklebt und in die Briefumschläge verpackt.

### **3.2.4.4 Ergebnisse**

Die Ergebnisse konnten nach etwa ein bis zwei Tagen auf der Internetseite des LGC Genomics Shops (Link siehe Tabelle 4) eingesehen und heruntergeladen und die Sequenzen für die sieben Gene auf PubMLST (Link siehe Tabelle 4) eingegeben werden. So ließen sich die Allele für die sieben Haushaltsgene bestimmen und den einzelnen Isolaten über die Allele ein ST zuordnen.

Mithilfe der Software PHYLOViZ, die den goeBurst Algorithmus verwendet, konnte eine phylogenetische Analyse der Ergebnisse durchgeführt und ein Baum erstellt werden, der die ST bildlich miteinander in Verbindung setzt (Francisco et al., 2009).

### **3.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Nach der MLST wurde mit allen Isolaten die PFGE durchgeführt. Dabei wurde das gesamte Bakteriengenom mithilfe des Restriktionsenzym *Sma*I (Erkennungssequenz CCCGGG) in wenige große DNA-Fragmente geschnitten, die dann mithilfe einer Gelelektrophorese in einem alternierenden elektrischen Feld aufgetrennt wurden

(Miranda et al., 1991). Ein Lauf der PFGE inklusive Präparation und Restriktionsverdau dauerte vier Tage.

### **3.2.5.1 Vorbereitung und Präparation (1. Tag)**

Pro Durchlauf der PFGE konnten bis zu 13 Isolate charakterisiert werden. Als Kontrolle wurde das bereits bei der Enterokokken-PCR erwähnte Isolat K3 vom Stamm *E. faecium* und positivem vanB-Status verwendet.

Die Isolate wurden vor Beginn der Präparation auf Agarplatten mit Schafsblut zwei bis vier Tage im Brutschrank bei 36°C kultiviert. Pro Isolat wurde ein 3 ml MicroScan-Tube (B1015-2, Inoculation Water) mit etwa vier bis sieben vollen 1 µl Impfösen eingerieben, die optische Dichte gemessen und so auf OD 600 = 0,8-0,85 eingestellt. 1 ml dieser Suspensionen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde dann in 250 µl Zell-Suspensions-Puffer resuspendiert.

Bevor mit der Lyse der Zellwände fortgefahren wurde, wurden die Bakterien in Agaroseblöckchen eingebettet, um die freigesetzte DNA vor Scherkräften und damit verbundenen mechanischen Schäden zu schützen (Schwartz and Cantor, 1984; Wichelhaus et al., 2000). Pro Isolat wurden dazu 4 mg Lysozym (-20°C) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit je 50 µl Zell-Suspensions-Puffer pro Isolat aufgelöst. Das Lysostaphin (-20°C) wurde 5 min vor Gebrauch aus dem Tiefkühlschrank entnommen. Dann wurden 0,5 g Low-Melting-Point (LMP) Agarose in ein 50 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 25 ml Zell-Suspensions-Puffer vorsichtig in der Mikrowelle bei 400 W aufgeköcht, bis sie vollständig aufgelöst war. Zu den 250 µl Bakteriensuspension wurden nun 10 µl Lysostaphin (250 U/ml), 50 µl Lysozym (4 mg/Ansatz) und 350 µl 2%ige LMP-Agarose (56°C) hinzugegeben, durch Pipettieren vorsichtig gemischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren und die Suspension luftblasenfrei in die abgeklebten Agaroseblöckchen-Formen (Plug-Molds) pipettiert. Pro Isolat erhielt man drei bis fünf Blöckchen, die 15-20 min im Kühlschrank bei 4-8°C aushärteten.

In der Zwischenzeit wurde pro Ansatz 1 ml Lysozym Puffer in ein 2 ml Schraubgefäß pipettiert und bei 37°C im Thermoblock vorgewärmt. Die in den erhärteten Agaroseblöckchen enthaltenen Bakterien wurden dann in dem vorgewärmten Lysozym Puffer 1,5 h bei 37°C im Thermoblock lysiert.

Pro Ansatz (+ 1x zusätzlich) wurden 2 mg Proteinase K in ein 1,5 ml Schraubgefäß eingewogen und mit 50 µl Proteinase K Puffer aufgelöst. Nachdem der Lysozym Puffer mit einer Pipette entfernt wurde, wurden 950 µl vorgewärmter (56°C) Proteinase K Puffer und 50 µl Proteinase K (aus dem vorbereiteten Schraubgefäß) auf die Blöckchen pipettiert und diese im Wasserbad bei 56°C inkubiert, bis sie vollständig durchsichtig wurden (etwa 1 h).

Anschließend wurden die Agaroseblöckchen zunächst 2x30 min mit 1 ml Waschpuffer 1-fach konzentriert und 10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (0,1 M) und anschließend 2x30 min ohne PMSF bei 37°C im Thermoblock gewaschen. Die Schraubgefäße mit den Blöckchen und dem Waschpuffer wurden dann über Nacht bei 4-8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.2.5.2 Restriktionsverdau (2. Tag)**

Je ein Agaroseblöckchen wurde aus den 2 ml Schraubgefäßen mithilfe einer umgebogenen 1 µl Impföse in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geschoben und 3x15 min mit 1 ml Waschpuffer 0,1-fach konzentriert bei 25°C und 30 rpm im Thermoblock gewaschen. Anschließend wurden die Blöckchen 15 min in 500 µl Restriktionspuffer 1-fach konzentriert bei 25°C und 300 rpm im Thermoblock inkubiert. Für den Restriktionsverdau wurden in einem 13 ml Schraubgefäß pro Isolat 117 µl destilliertes Wasser, 15 µl Bovines Serumalbumin (BSA) (0,1%), 15 µl Restriktionspuffer 10-fach konzentriert, und 3 µl Restriktionsenzym *SmaI* gemischt und die Agaroseblöckchen in 150 µl des Restriktionsgemisches über Nacht bei 25°C im Thermoblock inkubiert. Da die Blöckchen zerbrechlich und nicht leicht von den 150 µl zu bedecken waren, ohne sie zu beschädigen, wurden ab dem vierten Durchlauf der PFGE die Blöckchen bereits vor dem Restriktionsverdau mithilfe von zwei Deckgläsern halbiert und nicht erst wie bei den ersten Versuchen direkt vor dem Auftragen auf das Gel.

### 3.2.5.3 Gelelektrophorese (3. Tag)

Nach dem Restriktionsverdau wurde das Restriktionsgemisch entfernt und die Blöckchen 3x15 min mit 1 ml Waschpuffer 0,1-fach konzentriert bei 25°C und 300 rpm im Thermoblock gewaschen. Dann wurden die Blöckchen mindestens 15 min in 0,5 ml 0,5x TBE-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Gelelektrophorese wurden 2,2 l 0,5x TBE-Puffer in der 5 l Glasflasche vorbereitet, in die Elektrophoresekammer gefüllt und die in Tabelle 11 aufgeführten Parameter eingestellt.

Tabelle 11: Einstellungen für die PFGE zur Charakterisierung der Enterkokken-Isolate.

Gerät	Einstellung
Kühlmodul	10 °C
Pumpe	70
Steuereinheit	
• Spannung	6 V
• Winkel	120 °
• Pulszeiten:	
▪ Block 1	5 s für 4 h
▪ Block 2	10 s für 10 h
▪ Block 3	25 s für 10 h

Die Luftblasen konnten durch Drücken auf den Schlauch aus dem System entfernt werden. Der Puffer wurde mindestens 45 min vor Beginn der Gelelektrophorese zum Vorkühlen in die Kammer gegeben. In der Zwischenzeit wurde das Gel vorbereitet: Für ein 1%iges Gel wurden 1 g PFGE-Agarose in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100 ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die Agarose wurde dann 10 min im Wasserbad (56 °C) abgekühlt und anschließend in den Rahmen gegossen. Nachdem das Gel erhärtet war, konnte der Kamm entfernt werden. Mithilfe einer 1 µl Impföse wurde immer ein Blöckchen auf ein Deckgläschen geschoben, die überschüssige Flüssigkeit mit einer 200 µl Pipette abgesaugt und das Gelblöckchen mit einem zweiten Deckgläschen halbiert (ab dem vierten Durchlauf der PFGE waren die Blöckchen zu diesem Zeitpunkt bereits halbiert). Jeweils ein halbes Blöckchen wurde nun

in den Geltaschen platziert, die andere Hälfte konnte in dem mit 0,5x TBE-Puffer gefüllten Reaktionsgefäß im Kühlschrank aufbewahrt werden. Als Größenmarker wurde der Lambda PFG Ladder verwendet, von dem mit dem Deckgläschen zwei 1 mm Scheiben abgeschnitten und in den beiden äußeren Taschen aufgetragen wurden. Anschließend wurden alle Taschen mit 1%iger LMP-Agarose überschichtet und nach kurzem Erhärten das Gel mit der Bodenplatte in den passenden Rahmen in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Programm wurde gestartet und nach 24 h war die Elektrophorese beendet.

#### **3.2.5.4 Färbung des Gels (4. Tag)**

Für die Färbung des Gels wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) verwendet. Das Gel wurde in eine Glasschale gelegt, mit Ethidiumbromid bedeckt und 30-45 min mit einer Metallschale abgedeckt unter einem Abzug gefärbt.

Anschließend wurde das Gel mit dem Gerät BioVision photodokumentiert.

#### **3.2.5.5 Auswertung**

Die photodokumentierten Gele wurden mit dem Programm CLIQS 1D Pro 1.3.063 von TotalLab ausgewertet. Dafür wurden die Banden der Gele markiert und dann alle Reihen miteinander verglichen. Die Einstellungen wurden folgendermaßen festgelegt: Rf Vector: 0,05; Minimum Rf: 0; Maximum Rf: 1; Similarity Koeffizient: Jaccard. Das Dendrogramm wurde nach dem Weighted Pair Group Method with Arithmetic mean (WPGMA)-Algorithmus erstellt. Die Cut-off Linie wurde bei 90% gesetzt, was bedeutet, dass die Isolate, deren Bandenprofil zu mindestens 90% und somit bis auf 1-2 Banden übereinstimmten, als zu einem Stamm gehörig angesehen wurden. Dabei wurde sich an den Interpretationskriterien von Tenover *et al.* orientiert, die 1995 mithilfe von *Staphylococcus aureus* für die Interpretation von Ausbrüchen aufgestellt wurden (Tenover et al., 1995). Demnach sind Isolate mit identischem Bandenmuster nicht unterscheidbar und Isolate mit höchstens drei Bandenunterschieden eng verwandt und zu einem Ausbruch gehörend (Tenover et al., 1995).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Selektion der Isolate mithilfe der Enterokokken-PCR

Die Enterokokken-PCR wurde mit 146 Isolaten durchgeführt. Davon wurden 18 Isolate, 15 aus Essen und drei aus Nürnberg, aufgrund der Nichterfüllung der Einschlusskriterien (Spezies: *E. faecium* + van-Status: B) aussortiert und daraufhin mit den übrigen 128 Isolaten weitergearbeitet (Abbildung 3).

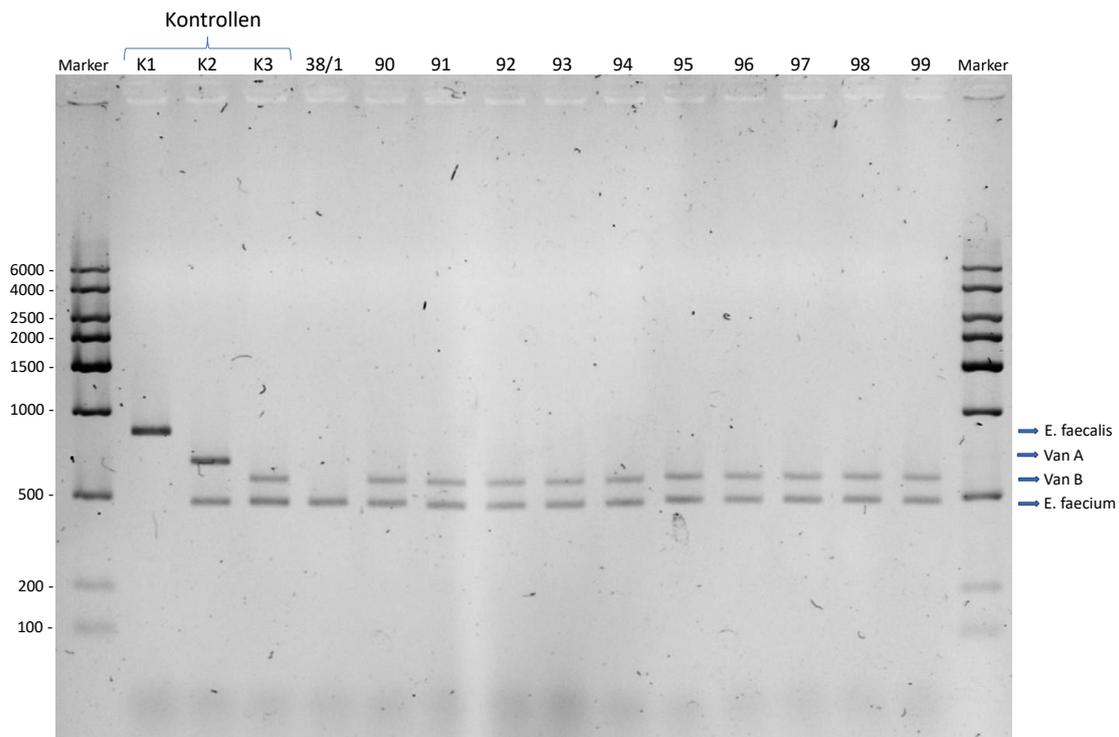


Abbildung 3: Beispiel von PCR-Amplifikaten der Enterokokken-PCR aufgetrennt durch ein 1%iges Agarose-Gel. Die Größe der PCR-Produkte in Basenpaaren ist links angegeben, die Bedeutung der Bande rechts (Dutka-Malen et al., 1995). Die Kontrolle K1 gehört dem Stamm *Enterococcus faecalis* an, die Kontrollen K2 und K3 dem Stamm *Enterococcus faecium*. K2 ist vanA-, K3 vanB-positiv. Von den elf gezeigten Isolaten erfüllen zehn die Einschlusskriterien, während das Isolat 38/1 aufgrund des fehlenden vanB-Status aus der Arbeit ausgeschlossen wurde.

Vier der aussortierten Isolate waren vanA-positiv, drei sowohl vanA- als auch vanB-positiv und bei elf Isolaten konnte kein vanA-bzw. vanB-Status festgestellt werden, wovon ein Isolat zusätzlich der Spezies *E. faecalis* angehörte und ein weiteres Isolat keiner der beiden Arten zugeordnet werden konnte.

So blieben für die Charakterisierung mittels MLST und PFGE 81 Isolate aus Essen und 47 Isolate aus Nürnberg übrig.

## **4.2 Charakterisierung mittels Multilocus-Sequenztypisierung**

Die 128 Isolate ließen sich mittels Kombination der sieben Allele jeweils einem ST zuordnen. Für einige Allel-Kombinationen war in der Datenbank pubMLST (Link siehe Tabelle 4) (Abrufdatum: 15.02.2019) noch kein passender ST hinterlegt und bei Berücksichtigung von nur sechs Allelen konnten die Isolate einer Vielzahl von ST zugeordnet werden. Um diese Isolate trotzdem mit in die Ergebnisse aufnehmen zu können, wurden sie nach einem ST benannt, von dem sie nur in einem Allel abweichen, und dieser mit einem Strich versehen (ST 117', ST 80', ST 17'). Fünf Isolate ließen sich zwei verschiedenen ST zuordnen. Das kam dadurch zustande, dass die beiden Allele eines Gens nicht immer übereinstimmten, sondern zwei verschiedene Allele angegeben waren. Dadurch kamen auch zwei verschiedene Allel-Kombinationen zustande. Wenn beide Allel-Kombinationen in der Datenbank hinterlegt waren, wurden die entsprechenden Isolate nach beiden benannt (z.B. ST 1301/80).

### **4.2.1 Verteilung der Sequenz-Typen**

Wie in Tabelle 12 dargestellt, ließen sich insgesamt 15 verschiedene ST finden: ST 117, ST 192, ST 80, ST 78, ST 1301/80, ST 1039/192, ST 925, ST 551, ST 17, ST 1180, ST 203, ST 539, ST 117', ST 80', ST 17'. Im UK Essen waren es sieben verschiedene (ST 117, ST 192, ST 80, ST 78, ST 1039/192, ST 925, ST 1180) und in Nürnberg zehn verschiedene ST (ST 117, ST 80, ST 1301/80, ST 551, ST 17, ST 203, ST 539, ST 117', ST 80', ST 17').

Tabelle 12: Zusammenfassung der Multilocus-Sequenztypisierungs-Ergebnisse und Verteilung der Sequenz-Typen (ST). Der Strich bei einigen ST (z. B. ST 117') bedeutet, dass für diese Allel-Kombination noch kein ST in der Datenbank hinterlegt war und dieser deshalb nach dem ST benannt wurde, von dem er in nur einem Allel abweicht.

ST	Gesamt		Essen		Nürnberg	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
117	56	<b>43,8%</b>	39	<b>48,2%</b>	17	<b>36,2%</b>
192	32	<b>25,0%</b>	32	<b>39,5%</b>	0	<b>0,0%</b>
80	12	<b>9,4%</b>	1	<b>1,2%</b>	11	<b>23,4%</b>
78	4	<b>3,1%</b>	4	<b>4,9%</b>	0	<b>0,0%</b>
1301/80	4	<b>3,1%</b>	0	<b>0,0%</b>	4	<b>8,5%</b>
1039/192	2	<b>1,6%</b>	2	<b>2,5%</b>	0	<b>0,0%</b>
925	2	<b>1,6%</b>	2	<b>2,5%</b>	0	<b>0,0%</b>
551	2	<b>1,6%</b>	0	<b>0,0%</b>	2	<b>4,3%</b>
17	2	<b>1,6%</b>	0	<b>0,0%</b>	2	<b>4,3%</b>
1180/117	1	<b>0,8%</b>	1	<b>1,2%</b>	0	<b>0,0%</b>
203	1	<b>0,8%</b>	0	<b>0,0%</b>	1	<b>2,1%</b>
539	1	<b>0,8%</b>	0	<b>0,0%</b>	1	<b>2,1%</b>
117'	7	<b>5,5%</b>	0	<b>0,0%</b>	7	<b>14,9%</b>
80'	1	<b>0,8%</b>	0	<b>0,0%</b>	1	<b>2,1%</b>
17'	1	<b>0,8%</b>	0	<b>0,0%</b>	1	<b>2,1%</b>
	<b>128</b>		<b>81</b>		<b>47</b>	

Der sowohl insgesamt als auch separat in Essen und Nürnberg am häufigsten vorkommende ST war ST 117. Ihm ließen sich insgesamt 56 Isolate (43,8%) zuordnen. Im UK Essen waren es mit 39 Isolaten 48,2%, im Klinikum Nürnberg 17 Isolate (36,2%).

Der insgesamt zweithäufigste und in den Jahren 2011 und 2012 in Essen dominierende ST war mit 32 zugehörigen Isolaten ST 192. Dieser machte prozentual 25% aller Isolate und 39,5% der Essener Isolate aus. Zwei weitere Isolate aus Essen ließen sich aufgrund ihrer Allele sowohl dem ST 192 als auch ST 1039 zuordnen und wurden deshalb separat aufgeführt (ST 1039/192). Da zwischen 2012 und 2017 keine Isolate vorliegen, konnte über diesen Zeitraum keine Aussage getroffen werden. Ab 2017 trat der ST 192 jedoch

nicht mehr auf. Aus dem Klinikum Nürnberg lagen nur Isolate aus dem Jahr 2018 vor; auch hier konnte ST 192 nicht gefunden werden.

Der dritthäufigste gefundene ST war mit insgesamt zwölf Isolaten ST 80 (9,4%). Im UK Essen fand sich nur ein einziges Isolat mit diesem ST, im Klinikum Nürnberg elf (23,4%). Vier weitere Isolate aus Nürnberg ließen sich wie oben bereits einmal beschrieben nicht definitiv einem der beiden ST 80 und ST 1301 zuordnen und wurden deshalb ebenfalls separat bezeichnet (ST 1301/80).

Der ST 78 fand sich insgesamt vier Mal (3,1%). Alle vier Isolate stammten aus dem UK Essen (4,9%) aus den Jahren 2011 und 2012.

Die sieben Isolate, die dem ST 117<sup>+</sup> zugeordnet wurden, ließen sich mithilfe der Datenbank keinem bekannten ST zuordnen. Da sie jedoch nur in einem Allel von dem ST 117 abwichen, wurden sie nach diesem ST 117<sup>+</sup> genannt. Diese sieben Isolate machten insgesamt 5,5% aller Isolate aus und stammten aus dem Klinikum Nürnberg (14,9%).

Auch die beiden einzelnen Isolate ST 80<sup>+</sup> und ST 17<sup>+</sup> stammten aus Nürnberg.

Von ST 925 wurden zwei Isolate, von ST 1180 ein Isolat (alle drei im UK Essen) gefunden.

Jeweils zwei Isolate konnten ST 551 und ST 17 zugeordnet werden. Nur jeweils ein Isolat fand sich von ST 203 und ST 539. Alle sechs Isolate stammten aus Nürnberg.

Werden die Isolate aus den Jahren 2011 und 2012 einmal in der Berechnung nicht berücksichtigt und so die aktuelle Verteilung der ST betrachtet, wird die Dominanz des ST 117 noch deutlicher. Mit 62,4% macht er mehr als die Hälfte und mit deutlichem Abstand den Großteil aller Isolate aus, gefolgt von ST 80 mit 14,1% und ST 117<sup>+</sup> mit 8,2%.

#### **4.2.2 Phylogenetische Analyse der Ergebnisse**

Nach phylogenetischer Analyse der MLST-Ergebnisse mit der Software PHYLOVIZ, erstellte das Programm mit den vorhandenen ST einen Baum. Um auch die Isolate, deren ST noch nicht in der Datenbank hinterlegt waren und selbst benannt wurden (ST 117<sup>+</sup>,

ST 80‘. ST 17‘) mit in die bildliche Analyse aufnehmen zu können, wurde der Baum nachgestellt und ergänzt (Abbildung 4).

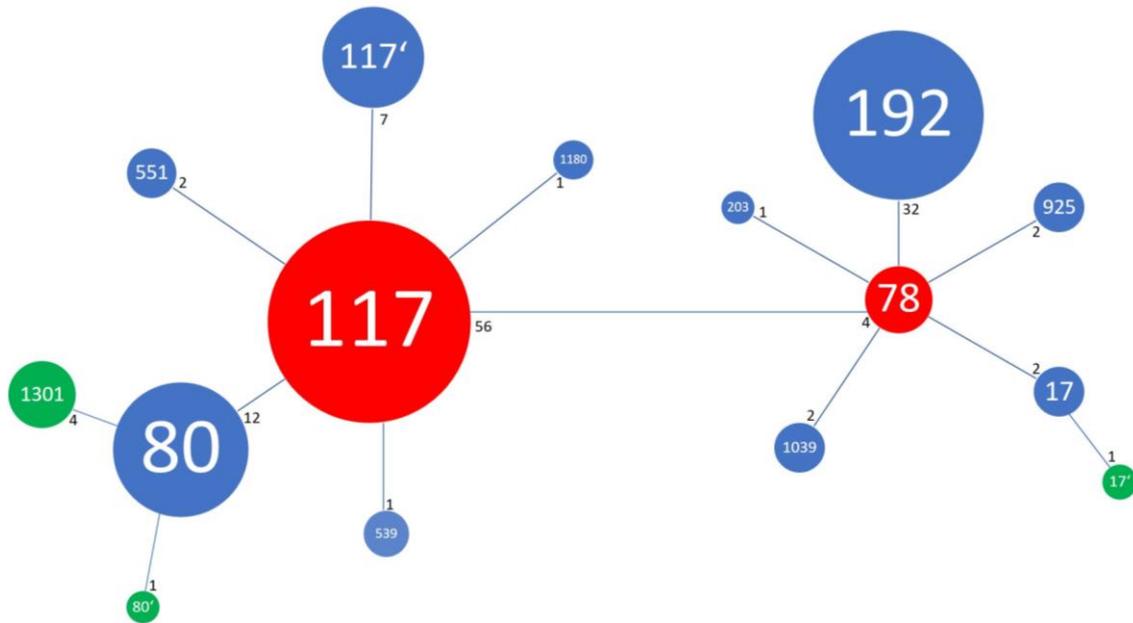


Abbildung 4: Darstellung der Allelunterschiede der verschiedenen Sequenz-Typen (ST) nach goeBURST Analyse (PHYLOViZ). Die Zahlen innerhalb der Kreise entsprechen den ST. Die ST 117 und 78 sind hier die beiden Ausgangsisolate (rote Kreise). Eine blaue Verbindungslinie zwischen den ST bedeutet eine Alleldifferenz (blaue Kreise), zwei Verbindungslinien zwei Alleldifferenzen (grüne Kreise) zu dem jeweiligen Ausgangstyp. ST 117 und ST 78 unterscheiden sich ebenfalls in einem Locus. Die schwarze Zahl neben den Kreisen entspricht der Anzahl der Isolate, die insgesamt in Essen und Nürnberg von diesem ST gefunden wurden. Die Größe der Kreise entspricht dabei ebenfalls der gefundenen Anzahl an Isolaten.

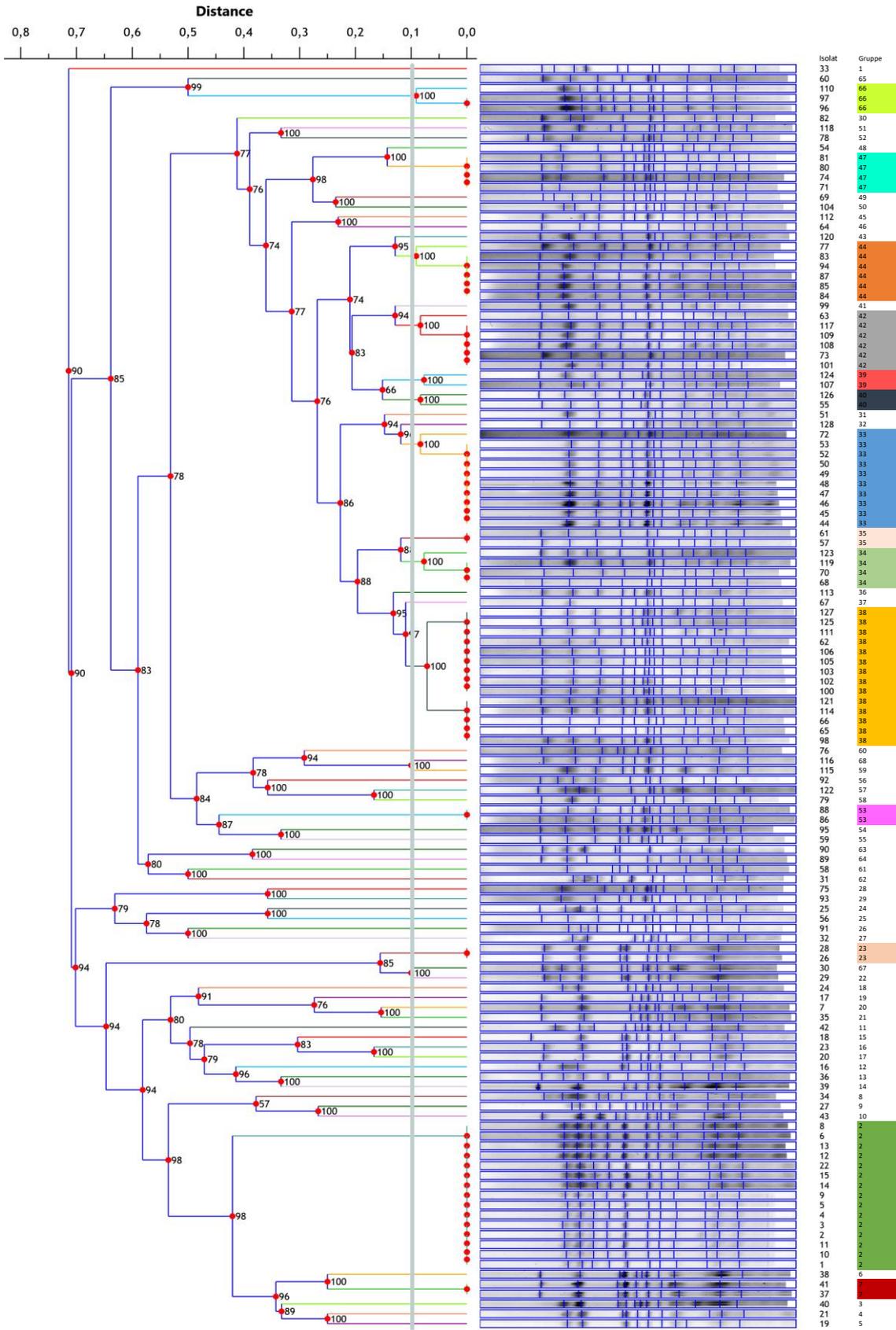
Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, bilden die ST der 128 Isolate eine große Gruppe mit zwei unterscheidbaren Untergruppen. Sie clustern um die ST 117 und ST 78 herum und unterscheiden sich von diesen in maximal zwei der sieben Haushaltsgene.

In dieser Gruppe lässt sich ein Essener- und ein Nürnberger MLST-Pool unterscheiden. Nur die ST 117 und ST 80 fanden sich in beiden Kliniken (siehe Kapitel 4.2.1). Dem ST 80 ließ sich dabei in Essen aber nur ein einziges Isolat zuordnen. Ansonsten fanden sich die ST alle entweder in Essen (ST 192, ST 78, ST 1039/192, ST 925, ST 1180/117)

oder in Nürnberg (ST 1301/80, ST 551, ST 17, ST 203, ST 539, ST 117', ST 17', ST 80') (siehe Tabelle 12).

### **4.3 Charakterisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese**

In Abbildung 5 ist das Ergebnis der Auswertung aller Gele mithilfe des Programms CLIQS 1D Pro 1.3.063 als Dendrogramm dargestellt. Es wird der klonale Verwandtschaftsgrad aller 128 untersuchten Isolate basierend auf der Restriktion mit *SmaI* und anschließender phylogenetischer Analyse gezeigt. Die graue Linie als Cut-off liegt bei 90% und unterteilt die Isolate in 68 PFGE-Typen (Abbildung 5). Alle Isolate, deren Verbindungslinien sich rechts von der grauen Linie treffen, bilden einen Genotyp. Alle anderen Isolate stellen unterschiedliche Genotypen dar und gehören damit zu unterschiedlichen PFGE-Typen. Es fanden sich bei den Isolaten zwischen neun und 16 Banden, im Durchschnitt waren es elf bis zwölf Banden. Das heißt, in einem PFGE-Typ unterscheiden sich die Isolate in maximal einer Bande. Wie an Abbildung 5 dargestellt, clustern viele Isolate in größeren Gruppen.



*Abbildung 5: Dendrogramm der untersuchten 128 E. faecium-Isolate nach Pulsfeldgelelektrophorese mit SmaI-Restriktionsverdau. Der Maßstab links oben zeigt die Ähnlichkeit der Isolate an. Je kleiner die Distanz, desto näher verwandt sind die Isolate. Bei 90% ist eine graue Linie gezogen: die sich rechts davon aufspaltenden Zweige gehören zu einer Gruppe, also zu einem PFGE-Typ. PFGE-Typen mit mehr als zwei Isolaten sind farblich markiert.*

Wie man Abbildung 5 entnehmen kann, stellt PFGE-Typ 2 den größten PFGE-Typ mit 15 Isolaten dar. In Tabelle 13 lässt sich erkennen, dass alle 15 Isolate des PFGE-Typs 2 zwischen Mai und Juli 2011 auf kardiologischen Stationen (HZ) des UK Essen gefunden wurden, zwölf davon auf den zwei Intensivstationen (HZI).

Der zweitgrößte PFGE-Typ ist mit 14 Isolaten der PFGE-Typ 38. Drei dieser Isolate wurden im Juni und Juli 2018 im UK Essen gefunden, die anderen elf Isolate zwischen August und Dezember 2018 auf unterschiedlichen Stationen im Klinikum Nürnberg. Von den elf Isolaten aus Nürnberg fanden sich drei in der Allgemein-, Viszeral-, Thoraxchirurgie (AC/VC/TC) und zwei in der Urologie (U3).

Der PFGE-Typ 33 wurde bei zehn Isolaten gefunden und stellt damit den drittgrößten PFGE-Typ dar. Neun Isolate des PFGE-Typs 33 wurden im Dezember 2017 auf der Intensivstation (PZ) und der Normalstation (K4) der Neonatologie im UK Essen durch Analabstriche nachgewiesen (Tabelle 13). Das zehnte Isolat dieses PFGE-Typs stammt aus dem Westdeutschen Tumorzentrum (WTZ1) des UK Essen, wo es sieben Monate später ebenfalls in einem Analabstrich gefunden wurde.

Von den beiden PFGE-Typen 42 und 44 fanden sich jeweils sechs Isolate. Zwei der Isolate des PFGE-Typs 42 stammten aus dem UK Essen von Juni und Juli 2018, die restlichen vier aus dem Klinikum Nürnberg zwischen August und November 2018. Zu dem PFGE-Typ 44 gehörte ein Isolat aus Essen von Juli 2018 und fünf Nürnberger Isolate, die zwischen April und Juli isoliert worden waren.

Zu den PFGE-Typen 34 und 47 gehören jeweils vier Isolate. PFGE-Typ 34 enthält zwei Essener Isolate von Juli 2018 und zwei Nürnberger Isolate von November und Dezember 2018. Die vier Isolate der Gruppe 47 fanden sich im Juli und August 2018 im UK Essen, davon zwei auf der Neurochirurgischen Intensivstation (NCIT).

Von PFGE-Typ 66 fanden sich drei Isolate im August und Oktober 2018 im Klinikum Nürnberg.

Den folgenden PFGE-Typen ließen sich jeweils zwei Isolate zuordnen: PFGE-Typ 7 (UK Essen), PFGE-Typ 23 (UK Essen, Internistisch-neurologische Intensivstation (INTK)), Gruppe 35 (UK Essen), PFGE-Typ 29 (Klinikum Nürnberg), PFGE-Typ 40 (UK Essen und Klinikum Nürnberg) und PFGE-Typ 53 (Klinikum Nürnberg).

Alle anderen PFGE-Typen waren nur ein Mal vertreten.

Zum großen Teil ließen sich also auch bei der PFGE wieder Essener und Nürnberger Cluster unterscheiden; nur fünf der 68 PFGE-Typen waren klinikumsübergreifend: PFGE-Typ 34, PFGE-Typ 38, PFGE-Typ 40, PFGE-Typ 42 und PFGE-Typ 44. Alle anderen Gruppen waren auf einen der beiden Standorte beschränkt.

*Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung und der Pulsfeldgelelektrophorese. Legende: Die Essener Isolat-Nummern sind blau (1-81), die Nürnberger Isolat-Nummern schwarz markiert (82-128). Übereinstimmende Sequenz-Typen der Multilocus-Sequenztypisierung und PFGE-Typen der Pulsfeldgelelektrophorese sind jeweils farbig hinterlegt. Das Datum des Probeneingangs, das jeweilige Material und die Station, auf der der Patient lag, sind ebenfalls angegeben. Abkürzungen: MLST-ST: Multilocus-Sequenztypisierung-Sequenz-Typen, PFGE-Typen: Pulsfeldgelelektrophorese-Typen, AB NRR: Abstrich Nasenrachenraum, gyn: gynäkologischer, intraabd: intraabdomineller, intraop: intraoperativer, transgastr: transgastrale, HZ: Herzzentrum, HZI: Herzzentrum-Intensivstation, KMT: Knochenmarkstransplantation, INTK: Internistisch-neurologische Intensivstation, AC: Allgemeinchirurgie, M: Medizinisches Zentrum, TC: Thoraxchirurgie, PZ: Perinatalzentrum, KIK: Kinderklinik, WTZ: Westdeutsches Tumorzentrum, NCIT: Neurochirurgische Intensivstation, IT: Intensivstation, MIMC: Medizinisches Zentrum- intermediate care unit, U: Urologie, W: Pneumologie, UC: Unfallchirurgie, Gastro: Gastroenterologie, O/UC: Orthopädie/Unfallchirurgie, IM: Innere Medizin, Nephro: Nephrologie, AC/VC/TC: Allgemein-, Viszeral-, Thoraxchirurgie, CIT: chirurgische Intensivstation, A3: unbekannt, IIT: innere Intensivstation, C/A/U/HNO: Chirurgie, Augenheilkunde, Urologie, Hals-Nasenohren-Heilkunde, GC: Gefäßchirurgie, Psych: Psychiatrie, KIT: kardiologische Intensivstation, AU: urologische Ambulanz, U: Urologie, L3: unbekannt, Onko: Onkologie, NIT: nephrologische Intensivstation, Nephro: Nephrologie, NeTrans: Nephrologie (Transplantation), IM/C Wahl: Station Wahlleistungen Innere Medizin + Chirurgie, Pneu: Pneumologie, Neuro SU: Neurologie Stroke Unit, Onko/Häm: Onkologie/Hämatologie, Priv: interdisziplinäre Privatstation.*

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
1	23.05.2011	Atemwege	HZI1	1039/192	2
2	19.06.2011	Blutkultur	HZI1	192	2
3	30.05.2011	Blutkultur	HZI1	192	2
4	26.05.2011	Atemwege	HZI1	192	2

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
5	20.06.2011	Blutkultur	HZI1	192	2
6	27.06.2011	Atemwege	HZI1	192	2
7	20.06.2011	Atemwege	HZI1	192	20
8	29.06.2011	Analabstrich	HZI1	192	2
9	04.07.2011	Analabstrich	HZI1	192	2
10	04.07.2011	Analabstrich	HZI4	192	2
11	04.07.2011	Analabstrich	HZI1	192	2
12	05.07.2011	Analabstrich	HZ3	192	2
13	29.06.2011	Analabstrich	HZ2	192	2
14	04.07.2011	Analabstrich	HZI2	192	2
15	07.07.2011	Analabstrich	HZI2	192	2
16	08.07.2011	Analabstrich	HZI1	78	12
17	06.07.2011	Analabstrich	HZI1	192	19
18	11.07.2011	Analabstrich	INTK	192	15
19	13.07.2011	Blutkultur	HZI1	192	5
20	12.07.2011	Analabstrich	HZI2	192	17
21	10.08.2011	Analabstrich	HZ2	192	4
22	16.06.2011	Analabstrich	HZ2	192	2
23	16.08.2011	Analabstrich	HZ3	192	16
24	22.08.2011	Urin	NTP	925	18
25	29.08.2011	Hautabstrich	KMT3	117	24
26	05.09.2011	Analabstrich	INTK	192	23
27	04.08.2011	Analabstrich	INTK	117	9
28	12.09.2011	Analabstrich	INTK	192	23
29	12.09.2011	Analabstrich	INTK	192	22
30	12.09.2011	Analabstrich	INTK	192	67
31	16.09.2011	Analabstrich	HZ3	192	62
32	26.09.2011	AB NRR	AC34	925	27
33	26.10.2011	Blutkultur	KMT1	117	1
34	04.11.2011	Urin	M6/M7	1039/192	8

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
35	04.11.2011	Analabstrich	M9	192	21
36	04.11.2011	Analabstrich	INTK	78	13
37	28.11.2011	Atemwege	KMT2	192	7
38	28.11.2011	Analabstrich	TC	192	6
39	30.11.2011	Analabstrich	HZI2	78	14
40	05.12.2011	Analabstrich	KMT1	192	3
41	12.03.2012	Analabstrich	INTK	192	7
42	15.11.2012	Analabstrich	INTK	78	11
43	15.11.2012	Analabstrich	INTK	192	10
44	11.12.2017	Liquor	PZ	117	33
45	04.12.2017	Atemwege	PZ	117	33
46	11.12.2017	Analabstrich	PZ	117	33
47	11.12.2017	Analabstrich	PZ	117	33
48	11.12.2017	Analabstrich	PZ	117	33
49	11.12.2017	Analabstrich	KIK4	117	33
50	15.12.2017	Analabstrich	KIK4F	117	33
51	12.12.2017	Analabstrich	KIK4	117	31
52	11.12.2017	Analabstrich	KIK4	117	33
53	18.12.2017	Analabstrich	KIK4F	117	33
54	31.01.2018	Blutkultur	WTZ3	117	48
55	20.02.2018	Blutkultur	HZI1	117	40
56	09.03.2018	Blutkultur	IT2	117	25
57	15.03.2018	Blutkultur	IT2	117	35
58	22.03.2018	Blutkultur	IT2	80	61
59	05.03.2018	Blutkultur	HZI1	117	55
60	08.04.2018	Blutkultur	IT2	117	65
61	30.04.2018	Blutkultur	HZI1	1180/117	35
62	05.06.2018	Blutkultur	MIMC	117	38
63	14.06.2018	Blutkultur	M2B	117	42
64	10.06.2018	Blutkultur	AC1I	117	46

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
65	04.06.2018	Blutkultur	WTZ2	117	38
66	21.07.2018	Blutkultur	HZI1	117	38
67	28.07.2018	Blutkultur	WTZ2	117	37
68	30.07.2018	Analabstrich	WTZ1	117	34
69	31.07.2018	Analabstrich	U2	117	49
70	30.07.2018	Analabstrich	HZ1	117	34
71	30.07.2018	Analabstrich	NCIT	117	47
72	31.07.2018	Analabstrich	WTZ1	117	33
73	31.07.2018	Analabstrich	W1	117	42
74	06.08.2018	Analabstrich	UC1I	117	47
75	06.08.2018	Analabstrich	AC34	117	28
76	07.08.2018	Analabstrich	KMT	117	60
77	06.07.2018	Analabstrich	WTZ1	117	44
78	09.08.2018	Analabstrich	MIMC	117	52
79	09.08.2018	Analabstrich	MIMC	117	58
80	10.08.2018	Analabstrich	WTZ3	117	47
81	12.08.2018	Analabstrich	NCIT	117	47
82	12.02.2018	Darmbiopsie	Gastro7	117	30
83	16.04.2018	gyn. Abstrich	O/UC	80	44
84	18.04.2018	Urin	IM	80	44
85	08.05.2018	gyn. Abstrich	O/UC	80	44
86	07.06.2018	intraabd. Abstrich	IT	117	53
87	05.07.2018	Urin	Nephro2	80	44
88	05.07.2018	intraop. Abstrich	AC/VC/TC2	117	53
89	08.07.2018	Abszessabstrich	CITS	117'	64
90	11.07.2018	Darmbiopsie	A3	551	63
91	23.07.2018	Urin	IIT	117	26
92	13.07.2018	Galle	C/A/U/HNO	203	56
93	13.07.2018	Urin	IIT2	117	29

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
94	19.07.2018	Wundabstrich	GC	80	44
95	03.08.2018	Galle	Gastro5	117	54
96	17.08.2018	intraabd. Flüssigkeit	CITS	17	66
97	15.08.2018	Hautabstrich	Psych4	17	66
98	12.08.2018	Wundabstrich	KIT	117	38
99	15.08.2018	Wundabstrich	AC/VC/TC3	80	41
100	17.08.2018	Aszites	CITS 2	117'	38
101	16.08.2018	Urin	AU	80	42
102	16.08.2018	Wundabstrich	AC/VC/TC3	117	38
103	01.09.2018	Urin	U3	117	38
104	04.09.2018	Pleurapunktat	L3	551	50
105	17.09.2018	Urin	U3	117	38
106	23.09.2018	Wundabstrich	AC/VC/TC2	117	38
107	30.09.2018	Urin	Gastro7	80	39
108	06.10.2018	Urin	Onko2	1301/80	42
109	29.09.2018	Aszites	IIT2	80	42
110	09.10.2018	transgastr. Flüssigkeit	IIT2	17'	66
111	07.10.2018	Katheterspitze	NIT	117'	38
112	10.10.2018	Urin	IIT2	117'	45
113	15.10.2018	Wundabstrich	O/UC	117'	36
114	18.10.2018	Galle	Gastro6	117	38
115	24.10.2018	Wundabstrich	Nephro	117	59
116	30.10.2018	Galle	L3	117'	68
117	02.11.2018	Urin	Nephro	1301/80	42
118	05.11.2018	Blutkultur	IIT2	117	51
119	03.11.2018	Urin	NeTrans	80	34
120	04.11.2018	Urin	IM/C Wahl	80'	43

Isolat	Eingang	Material	Station	MLST-ST	PFGE-Typen
121	14.11.2018	Urin	Pneu4	117'	38
122	08.12.2018	Urin	Neuro SU	117	57
123	10.12.2018	Urin	Onko/Häm2	539	34
124	12.12.2018	Urin	NeTrans	1301/80	39
125	17.12.2018	Thoraxgewebe	AC/VC/TC2	1301/80	38
126	17.12.2018	Wundabstrich	iPriv4	80	40
127	23.12.2018	Wundabstrich	Nephro	117	38
128	23.12.2018	Wundabstrich	Onko/Häm2	117	32

#### 4.4 Vergleich der Ergebnisse

Wenn die Einteilung der Isolate in ST durch die MLST und in PFGE-Typen durch die PFGE miteinander verglichen wird, passen diese zum größten Teil zusammen (Tabelle 13). So lassen sich die meisten Isolate eines ST in viele unterschiedliche PFGE-Typen einteilen. Tatsächlich gibt es aber auch Ausnahmen. Einige PFGE-Typen enthalten nicht nur Isolate eines ST, sondern mehrerer verschiedener. 14 Isolate des PFGE-Typs 2 haben den ST 192 und ein Isolat den ST 1039/192. Die Isolate des PFGE-Typs 34 gehören drei verschiedenen ST an: Zwei Isolate sind von ST 117, ein Isolat von ST 80 und eins von ST 539. Bei PFGE-Typ 35 hat ein Isolat den ST 117, das andere ST 1180/117. Die 14 Isolate des PFGE-Typs 38 sind auf drei verschiedene ST verteilt: Zehn Isolate haben den ST 117, drei den ST 117' und eins den ST 1301/80. Zu PFGE-Typ 39 gehört ein Isolat mit ST 80 und eins mit ST 1301/80. Bei PFGE-Typ 42 befinden sich vier Isolate, davon zwei mit ST 80, eins mit ST 1301/80 und eins mit ST 117. Die sechs Isolate des PFGE-Typs 44 lassen sich bis auf ein Isolat dem ST 80 zuordnen; dieses gehört zu dem ST 117. PFGE-Typ 66 lässt sich auf zwei ST aufteilen: Zwei Isolate haben den ST 17 und ein Isolat den ST 17'.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Interpretation der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung**

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, ließen sich die 128 Isolate aus Essen und Nürnberg 15 verschiedenen ST zuordnen. Alle Isolate mit demselben ST bilden der Definition nach einen Stamm (Francisco et al., 2009). Die einzelnen Stämme unterscheiden sich in maximal zwei Allelen und bilden eine große Gruppe. Dies deutet auf einen engen Verwandtschaftsgrad auch unter den Stämmen und auf eine gemeinsame Abstammung hin. Durch die phylogenetische Analyse mit dem goeBURST-Algorithmus wurden die beiden Ursprungs-ST ST 117 und ST 78 bestimmt. Es wird angenommen, dass die Ursprungsisolate einen Überlebensvorteil in der jeweiligen Umgebung hatten und sich deshalb gut ausbreiten und vermehren konnten (Francisco et al., 2009). Mit der Zeit veränderten sich einzelne der sieben Haushaltsgene durch Mutationen, was zu neuen, aber dennoch der gleichen Gruppe zugehörigen ST führte (Francisco et al., 2009).

Wie in Kapitel 4.2.2 erläutert wird, unterscheiden sich die Essener und Nürnberger Isolate zum größten Teil in ihren ST und damit auch in ihrem genetischen Profil. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Isolate durch die unterschiedliche geographische Lage auch unterschiedlich entwickelt und angepasst haben.

### **5.2 Einordnung der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung**

Die 15 in dieser Arbeit identifizierten ST gehören alle dem CC 17 an (Francisco et al., 2009). Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, besitzen die zu CC 17 gehörenden Stämme eine hohe Pathogenität, sind optimal an Krankenhäuser adaptiert und weltweit verbreitet. Es ist also nicht überraschend, dass dieser CC auch in den beiden Krankenhäusern in Essen und Nürnberg gefunden wurde.

Von den 43 zwischen 2011 und 2012 im UK Essen gesammelten Isolaten, gehörten wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben 32 dem ST 192 an (Tabelle 13). Dies deckt sich mit den für diesen Zeitraum von dem RKI für Deutschland beschriebenen Daten, bei denen ST 192 zwischen 2011 und 2014 der häufigste nachgewiesene ST war (Kapitel 1.4.1).

ST 117 machte in dieser Arbeit mit Abstand den größten Teil aller sowohl in Essen als auch in Nürnberg gefundenen VRE-Isolate aus, vor allem ab 2017 (Kapitel 4.2.1). Dies

bestätigt ebenfalls die vom RKI in den letzten Jahren aufgezeigte Situation in Deutschland (Kapitel 1.4.1). 2015 und 2016 war ST 117 der am häufigsten eingesendete und vom RKI nachgewiesene ST in Deutschland, gefolgt von ST 203 und ST 80 (Kapitel 1.4.1). ST 80 war auch in dieser Arbeit mit zwölf Isolaten sehr häufig und insgesamt der dritt- und in Nürnberg sogar der zweithäufigste ST (Tabelle 12). Der ST 203 wurde in dieser Studie dagegen nur ein Mal in Nürnberg gefunden (Tabelle 12).

Die ST ST 117, ST 192, ST 17, ST 78 und ST 203 wurden von Willems *et al.* bereits 2011 als besonders erfolgreiche und weltweit verbreitete hoch-Risiko-Klone beschrieben, die für einen Großteil der *E. faecium*-Infektionen verantwortlich waren (Willems et al., 2011).

### **5.3 Interpretation der Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese**

Die 128 Isolate wurden wie in Kapitel 4.3 beschrieben durch ihre Banden-Profile in 68 PFGE-Typen sehr unterschiedlicher Größe eingeteilt. Da Bandenunterschiede von weniger als zwei Banden mit hoher Wahrscheinlichkeit durch ein einzelnes genetisches Event entstanden sind, werden die Isolate eines PFGE-Typs als mindestens eng verwandt definiert und entsprechen demnach einem Stamm beziehungsweise Klon (Tenover et al., 1995) (Kapitel 3.2.5.5).

Die 15 Isolate des PFGE-Typs 2 und die neun von zehn Isolate des PFGE-Typs 33 wurden über einen kurzen zeitlichen und räumlichen Abstand im Uniklinikum in Essen nachgewiesen (Kapitel 4.3). Damit lassen sich die zwei VRE-Ausbrüchen in der Kardiologie 2011 und im Perinatalzentrum 2017 molekulargenetisch bestätigen.

Wie in Kapitel 4.3 erwähnt, findet sich ein Isolat des PFGE-Typs 33, der 2017 für den Ausbruch im Perinatalzentrum verantwortlich war, sieben Monate später im Westdeutschen Tumorzentrum. Wie genau dieser spezielle VRE-Klon dorthin gekommen ist, lässt sich nicht sicher sagen; in einer Uniklinik herrscht jedoch reger Austausch zwischen den einzelnen Kliniken und Stationen, sowohl durch Patienten und Ärzte als auch durch Angehörige und Besucher. Außerdem zeichnen sich Enterokokken durch die Fähigkeit aus, auch auf trockenen Oberflächen monatelang überleben zu können (Kramer et al., 2006). Diese Überlegungen machen eine Übertragung zwischen weiter entfernten

Stationen und über diesen zeitlichen Abstand hinweg durchaus möglich. Die komplexen Übertragungswege von VRE zwischen verschiedenen Stationen wurden bereits in einer Studie von Raven *et al.* beschrieben (Raven *et al.*, 2017).

Auch ließen sich wie in Kapitel 4.3 beschrieben einige PFGE-Typen sowohl im UK Essen als auch im Klinikum Nürnberg nachweisen. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen ist es denkbar, dass ein Klon sich auch über diese sehr große Distanz durch Patienten, die von einem Krankenhaus in ein anderes verlegt wurden, Ärzte, Pflegepersonal oder auch verschiedenste Materialien, verbreitet hat. Da keine Isolate von anderen umliegenden Krankenhäusern vorlagen, kann nicht beurteilt werden, welche PFGE-Typen dort vorliegen und ob die jeweiligen PFGE-Typen möglicherweise auch dort zu finden sind. So eine überregionale Verbreitung bestimmter PFGE-Typen wurde jedoch auch schon in anderen Studien beobachtet (Bourdon *et al.*, 2011a; Klare *et al.*, 2017)

Es zeigte sich auch eine große Vielfalt an PFGE-Typen innerhalb einzelner Zentren und auf den verschiedenen Stationen (Tabelle 12). Dies deutet daraufhin, dass viele Patienten den Erreger nicht durch Übertragung innerhalb des Krankenhauses erworben haben, sondern ihren eigenen PFGE-Typ bereits von außerhalb mitgebracht haben.

#### **5.4 Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen**

Wenn man die Ergebnisse beider Methoden miteinander in Beziehung setzt, lassen sich viele Übereinstimmungen finden aber auch Unterschiede (Kapitel 4.4). Die PFGE lieferte mit 68 verschiedenen PFGE-Typen ein deutlich genaueres Ergebnis als die MLST mit 15 unterschiedlichen ST. Damit ließ sich die in der Literatur bereits beschriebene Aussage bestätigen, dass die PFGE eine höhere Diskriminierungskapazität als die MLST hat (Bourdon *et al.*, 2011b; Lytsy *et al.*, 2017).

Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, stimmen nicht alle Zuordnungen von ST und PFGE-Typen überein. Es lassen sich auch einige PFGE-Typen finden, die Isolate mit verschiedenen ST enthalten. Viele dieser Diskrepanzen sind aber darauf zurückzuführen, dass die Isolate, die durch zwei verschiedene Allele eines Gens auch zwei verschiedenen ST zuzuordnen waren, nach beiden ST benannt und diese Isolate nicht einfach dem

häufigeren ST zugeordnet wurden. Schaut man sich zum Beispiel PFGE-Typ 2 an, enthält auch der ST 1039/192 den ST 192 und somit alle Isolate dieser beiden ST den gleichen ST 192. Aber auch so lassen sich einige der Unterschiede nicht erklären. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die Limitation der Unterscheidungsfähigkeit der PFGE (Klare et al., 2017). In dieser Arbeit wurde die PFGE nur mit einem Restriktionsenzym durchgeführt. Dabei werden nur genetische Unterschiede identifiziert, die die Restriktionsstellen von *SmaI* betreffen oder die Länge der Fragmente verändern (Ranjbar et al., 2014). Mit einem anderen Restriktionsenzym würden möglicherweise andere Ergebnisse und Übereinstimmungen erfasst werden.

Außerdem sind bei beiden Methoden natürlich auch Fehler möglich. Bei der Sequenzierung der MLST könnte es theoretisch zu Verwechslungen von Proben gekommen sein oder zu Fehlern bei der Sequenzierung selbst. Beim Restriktionsverdau der PFGE ist es möglich, dass das Enzym trotz des langen Verdaus über Nacht nicht immer an allen Stellen mit der Erkennungssequenz tatsächlich geschnitten hat, was zu Veränderungen im Bandenmuster geführt hätte. Auch die Qualität der Gele schwankte, wodurch es durchaus zu fehlerhaften Interpretationen von Banden gekommen sein könnte. Das Auswertungsprogramm CLIQS 1D Pro 1.3.063 war komplex zu bedienen und es waren zahlreiche manuelle Schritte durch den Nutzer durchzuführen. Die Banden mussten teilweise per Hand markiert, verglichen und ausgewertet werden, was bei 128 Bandenprofilen eine mögliche Fehlerquelle darstellte.

## **5.5 Vergleich der Methoden in Bezug auf diese Studie**

Während die PFGE den Goldstandard für die Untersuchungen von lokalen Ausbrüchen nosokomialer Erreger darstellt, wird die MLST als standardmäßige Methode für krankenhausesübergreifende epidemiologische Beobachtungen und Vergleiche angesehen (Sivertsen et al., 2014).

Dies ließ sich in dieser Studie weitestgehend bestätigen. Wie in Kapitel 4.2 erläutert, unterteilte die MLST die 128 Isolate in 15 ST, was sowohl einen sehr einfachen Vergleich zwischen den beiden Kliniken als auch mit der aktuellen Literatur zuließ. Sie ist damit aber nicht besonders aussagekräftig, was die genotypischen Unterschiede der Isolate betrifft und täuscht teilweise eine enge epidemiologische Verwandtschaft vor, die

tatsächlich nicht vorhanden ist. Dies ließ sich mithilfe der PFGE zeigen, die die 128 Isolate in 68 Gruppen unterteilte und damit eine deutlich höhere Trennschärfe besaß (Kapitel 4.3). Dies ist hilfreich, wenn man Isolate eines Ausbruchs oder zeitlich und räumlich eng beieinander auftretende Isolate miteinander vergleichen will. Dafür erschwert die PFGE aufgrund fehlender Standardisierungsmöglichkeiten einen Vergleich zwischen verschiedenen Laboren (Lytsy et al., 2017; Morrison et al., 1999) und die Ergebnisse lassen sich so nicht in einen nationalen oder globalen Kontext einordnen. Da alle Isolate aus Essen und Nürnberg aber in einem Labor typisiert wurden, ließen sie sich sowohl innerhalb eines Krankenhauses als auch zwischen den beiden Kliniken mithilfe der PFGE sehr gut vergleichen. So war es möglich, sowohl vergangene Ausbrüche auf einen einzelnen Klon zurückzuführen, als auch große Unterschiede zwischen regional aufgetretenen Isolaten zu zeigen.

Somit haben beide Methoden ihre Vorteile in Bezug auf diese Arbeit und ließen vor allem in ihrer Kombination eine aussagekräftige und gut einzuordnende genotypische Charakterisierung der untersuchten vanB-positiven *E. faecium*-Isolate zu.

## **6 Fazit**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit mithilfe der MLST erhobenen Daten die bereits in anderen Studien beschriebene genotypische Verteilung von VRE in Deutschland bestätigen. Die mithilfe der PFGE gesammelten Ergebnisse ließen eine höhere Diskriminierung der Isolate zu und zeigten eine extrem diverse Epidemiologie auf, sowohl zwischen den beiden geographisch sehr unterschiedlich gelegenen Kliniken in Essen und Nürnberg, als auch innerhalb der beiden Krankenhäuser. Zwei VRE-Ausbrüche im Uniklinikum Essen ließen sich durch die PFGE molekulargenetisch bestätigen.

Die lokale Epidemiologie im UK Essen und Klinikum Nürnberg spiegelt damit die überregional bereits beschriebene Situation wider. Die gesammelten Ergebnisse sind wichtig in Bezug auf weitere epidemiologische Studien, um die Entwicklung der genotypischen Populationen in Deutschland und Europa zu beobachten und die intra- und interhospitalen Verbreitung bestimmter VRE-Stämme besser zu verstehen.

## 7 Zusammenfassung

Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* machen etwa 10-23% der nosokomialen Enterokokken-Infektionen aus und stellen durch die eingeschränkte Sensibilität gegenüber Antibiotika ein großes therapeutisches Problem dar. Im Rahmen dieser Studie wurde eine epidemiologische Typisierung von 128 *Enterococcus faecium*-Isolaten mit vanB-Resistenz von dem Universitätsklinikum Essen und dem Klinikum Nürnberg durchgeführt.

Die Isolate wurden mittels der bereits etablierten molekularbiologischen Methoden Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) charakterisiert und hinsichtlich ihrer genotypischen Ähnlichkeit sowohl untereinander als auch mit bereits publizierten Daten aus Deutschland verglichen.

Die in dieser Studie mithilfe der MLST gesammelten Ergebnisse bestätigten die von anderen Studien für Deutschland beschriebene Situation der genotypischen Verteilung von einzelnen Sequenztypen. Die PFGE teilte die untersuchten Isolate in eine Vielzahl von PFGE-Typen ein und zeigte eine große epidemiologische Diversität sowohl zwischen den Kliniken als auch innerhalb der beiden Krankenhäuser.

Weitere epidemiologische Studien sind notwendig, um die genotypische Verbreitung bestimmter Genotypen von Vancomycin-resistenten Enterokokken weiterzuverfolgen und zu vergleichen.

## 7 Abstract

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* account for around 10-23% of nosocomial enterococcal infections and constitute a big therapeutic problem due to their limited susceptibility to antibiotics. In the context of this study, an epidemiological typing of 128 *Enterococcus faecium*-isolates with vanB-type resistance from two German hospitals in Essen and Nuremberg was conducted.

The isolates were characterized with the well-established microbiological methods multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The results of their genotypic similarity were also compared to collected data from other studies in Germany.

The results obtained by MLST confirmed the previously described allocation of sequence types in Germany. The PFGE divided the isolates from this study into a variety of PFGE types and showed a broad genetic diversity between the two hospitals and also within them.

More epidemiological studies are necessary to track and compare the genotypical spread of vancomycin-resistant enterococci.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Aghdassi, D.m.S.J.S., Behnke, D.r.m.M., Gastmeier, P.D.m.P., Gropmann, S.I.A., Hansen, D.m.S., Diaz, M.S.L.A.P., Piening, D.m.B., Rosenbusch, B.S.M.-L., Schröder, B.S.C., and Schwab, D.r.m.F. (2017). Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016 Abschlussbericht. Nationales Referenzzentrum für die Surveillance von Nosokomialen Infektionen.
2. Arias, C.A., and Murray, B.E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10, 266-278.
3. Arthur, M., and Courvalin, P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1563-1571.
4. Arthur, M., Depardieu, F., Cabanie', L., Reynolds, P., and Courvalin, P. (1998). Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol Microbiol* 30, 819–830.
5. Arthur, M., Depardieu, F., Molinas, C., Reynolds, P., and Courvalin, P. (1995). The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* 154, 87-92.
6. Arthur, M., Molinas, C., and Courvalin, P. (1992). The vanS-vanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 174, 2582-2591.
7. Arthur, M., Reynolds, P., and Courvalin, P. (1996). Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 4, 401-407.
8. Balzereit-Scheuerlein, F., and Stephan, R. (2001). Prevalence of colonisation and resistance patterns of vancomycin-resistant enterococci in healthy, non-hospitalised persons in Switzerland. *Swiss Med Wkly* 131, 280-282.
9. Behnke, M., Gastmeier, P., Geffers, C., Gropmann, A., Hansen, S., Leistner, R., Meyer, E., Diaz, L.A.P., Piening, B., and Sohr, D. (2013). Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2011 Abschlussbericht. Nationales Referenzzentrum für die Surveillance von Nosokomialen Infektionen.
10. Bender, J.K., Kalmbach, A., Fleige, C., Klare, I., Fuchs, S., and Werner, G. (2016). Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep* 6, 21847.

11. Bonten, M.J., Willems, R., and Weinstein, R.A. (2001). Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* *1*, 314-325.
12. Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Thiolet, J.M., Maugat, S., Coignard, B., Leclercq, R., and Cattoir, V. (2011a). Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother* *66*, 713-721.
13. Bourdon, N., Lemire, A., Fines-Guyon, M., Auzou, M., Perichon, B., Courvalin, P., Cattoir, V., and Leclercq, R. (2011b). Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Methods* *84*, 74-80.
14. Brandt, C., Kramer, A., Krenz-Weinreich, A., Tacconelli, E., Baum, H.v., Wendt, C., Werner, G., Arvand, M., Feuerhahn, E., and Brunke, M. (2018). Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen - Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt* *61*, 1310-1361.
15. Bugg, T.D.H., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C.T. (1991). Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochem* *30*, 10408-10415.
16. Chen, W.-S., Chang, H.-Y., Chang, J.-T., Liu, J.M., Li, C.-P., Chen, L.-L., Chang, H.-L., Chen, C.-C., and Huang, T.-S. (2005). Novel rapid tissue lysis method to evaluate cancer proteins: Correlation between elevated Bcl-XL expression and colorectal cancer cell proliferation. *World J Gastroenterol* *11*, 5162-5168.
17. Courvalin, P. (2005). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* *42*, 25-34.
18. Dahl, K.H., Simonsen, G.S., Olsvik, Ø., and Sundsfjord, A. (1999). Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* *43*, 1105-1110.
19. de Been, M., Pinholt, M., Top, J., Bletz, S., Mellmann, A., van Schaik, W., Brouwer, E., Rogers, M., Kraat, Y., Bonten, M., Corander, J., Westh, H., Harmsen, D., and Willems, R. J. (2015). Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* *53*, 3788-3797.

20. de Been, M., van Schaik, W., Cheng, L., Corander, J., and Willems, R.J. (2013). Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. *Genome Biol Evol* 5, 1524-1535.
21. Dutka-Malen, S., Evers, S., and Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33, 24–27.
22. ECDC (2018). European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC.
23. Endtz, H.P., van den Braak, N., van Belkum, A., Kluytmans, J.A., Koeleman, J.G., Spanjaard, L., Voss, A., Weersink, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Buiting, A.G., van Duin, A., and Verbrugh, H. A. (1997). Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 35, 3026-3031.
24. Evers, S., and Courvalin, P. (1996). Regulation of vanB-type vancomycin resistance gene expression by the vanSB-VanRB two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 178, 1302–1309.
25. Evers, S., Reynolds, P.E., and Courvalin, P. (1994). Sequence of the vanB and ddl genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* 140, 97-102.
26. Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., and Spratt, B.G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186, 1518-1530.
27. Francisco, A.P., Bugalho, M., Ramirez, M., and Carrico, J.A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10, 152.
28. Frickmann, H., Koller, K., Veil, I., Weise, M., Ludyga, A., Schwarz, N.G., Warnke, P., and Podbielski, A. (2017). On the role of enterococci in the bloodstream: results of a single-center, retrospective, observational study at a German university hospital. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 7, 284-295.
29. Gambarotto, K., Ploy, M.C., Turlure, P., Grelaud, C., Martin, C., Bordessoule, D., and Denis, F. (2000). Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* 38, 620-624.

30. Herschleb, J., Ananiev, G., and Schwartz, D.C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2, 677-684.
31. Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J.D.A., and Willems, R.J.L. (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 40, 1963-1971.
32. Jordens, J.Z., Bates, J., and Griffiths, D.T. (1994). Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 34, 515-528.
33. Kaarme, J., Hasan, B., Rashid, M., and Olsen, B. (2015). Zero prevalence of vancomycin-resistant enterococci among Swedish preschool children. *Microb Drug Resist* 21, 65-68.
34. Klare, I., Bender, J., Koppe, U., Sin, M.A., Eckmanns, T., and Werner, G. (2017). Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland - Update 2015/2016. *Epid Bull* 46, 519-527.
35. Klare, I., Heier, H., Claus, H., Böhme, G., Marin, S., Seltmann, G., Hakenbeck, R., Antanassova, V., and Witte, W. (1995). *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* 1, 265-272.
36. Klare, I., Rodloff, A.C., Wagner, J., Witte, W., and Hakenbeck, R. (1992). Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 783-787.
37. Klare, I., Witte, W., Wendt, C., and Werner, G. (2012). Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). *Bundesgesundheitsblatt* 55, 1387-1400.
38. Kolar, M., Cekanova, L., Vagnerova, I., Kesselova, M., Sauer, P., Koukalova, D., and Hejnar, P. (2004). Molecular-biological analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from a community in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 148, 167-169.
39. Kolar, M., Pantucek, R., Vagnerova, I., Sauer, P., Kesselova, M., Cekanova, L., Koukalova, D., Doskar, J., and Ruzickova, V. (2006). Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Czech Republic. *New Microbiol* 29, 121-125.

40. Kramer, A., Schwebke, I., and Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6, 130.
41. Kramer, T.S., Remschmidt, C., Werner, S., Behnke, M., Schwab, F., Werner, G., Gastmeier, P., and Leistner, R. (2018). The importance of adjusting for enterococcus species when assessing the burden of vancomycin resistance: a cohort study including over 1000 cases of enterococcal bloodstream infections. *Antimicrob Resist Infect Control* 7, 133.
42. Kristich, C.J., Rice, L.B., and Arias, C.A. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance, C.D. Gilmore MS, Ike Y, et al., editors, ed. (Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]: Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).
43. Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., and Willems, R.J.L. (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 186, 672-682.
44. Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., and Courvalin, P. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 319, 157-161.
45. Lee, T., Pang, S., Abraham, S., and Coombs, G.W. (2019). Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist* 16, 36-47.
46. Linden, P.K. (2007). Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Respir Crit Care Med* 28, 632-645.
47. Lytsy, B., Engstrand, L., Gustafsson, A., and Kaden, R. (2017). Time to review the gold standard for genotyping vancomycin-resistant enterococci in epidemiology: comparing whole-genome sequencing with PFGE and MLST in three suspected outbreaks in Sweden during 2013-2015. *Infect Genet Evol* 54, 74-80.
48. Miller, W.R., Munita, J.M., and Arias, C.A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12, 1221-1236.
49. Miranda, A.G., Singh, K.V., and Murray, B.E. (1991). DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol* 29, 2752-2757.

50. Moellering, R.C., Jr., and Weinberg, A.N. (1971). Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of <sup>14</sup>C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest* 50, 2580-2584.
51. Morrison, D., Woodford, N., Barrett, S.P., Sisson, P., and Cookson, B.D. (1999). DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol* 37, 1084–1091.
52. Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 3, 46-65.
53. Nimagen. ExS-Pure™ PCR cleanup brochure. *www.nimagen.com*. Retrieved 24.04.2019
54. NimaGen (2012). Ex'S-Pure™ PCR cleanup bulletin. NimaGen brochure.
55. O'Driscoll, T., and Crank, C.W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 8, 217-230.
56. Pallares, R., Pujol, M., Peña, C., Ariza, J., Martin, R., and Gudiol, F. (1993). Cephalosporins as Risk Factor for Nosocomial *Enterococcus faecalis* Bacteremia: A Matched Case-Control Study. *Archives of Internal Medicine* 153, 1581-1586.
57. Prematunge, C., MacDougall, C., Johnstone, J., Adomako, K., Lam, F., Robertson, J., and Garber, G. (2016). VRE and VSE bacteremia outcomes in the era of effective VRE therapy: a systematic review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37, 26-35.
58. Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G.m., and mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol* 37, 1-15.
59. Raven, K.E., Gouliouris, T., Brodrick, H., Coll, F., Brown, N.M., Reynolds, R., Reuter, S., Torok, M.E., Parkhill, J., and Peacock, S.J. (2017). Complex routes of nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmission revealed by genome sequencing. *Clin Infect Dis* 64, 886-893.
60. Remschmidt, C., Schneider, S., Meyer, E., Schroeren-Boersch, B., Gastmeier, P., and Schwab, F. (2017). Surveillance of antibiotic use and resistance in intensive care units (SARI). *Dtsch Arztebl Int* 114, 858-865.

61. Remschmidt, C., Schröder, C., Behnke, M., Gastmeier, P., Geffers, C., and Kramer, T.S. (2018). Continuous increase of vancomycin-resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance *Antimicrob Resist Infect Control* 7, 54.
62. Reynolds, P.E., Depardieu, F., Dutka-Malen, S., Arthur, M., and Courvalin, P. (1994). Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol* 13, 1065-1070.
63. Rice, L.B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 197, 1079-1081.
64. Schagat, T., Koller, S., Leone, P., Cremonesi, P., Bosetti, A., Wieczorek, D., Kephart, D., Mann, R., and Storts, D. (2007). The versatility of the Maxwell® 16 system for genomic DNA extraction. *Promega Notes* 97, 12-14.
65. Schaik, W.v., Top, J., Riley, D.R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J.E., Schapendonk, C.M., Hendrickx, A.P., Nijman, I.J., Bonten, M.J., Tettelin, H., and Willems R.J. (2013). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island *Genome Biol Evol* 11, 239.
66. Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
67. Sivertsen, A., Billstrom, H., Melefors, O., Liljequist, B.O., Wisell, K.T., Ullberg, M., Ozenci, V., Sundsfjord, A., and Hegstad, K. (2014). A multicentre hospital outbreak in Sweden caused by introduction of a vanB2 transposon into a stably maintained pRUM-plasmid in an *Enterococcus faecium* ST192 clone. *PLoS One* 9, e103274.
68. Sparo, M., Delpech, G., and Allende, N.G. (2018). Impact on public health of the spread of high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. *Front Microbiol* 9, 3073.
69. Tacconelli, E., and Magrini, N. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organisation (WHO).
70. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233-2239.

71. Tornieporth, N.G., Roberts, R.B., John, J., Hafner, A., and Riley, L.W. (1996). Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis* 23, 767-772.
72. Trajkovska-Dokic, E., Kaftandzieva, A., Stojkowska, S., Kuzmanovska, A., and Panovski, N. (2015). Gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci in hospitalized and outpatients. *Open access Macedonian journal of medical sciences* 3, 7-11.
73. Walsh, C., Fisher, S., Park, I.-S., Prahalad, M., and Wu, Z. (1996). Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem Biol* 3, 21-28.
74. Wendt, C., Krause, C., Xander, L.U., Loffler, D., and Floss, H. (1999). Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. *J Hosp Infect* 42, 193-200.
75. Werner, G. (2013). Molecular typing of enterococci/VRE. *J Bacteriol Parasitol* 01.
76. Werner, G., Coque, T.M., Hammerum, A.M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K.G., Leclercq, R., Lester, C.H., Lillie M., Novais C., Olsson-Liljequist B., Peixe L.V., Sadowy E., Simonsen G.S., Top J., Vuopio-Varkila J., Witte W., and Woodford N. (2008a). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe *Euro Surveill* 13.
77. Werner, G., Klare, I., Hübner, J., Kern, W.V., and Witte, W. (2008b). Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemother J* 1, 183–193.
78. Wichelhaus, T.A., Schäfer, V., and Brade, V. (2000). Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemother J* 9, 93-98.
79. Willems, R.J., Hanage, W.P., Bessen, D.E., and Feil, E.J. (2011). Population biology of gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35, 872-900.
80. Willems, R.J.L., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheувel, M., Tribe, D., Manziros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Mascini, E.M., van Kregten, E., van Embden, J.D.A., and Bonten M.J.M. (2001). Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycinresistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet* 357, 853-855.

81. Willems, R.J.L., Top, J., Santen, M.v., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F., Grundmann, H., and Bonten, M.J.M. (2005). Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* *11*, 821-828.

82. Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H., and Sun, Z. (2017). Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol Res* *196*, 95-105.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

adk *Adenylat-Kinase*

AFLP *Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus*

ATP *Adenosintriphosphat*

atpA *Adenosintriphosphat-Synthase, alpha Subunit*

BSA *Bovines Serumalbumin*

CC *Clonal Complex*

D,D-Carboxypeptidase *D-Alanin-D-Alanin-Carboxypeptidase*

D,D-Dipeptidase *D-Alanin-D-Alanin*

D-Ala *D-Alanin*

ddl *D-Alanin-D-Alanin*

D-Lac *D-Laktat*

dNTP *Desoxyribonukleosidtriphosphate*

DTT *Dithiothreitol*

*E. faecalis* *Enterococcus faecalis*

*E. faecium* *Enterococcus faecium*

eBURST *Enhanced Based Upon Related Sequence Types*

EDTA *Ethidiumbromid*

ELISA *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

gdh *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*

goeBURST *global optimal enhanced Based Upon Related Sequence Types*

gyd *Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*

HCl *Chlorwasserstoff*

K *Kalium*

LE *low electroendosmosis*

LEV *Low Elution Volume*

LMP *Low-Melting-Point*

Mbp *Megabasenpaare*

Mg *Magnesium*

MLST *Multilocus-Sequenztypisierung*

MLVA *Multiple locus variable number of tandem repeat Analyse*

NaCl *Natriumchlorid*  
NaOH *Natriumhydroxid*  
PCR *Polymerase-Kettenreaktion*  
PeqGreen *peqlab Green*  
PFGE *Pulsfeldgelelektrophorese*  
pH *potentia Hydrogenii*  
PMSF *Phenylmethylsulfonylfluorid*  
pstS *Phosphat-ATP-bindende Kasette Transporter*  
purK *Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, ATPase Subunit*  
RKI *Robert-Koch-Institut*  
RNA *Ribonukleinsäure*  
rpm *rounds per minute*  
ST *Sequenztyp*  
Taq *Thermophilus aquatus*  
TRIS *Trishydroxymethylaminomethan*  
UK *Uniklinik*  
VE-Wasser *vollentsalztes Wasser*  
VRE *Vancomycin-resistente Enterokokken*  
VSE *Vancomycin-sensible Enterokokken*

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Peptidoglykan-Synthese und Wirkweise der Glykopeptid-Antibiotika in Enterokokken. ....	10
<b>Abbildung 2:</b> Glykopeptid-Resistenz vom vanA-Typ. a) Mechanismus der Synthese von Peptidoglykan-Vorläufer-Molekülen bei Enterokokken mit vanA-Resistenz. b) Aufbau des vanA-Operons.....	13
<b>Abbildung 3:</b> Beispiel von PCR-Amplifikaten der Enterokokken-PCR aufgetrennt durch ein 1%iges Agarose-Gel.....	39
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung der Allelunterschiede der verschiedenen Sequenz-Typen (ST) nach goeBURST Analyse (PHYLOViZ). ....	43
<b>Abbildung 5:</b> Dendrogramm der untersuchten 128 E. faecium-Isolate nach Pulsfeldgelelektrophorese mit SmaI-Restriktionsverdau. ....	46

### 9.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien mit Hersteller, dessen Standort und Chargen- Nummer des Produkts. ....	20
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und dessen Standort. ....	24
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Geräte mit Hersteller und dessen Standort. ....	25
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Datenbanken und Softwares mit Internetadresse/ Hersteller und Standort. ....	27
<b>Tabelle 5:</b> Primer für die Enterokokken-PCR. ....	29
<b>Tabelle 6:</b> Master-Mix für die Enterokokken-PCR (Menge für 5 Ansätze). ....	30
<b>Tabelle 7:</b> PCR-Zyklen für die Enterokokken-PCR. ....	30
<b>Tabelle 8:</b> Primer für die MLST-PCR. ....	32
<b>Tabelle 9:</b> Master-Mix für die MLST-PCR (Menge für 4 Ansätze). ....	32
<b>Tabelle 10:</b> PCR-Zyklus für die MLST-PCR. ....	33
<b>Tabelle 11:</b> Einstellungen für die PFGE zur Charakterisierung der Enterokokken- Isolate. ....	37
<b>Tabelle 12:</b> Zusammenfassung der Multilocus-Sequenztypisierungs-Ergebnisse und Verteilung der Sequenz-Typen (ST). ....	41
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht der Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung und der Pulsfeldgelelektrophorese. ....	47

## **9.4 Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter-Michael Rath für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, Erfahrungen in Bezug auf wissenschaftliches Arbeiten und auf dem Gebiet der Mikrobiologie zu sammeln. Auch für die ausgezeichnete Betreuung der Doktorarbeit, die angenehme Zusammenarbeit, fachkundige Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts möchte ich mich bedanken. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jörg Steinmann für die Bereitstellung der Isolate aus Nürnberg.

Weiterhin bedanke ich mich für die Möglichkeit, im Rahmen dieser Arbeit sowohl an einer Posterpräsentation teilnehmen, als auch eine Veröffentlichung als Erstautorin schreiben zu dürfen.

Danken möchte ich auch Herrn Dirk Schmidt, ohne dessen praktische Anleitung, Erfahrung und immerwährende Geduld mit mir der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem bedanke ich mich bei dem tollen Labor-Team Andrea, Gabi, Mariola, Doris und David, die mich so nett bei sich aufgenommen haben.

Ein großer Dank gilt auch meiner Schwester Cindy, die mir mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei Fragen und Problemen immer unterstützt hat.

Auch meiner restlichen Familie Frank, Cornelia und Nico möchte ich danken, da sie immer für mich da sind und ich mich auf sie verlassen kann.

## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.