

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Helge Karch

**Entwicklung und Evaluierung der „Multilocus Variable Number
Tandem Repeat Sequenztypisierung (MLVST)“ zur Typisierung von
*Enterococcus faecium***

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Constien, Christine
aus Burgwedel

2017

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Mellmann

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Helge Karch
- Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Mellmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung und Evaluierung der „Multilocus Variable Number Tandem Repeat Sequenztypisierung (MLVST)“ zur Typisierung von *Enterococcus faecium*
Constien, Christine

Enterokokken zählen weltweit zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Seit 1988 wird das Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) beschrieben, welches v. a. die Spezies *Enterococcus faecium* betrifft. Es existieren vielfältige Typisierungsmethoden, die der Infektionsüberwachung sowie der Klärung infektionsepidemiologischer Fragestellungen dienen. Bei der Typisierung von VRE hat sich vor allem die Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgrund des hohen Diskriminationspotentials durchgesetzt, jedoch ist diese Methode von hohem Aufwand und mangelnder Inter-Laborvergleichbarkeit geprägt. Die auf der partiellen Sequenzierung von sieben Haushaltsgenen basierende Multilocus Sequenztypisierung (MLST) zeichnet sich durch exzellente Reproduzierbarkeit und Datenaustauschbarkeit aus, jedoch fehlt es der MLST bei lokal begrenzten Fragestellungen an Diskriminationsvermögen.

Ein neuer Ansatz zur Typisierung von VRE ist die Multilocus Variable Number Tandem Repeat Sequenztypisierung (MLVST), bei der Sequenzdaten eines "Variable Number Tandem Repeat" (VNTR) mit Sequenzdaten der Haushaltsgene *atpA* und *ddl* aus dem klassischen MLST-Schema verknüpft werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren anhand von 38 klinischen VRE-Isolaten, die größtenteils epidemiologische Zusammenhänge aufwiesen, evaluiert. Weiterhin konnte eine Multiplex-PCR soweit optimiert werden, dass die drei erwünschten Zielsequenzen in einem Ansatz in vergleichbarer Menge amplifiziert und anschließend sequenziert werden konnten. Der Vergleich von MLVST mit der auf einem PCR-Verfahren basierenden Typisierungsmethode DiversiLab® zeigte, dass das Diskriminationspotential von MLVST sowie die Konkordanz zu DiversiLab® nicht ausreichen, um MLVST als Typisierungsverfahren in möglichen Ausbruchsszenarien zu etablieren.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2017

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Entwicklung und Evaluierung der „Multilocus Variable Number Tandem Repeat Sequenztypisierung (MLVST)“ zur Typisierung von *Enterococcus faecium*

im Institut für Hygiene

unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Köln, 01.09.2017

Ort, Datum

Christine Constien

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Typisierungsmethoden für Vancomycin-resistente Enterokokken.....	9
1.2 Variable Number Tandem Repeats (VNTR) und Multilocus VNTR Analyse (MLVA).....	11
1.3 Multilocus-VNTR-Sequenztypisierung (MLVST).....	11
1.4 Zielsetzung	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Herkunft der verwendeten Vancomycin-resistenten <i>E. faecium</i> -Stämme.....	14
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Chemikalien.....	16
2.1.4 Puffer und Lösungen in Eigenherstellung	17
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide.....	18
2.1.6 Software.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Bakterienanzucht	19
2.2.2 DNA-Extraktion mittels InstaGene™ Matrix	19
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	19
2.2.4 Multiplex-PCR	20
2.2.5 Gelelektrophorese.....	20
2.2.6 Produktaufreinigung mit EXOSAP	21
2.2.7 Sequenzierung	21
2.2.8 Rep-PCR.....	22
2.2.9 Datenanalyse.....	22
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Typisierbarkeit der verwendeten VREF-Isolate mittels MLVST und rep-PCR...	25
3.2 Vergleich von MLVST und rep-PCR.....	26
3.3 Korrelation zwischen ST _{MLVST} , FP und Resistenztyp	29
3.4 Korrelation zwischen ST _{MLVST} , FP und Herkunftsstation.....	29
3.5 Etablierung einer Multiplex-PCR.....	30

4. Diskussion	35
4.1 Diskriminationspotential von MLVST und rep-PCR.....	35
4.2 Konkordanz von MLVST zu rep-PCR und anderen Typisierungsverfahren	36
4.3 Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit mittels MLVST und rep-PCR im Vergleich zu anderen Typisierungsverfahren.....	39
4.4 Korrelation zwischen MLVST-Profil und Resistenztyp	41
4.5 Etablierung einer Multiplex-PCR.....	41
4.6 Vorteile und Nachteile der MLVST	42
4.7 Limitationen der Studie	43
4.8 Ausblick: Next Generation Sequencing (NGS).....	44
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis	46
7. Abkürzungen	51
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	52
8.1 Abbildungen	52
8.2 Tabellen	52
9. Danksagungen	53
10. Lebenslauf	54

1. Einleitung

Enterokokken zählen heute weltweit zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen (6,23). Das Infektionsspektrum reicht von postoperativen Wundinfektionen und Endokarditiden bis hin zu lebensgefährlichen Bakteriämien (26). Enterokokken können neben ihren natürlichen Antibiotikaresistenzen weitere Resistenzen erwerben, wobei hier vor allem Glykopeptidresistenz relevant ist (40). 1988 wurde zum ersten Mal das Auftreten Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) dokumentiert (41), die Prävalenz in Europa und den USA ist stark steigend (6,40). Zwischen 1989 und 1993 ist in Krankenhäusern der USA die Inzidenz der Kolonisation der Patienten mit VRE von 0,7 % auf 7,9 % gestiegen (32). Klare *et al.* beschrieben 2003 eine Rate an Glykopeptid-resistenten Enterokokken in europäischen Krankenhäusern zwischen 0,6 % und 5,8 % und in deutschen Krankenhäusern zwischen 2 % und 4 % (23). Das Robert-Koch-Institut beschrieb für die Jahre 2006 und 2007 eine Rate an VRE von 13,3 % bzw. 14,4 % unter allen eingesandten *E. faecium*-Isolaten aus deutschen Krankenhäusern (24). Interessanterweise betrifft Vancomycin-Resistenz vorwiegend die Spezies *E. faecium* und ist bei *E. faecalis* noch selten (45).

Erworbene Resistenz gegen Glykopeptide wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt; in Mitteleuropa spielen vor allem der VanA- und der VanB-Resistenztyp eine Rolle (46). Die Namensgebung erfolgt durch die resistenzvermittelnde Ligase, welche die Zielstruktur der Glykopeptide an Zellwand-Bausteinen der Enterokokken modifiziert und so eine Bindung der Glykopeptide verhindert. Grundsätzlich existiert auch die Gefahr der Übertragung der Vancomycin-Resistenz von Enterokokken auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* mittels horizontalem Gentransfer (27,33). Die Therapie von VRE-Infektionen gestaltet sich wegen einer oftmals gering verbleibenden Anzahl noch wirksamer Antibiotika schwierig. Als Behandlungsalternative bleiben letztlich moderne Reserveantibiotika, mit denen aber hohe Kosten und die Möglichkeit neuer Resistenzbildung verbunden sind (6,19).

1.1 Typisierungsmethoden für Vancomycin-resistente Enterokokken

Zur Klärung infektionsepidemiologischer Fragestellungen ist die genotypische oder phänotypische Typisierung von Bakterien notwendig. Typisierungen dienen der Infektionsüberwachung sowie der Differenzierung zwischen realen Ausbrüchen und

Pseudoausbrüchen, die oft aufgrund zeitgleicher Patientenverlegungen auftreten. Mithilfe der Erregertypisierung können hochpathogene Klone einer Spezies erkannt, Streuquellen identifiziert und die Wirksamkeit von Hygienemaßnahmen evaluiert werden (3,19). Viele Infektionen mit VRE resultieren aus primären nosokomialen Darmbesiedelungen, weshalb ein VRE-Screening mittels geeigneter Typisierungsmethode eine wichtige Maßnahme zur Infektionsprävention sein kann (46). Primärkriterien zur Bewertung von Typisierungsmethoden sind Reproduzierbarkeit, Typisierbarkeit und Diskriminationspotential. Weiterhin beurteilt man Kosteneffektivität, Durchführbarkeit hinsichtlich des zeitlichen und technischen Aufwands, Leichtigkeit der Interpretation und die Möglichkeit einer weitestgehend automatisierten Durchführung (35,37,48).

Für VRE existieren mehrere Typisierungsmethoden. Grundsätzlich werden bei verschiedenen Fragestellungen unterschiedliche Anforderungen an ein Typisierungsverfahren gestellt (35). Zur epidemiologischen Untersuchung lokal begrenzter VRE-Ausbrüche bedarf es einer hoch diskriminatorischen Methode, während für die Untersuchung langfristiger evolutionärer Zusammenhänge eine Typisierungsmethode mit geringerer Diskriminierungsfähigkeit sinnvoll ist (14,46).

Als hoch diskriminatorische Methode zur VRE-Typisierung hat sich vor allem die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) durchgesetzt, die jedoch mit hohem technischen, zeitlichen und personellen Aufwand verbunden ist und deren Ergebnisse laborübergreifend schwer zu vergleichen sind (7,16). Bei der sehr gut reproduzierbaren Methode der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) ist eine standardisierte Interpretation der Ergebnisse exzellent möglich, jedoch eignet sich diese Methode wegen der zu geringen Diskriminierungsfähigkeit weniger für die Untersuchung lokal begrenzter Ausbruchssituationen (38). Ein aktueller Ansatz zur Typisierung von *E. faecalis* ist die Trilocus-Sequenztypisierung (TLST) (7,8). Hierbei handelt es sich um ein gegenüber der MLST vereinfachtes Typisierungsschema, bei dem statt der sieben untersuchten Haushaltsgene nur drei Genloci partiell sequenziert werden: zwei Antigenkodierende Gene sowie ein Antibiotika-Resistenzgen. In zwei Studien zeigte sich gute Kongruenz der TLST im Vergleich zu MLST und PFGE (7,8).

Die „repetitive element sequence-based“-PCR (rep-PCR) ist eine Typisierungsmethode, die auf dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert. Bei der rep-PCR

werden synthetische Oligonukleotide eingesetzt, die an repetitive Elemente binden. Diese Strukturen sind von Stamm zu Stamm variabel auf dem bakteriellen Chromosom vorhanden und liegen zufällig verteilt. Wenn zwei repetitive Elemente nah genug beieinander liegen, kann mithilfe der PCR der dazwischen liegende Bereich amplifiziert werden. Das konsequente Bandenmuster wird zur Differenzierung verwendet. Eine weitestgehend automatisierte Durchführung der rep-PCR steht derzeit mit dem DiversiLab®-System der Firma bioMérieux zur Verfügung (9,16).

1.2 Variable Number Tandem Repeats (VNTR) und Multilocus VNTR Analyse (MLVA)

„Tandem Repeats“ (TR) sind Abschnitte im Genom, in denen vielfache Wiederholungen einer Sequenz von etwa 10 bis 100 Nukleotiden vorkommen. Aufgrund von Punktmutationen innerhalb der Wiederholungseinheiten sowie Veränderungen hinsichtlich der Wiederholungsrate können diese Bereiche eine ausgeprägte Sequenz- und Längenvariation zwischen einzelnen Isolaten zeigen und werden dann als „Variable Number Tandem Repeats“ (VNTR) bezeichnet. VNTRs können zur epidemiologischen Analyse von Mikroorganismen herangezogen werden (22). Bei Typisierungsverfahren ist ausgeprägte Variabilität der untersuchten Bereiche eine wünschenswerte Eigenschaft, um ein hohes Diskriminationspotential erzielen zu können (48). Bei der Multilocus VNTR Analyse (MLVA) werden einzelne VNTRs zunächst gezielt mittels PCR amplifiziert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und anhand ihrer Länge differenziert. Zur Ausbruchsaufklärung ist die MLVA-Analyse in der Regel nicht genügend diskriminatorisch (44).

1.3 Multilocus-VNTR-Sequenztypisierung (MLVST)

Im Rahmen einer Voruntersuchung (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung) wurden mit Hilfe des Programms „Tandem Repeat Finder“ (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) insgesamt 1580 putative VNTR des Referenzstammes *E. faecium* DO identifiziert (Accession number NC_017960.1) und drei dieser VNTR Bereiche anschließend ausgewählt. Auswahlkriterien waren eine Repeatlänge von 15-40 bp, einer Wiederholungsrate von mindestens 5 Repeats sowie die Lage der VNTR im kodierenden Bereich. Diese drei VNTR wurden hinsichtlich ihres Vorkommens sowie ihrer Eigenschaften in einer Stammsammlung von 144 gut charakterisierten Umwelt-

und klinischen Isolaten Vancomycin-resistenter *E. faecium* (Rob Willems, UMC Utrecht) untersucht:

- VNTR0032 (secreted protein A; accession CP003583, Region 2538241-2539776)
- VNTR0047 (LPXTG family cell surface protein Fms22; accession CP003583, Region 1432304-1433593)
- VNTR1398 (collagen-binding MSCRAMM Scm Fms10; accession CP003583, Region 2656348-2658159)

Es zeigte sich bei allen drei VNTR-Regionen sowohl Sequenz- als auch Längenvariabilität unterschiedlich starker Ausprägung, eine Grundvoraussetzung für den Einsatz in einem Typisierungsverfahren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Kombination von VNTR1398 mit den Haushaltsgenen *atpA* (ATP Synthase, alpha-Untereinheit) und *ddl* (D-Alanin:D-Alanin-Ligase) aus dem *E. faecium* MLST-Schema (18) über einen höheren diskriminatorischen Index (*DI*) verfügt als die Kombination der drei analysierten VNTR Regionen. Der *DI* beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei nicht verwandte Stämme innerhalb einer Testpopulation mithilfe einer Typisierungsmethode zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (21). Es wurde jedem Isolat ein MLVST-Sequenztyp (ST_{MLVST}) zugewiesen, das auf einer Allelkombination der Genloci VNTR1398, *atpA* und *ddl* beruht. Jedem neu identifizierten Allel von VNTR1398 bzw. neu identifizierten MLVST-Profilen wurden hierbei fortlaufende Nummern zugewiesen. Ein Vergleich von MLVST, MLST und MLVA ergab jeweils einen *DI* von 0,964, 0,970 beziehungsweise 0,936 sowie eine Konkordanz von MLVST zu MLST von 0,985 und von MLVST zu MLVA von 0,932. Darüber hinaus wurde bei der Untersuchung weiterer 94 epidemiologisch zusammenhängender und nicht-zusammenhängender klinischer Isolate eine hohe Konkordanz von MLVST zu PFGE festgestellt. Insgesamt lässt sich festhalten, dass MLVST eine schnelle und kostengünstigere Alternative zu herkömmlichen Typisierungsmethoden wie MLST und PFGE darstellen könnte.

1.4 Zielsetzung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der ST_{MLVST} von 38 Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten (VREF). Bei 34 der 38 untersuchten Stämme handelt es sich um Bakterienisolate, welche über einen Zeitraum von vier Monaten auf 14 verschiedenen Stationen des Universitätsklinikums Münster (UKM) aus Patientenproben sowie bei Umgebungsuntersuchungen isoliert wurden. Die übrigen vier Bakterienstämme wurden innerhalb eines Zeitraumes von neun Tagen in einem peripheren Akutkrankenhaus aus Patientenproben isoliert.

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich für alle 38 VREF-Isolate ein ST_{MLVST} erstellen lässt, wie viele ST_{MLVST} sich bei den 38 untersuchten VREF-Stämmen insgesamt ergeben bzw. ob sich ein Zusammenhang zwischen ST_{MLVST} und Resistenztyp beobachten lässt. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob die Amplifizierung der drei zu untersuchenden Loci VNTR1398, *ddl* und *atpA* in einem Reaktionsansatz mithilfe einer Multiplex-PCR durchführbar ist, um den Arbeitsaufwand zu verringern. Abschließend sollte zur weiteren Evaluation der MLVST-basierte *DI* sowie die Konkordanz zu rep-PCR-basierten Typisierungsergebnissen mittels DiversiLab® System ermittelt werden, da es sich bei diesem Verfahren ebenfalls um eine schnelle und preiswerte Typisierungsmethode mit hohem Diskriminationspotential handelt (16,17).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herkunft der verwendeten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämme

Vierunddreißig der verwendeten VREF-Isolate wurden der Stammsammlung des Instituts für Hygiene am UKM entnommen. Hierbei handelt es sich um 31 direkte Patientenisolat und drei Oberflächenisolate aus dem Stationsbereich. Vier weitere Patientenisolat stammen aus der Stammsammlung eines peripheren Krankenhauses (Siehe Tabelle 1).

Zur Etablierung einer Multiplex-PCR wurden zusätzlich vier weitere VREF-Stämme mit bekanntem ST_{MLVST} verwendet (Isolate 2565, 2583, 2591, 2676; siehe Kapitel 3.5), die über ein verhältnismäßig langes VNTR1398-Fragment von ca. 1000 bp verfügen.

Tabelle 1: Quelle, Entnahmeort und –zeitpunkt der verwendeten 38 *E. faecium*-Stämme

Stamm	Quelle	Entnahmeort	Entnahmezeitpunkt
4679	Rektalabstrich	Station 1	06.04.2009
4686	Rektalabstrich	Station 1	20.04.2009
4701	Rektalabstrich	Station 1	19.04.2009
4703	Rektalabstrich	Station 1	16.04.2009
4711	Wundabstrich	Station 2	28.04.2009
4712	Analabstrich	Station 2	30.04.2009
4715	Gewebe Hämatom	Station 2	06.05.2009
4732	Analabstrich	Station 3	11.05.2009
4739	Analabstrich	Station 2	11.05.2009
4742	Analabstrich	Station 3	18.05.2009
4743	Analabstrich	Station 3	19.05.2009
4753	Sheldonspitze	Station 3	28.05.2009
4759	Urin	Station 3	02.06.2009
4773	Analabstrich	Station 2	10.06.2009
4795	Sekret	Station 4	22.06.2009
4796	Analabstrich	Station 1	22.06.2009
4797	Analabstrich	Station 1	22.06.2009
4799	Urin	Station 5	29.06.2009

Stamm	Quelle	Entnahmeort	Entnahmezeitpunkt
4800	Analabstrich	Station 6	27.06.2009
4804	Oberflächenträger	Station 7	26.06.2009
4805	Stuhlprobe	Station 6	30.06.2009
4806	Analabstrich	Station 6	30.06.2009
4807	Punktat u.ä.	Station 8	02.07.2009
4808	Abstrich subcutan	Station 9	03.07.2009
4814	Oberflächenträger	Station 10	01.07.2009
4815	Analabstrich	Station 1	07.07.2009
4816	Katheter u.ä.	Station 11	08.07.2009
4817	Stuhl	Station 12	07.07.2009
4824	Katheterspitze	Station 11	11.07.2009
4837	Analabstrich	Station 1	13.07.2009
4851	Analabstrich	Station 1	20.07.2009
4852	Analabstrich	Station 13	22.07.2009
4873	Analabstrich	Station 14	03.08.2009
4874	Oberflächenträger	Station 1	04.08.2009
5014	Urin	peripheres KH	14.11.2009
5015	intraop. Abstrich	peripheres KH	14.11.2009
5016	intraop. Abstrich	peripheres KH	11.11.2009
5017	Perianalabstrich	peripheres KH	05.11.2009

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Adhesive PCR Film	ABgene/Thermo Scientific (Dreieich)
Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn)
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
DiversiLab® <i>Enterococcus</i> Kit	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
Impfeschlingen	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Gelelektropheseckammer DNA Sub Cell®	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Flachgel-Elektrophoresekammer „Mini“	von Keutz Labortechnik (Reiskirchen)
Geldokumentationsanlage Gel Doc™ 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Heizblock	Eppendorf AG (Hamburg)
Kühl- und Gefrierschränke	Philipp Kirsch GmbH (Offenburg)
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA®-Werke GmbH&Co. KG (Staufen)

Microfluidics DNA Chip	Caliper Life Sciences/bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Netzgeräte (Consort E835)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
PCR-Gefäße	ABgene/Thermo Scientific (Dreieich)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems®/Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Sicherheitswerkbank HERAsafe® HS18	Heraeus/Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau)
Speedvac-Konzentrator	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermocycler Typ T1	Biometra GmbH (Göttingen)
Thermofast 96 Detection Plate	ABgene/Thermo Scientific (Dreieich)
Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Waage Scout II	Ohaus/VWR International GmbH (Darmstadt)
Zentrifugen 5415D/Minispin	Eppendorf AG (Hamburg)
2.1.3 Chemikalien	
100 bp DNA-Leiter	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
AmpliTaq® DNA Polymerase	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Columbia Blutagar mit 5 % Schafblut	heipha Dr. Müller GmbH (Eppelheim)
DiversiLab® <i>Enterococcus</i> Kit	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol 96 % DAB, reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethidiumbromid Lösung 10 mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Exonuclease I (<i>E. coli</i> ; 20 U/µl)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

GeneAmp® 10x PCR Puffer I	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Hi-Di™ Formamid	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
LiChrosolv® (LC-MS Grade Wasser)	Merck KGaA (Darmstadt)
InstaGene Matrix	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
REDTaq® ReadyMix™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/μl)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories/Dianova GmbH (Hamburg)

2.1.4 Puffer und Lösungen in Eigenherstellung

DNA-Probenpuffer	45 % Saccharose 100 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 % Bromphenolblau
Ethanol 70 % (v/v)	70 ml Ethanol absolut ad 100 ml H ₂ O dest.
3 M Natriumacetat (pH 4,8)	60 ml 5 M NaAc ca. 40 ml Essigsäure pH-Wert mit Essigsäure einstellen ad 100 ml H ₂ O dest.
5x Sequenzierungspuffer	40 ml 1 M Tris-HCl (pH 9,0) 1 ml 1 M MgCl ₂ ad 100 ml H ₂ O dest.
10x TBE-Puffer (pH 8,3)	1 M Tris-Borat 20 mM EDTA
TE-Puffer	0,5 M Tris-HCl 0,5 M EDTA

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen. Das Oligonukleotidpaar atpA1n/atpA2n wurde ausschließlich zur Etablierung einer Multiplex-PCR verwendet (s. Kapitel 3.5).

Tabelle 2. Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Produktgröße	Annealingtemperatur
Efm_TR1398f	TGTTTCATTGTCATTGCTTG	391-1018 bp	59 °C
Efm_TR1398r	TCCTTGCGCCTAATGCTACT		
atpA1 ^a	CGGTTCATACGGAATGGCACA	649 bp	50 °C
atpA2 ^a	AAGTTCACGATAAGCCACGG		
atpA1n ^b	TTCAAATGGCTCATACGG	654 bp	50 °C
atpA2n ^b	AGTTCACGATAAGCAACAGC		
ddl1 ^a	GAGACATTGAATATGCCTTATG	560 bp	50 °C
ddl2 ^a	AAAAAGAAATCGCACCG		

^a synthetische Oligonukleotide entstammen dem *E. faecium* MLST-Schema von Homann *et al.* (18)

^b synthetische Oligonukleotide entstammen der MLST.net-Homepage (1)

2.1.6 Software

BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5	Ibis Biosciences, Carlsbad (Kalifornien)
DiversiLab®Software	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
NCBI Blast	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
QuantityOne 1-D-Analysis	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Ridom TraceEditPro 1.2.1	Ridom GmbH (Münster)
Ridom EpiCompare	Ridom GmbH (Münster)

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht

Die verwendeten Bakterienstämme wurden per Dreiösenausstrich auf Blutagarplatten aufgebracht. Die Blutagarplatten wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Hierdurch wurden Einzelkolonien erzeugt, aus denen DNA isoliert wurde.

2.2.2 DNA-Extraktion mittels InstaGene™ Matrix

Für die DNA-Extraktion wurde eine 5 %ige InstaGene™ Matrix-Lösung in Aqua dest. verwendet.

Circa drei Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Impföse von der Blutkulturplatte entnommen, in Aqua dest. eingerührt und anschließend für eine Min. bei 13400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl InstaGene™ Matrix-Lösung resuspendiert und für 20 Min. bei 56 °C inkubiert. Die Suspension wurde gemischt, für acht Min. auf 100 °C erhitzt und bei 13400 g für drei Min. zentrifugiert. Es wurden 2 µl des Überstandes, der die DNA enthält, für die PCR verwendet.

Die DNA-Extrakte wurden bei 2-8 °C gelagert, wenn die Weiterverwendung in den nächsten Stunden bzw. Tagen erfolgte. Für eine längere Aufbewahrung wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung der Gene *atpA* und *ddl* sowie der Region VNTR1398 wurde das PCR-Verfahren angewandt. Hierbei werden die gewünschten Abschnitte der DNA mithilfe einer thermostabilen Polymerase in mehreren Phasen exponentiell vervielfältigt.

Für eine Reaktion wurden 2 µl DNA-Extrakt, 10 µl RedTaq® Ready Mix™ (3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 100 mM KCl; 0,4 mM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP); 0,06 U/µl Taq-DNA-Polymerase), 4 µl LiChrosolv® und je 2 µl der entsprechenden Oligonukleotide (5 pmol/µl; Tabelle 2) vermischt. Nach dreiminütiger Phase der initialen Denaturierung bei 95 °C wurden nach folgendem Programm 30 PCR-Zyklen durchgeführt:

- Denaturierung bei 95 °C für 45 Sek.
- Annealing für 45 Sek. (Temperatur Oligonukleotid-spezifisch; siehe Tabelle 2)
- Elongation bei 72 °C für 90 Sek.

Beendet wurde die PCR mit einem finalen Elongationsschritt von 3 Min. bei 72 °C.

2.2.4 Multiplex-PCR

Das Ziel einer Multiplex-PCR ist, in einem Reaktionsansatz gleichzeitig mehrere DNA-Abschnitte zu amplifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollten die drei DNA-Abschnitte *atpA*, *ddl* und VNTR1398 untersucht werden, dementsprechend wurden in der Multiplex-PCR drei synthetische Oligonukleotidpaare eingesetzt.

Für einen Multiplex-PCR-Ansatz mit insgesamt 20 µl Reaktionsvolumen wurden 2 µl DNA-Extrakt, 10 µl RedTaq® Ready Mix™ (3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 100 mM KCl; 0,4 mM dNTP; 0,06 U/µl Taq-DNA-Polymerase), 2 µl LiChrosolv®, 1 µl Primer Efm_TR1398f (15 pmol/µl), 1 µl Primer Efm_TR1398r (15 pmol/µl), 1 µl Primer *ddl1* (10 pmol/µl), 1 µl Primer *ddl2* (10 pmol/µl), 1 µl Primer *atpAn1* (10 pmol/µl) und 1 µl Primer *atpAn2* (10 pmol/µl) pipettiert. Eine Erläuterung zur Verwendung der Primerpaare *atpA1/2* und *atpA1n/2n* folgt in Kapitel 4.5.

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nach dreiminütiger Phase der initialen Denaturierung bei 95 °C wurden nach folgendem Programm 35 PCR-Zyklen durchgeführt:

- Denaturierung bei 95 °C für 45 Sek.
- Annealing bei 50 °C für 45 Sek.
- Elongation bei 72 °C für 90 Sek.

Beendet wurde die PCR mit einem finalen Elongationsschritt von 3 Min. bei 72 °C.

2.2.5 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der mittels PCR gewonnenen DNA-Produkte wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden die Taschen eines 1%igen Agarosegels mit 6 µl PCR-Produkt beladen. Als Molekulargewichtsstandard wurde 4 µl 100 bp DNA Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von konstant

110 Volt durchgeführt und bei einer Laufstrecke von etwa drei Vierteln des Gels beendet. Das Gel wurde für zwanzig Minuten in einem 1%igen Ethidiumbromidbad gefärbt und nach 20-minütigem Waschen in Aqua dest. unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

2.2.6 Produktaufreinigung mit EXOSAP

Zum enzymatischen Abbau überschüssiger Primer und nicht gebundener dNTP wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/µl) und 1 µl Exonuclease I (1 U/µl) versetzt. Nach Inkubation für 60 Min. bei 37 °C wurden die Enzyme bei 80 °C für 20 Min. hitzeinaktiviert. Das so aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend bei der unter 3.7 beschriebenen Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach einer modifizierten Version der von Sanger *et al.* beschriebenen Didesoxymethode (31) durchgeführt. Dabei wurden zwei vereinfachte PCR-Ansätze, die jeweils nur ein synthetisches Oligonukleotid enthielten, mit Fluoreszenz-markierten 2'-3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP) versetzt. Die ddNTP wurden zufällig in die entstehenden Oligonukleotidketten integriert und induzierten einen Kettenabbruch. Die so entstandenen, unterschiedlich langen Produkte wurden nachfolgend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend ihrer Markierung detektiert. Pro Sequenzierungs-PCR wurden separate Ansätze aus 1,8 µl 5x Sequenzierungspuffer, 3,7 µl LiChrosolv®, 2 µl EXOSAP-behandeltem PCR-Produkt und 0,5 µl Ready Reaction Mix des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit mit jeweils 2 µl Primer forward (5 pmol/µl) bzw. 2 µl Primer reverse (5 pmol/µl) versetzt. Es wurden dieselben synthetischen Oligonukleotide wie bei der DNA-Amplifikation verwendet (Tabelle 2). Die lineare Amplifikation der Fragmente erfolgte nach folgendem Programm für 25 Zyklen:

- Denaturierung bei 95 °C für 10 Sek.
- Annealing für 5 Sek. (Temperatur Oligonukleotid-spezifisch; Tabelle 2)
- Elongation für 4 Min. bei 60 °C

Beendet wurde die Sequenzierungs-PCR mit einem finalen Elongationsschritt bei 60 °C für 4 Min.

Um Salze und fluoreszierende Stoffe zu entfernen, die die Signaldetektion während der Kapillarelektrophorese stören, wurden die Sequenzierungsprodukte anschließend mittels Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu wurde der vollständige Ansatz mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4,6) und 2 Vol. 96 % Ethanol vermischt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 30 Min. lichtgeschützt inkubiert und für 20 Min. bei 16100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort abpipettiert, das Pellet mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 16100 g für 7 Min. zentrifugiert und abschließend bei 45 °C für 5 Min. in der Speedvac getrocknet. Nach Hinzufügen von 20 µl Formamid wurden die Proben im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®/Life Technologies GmbH, Darmstadt) aufgetrennt.

2.2.8 Rep-PCR

Für die rep-PCR-Untersuchung der 38 VREF-Stämme wurde das DiversiLab®-System der Firma bioMérieux (Nürtingen) verwendet. Alle nun folgenden Untersuchungsschritte wurden nach dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll durchgeführt.

Die für die rep-PCR benötigte DNA wurde aus mehreren Einzelkolonien mithilfe des UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit isoliert. Für die Durchführung der rep-PCR wurde der DiversiLab®*Enterococcus* Kit, GeneAmp® 10x PCR Puffer I sowie AmpliTaq® DNA Polymerase verwendet.

Die Produkte der rep-PCR wurden nach dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese mithilfe eines microfluidics DNA LabChip® im Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer aufgetrennt. Die hierbei detektierten Daten wurden mithilfe der DiversiLab®Software v.r3_4_40 analysiert.

2.2.9 Datenanalyse

Die Sequenzen der Gene *atpA* und *ddl* sowie der Region VNTR1398 wurden mit der Software Ridom TraceEditPro 1.2.1 (Ridom GmbH, Münster) analysiert, so dass für jeden der 38 untersuchten Stämme die Allele der drei Genloci ermittelt werden konnten. Jeder Kombination aus VNTR1398-, *atpA*- und *ddl*-spezifischen Allelen wurde anschließend ein ST_{MLVST} zugewiesen. Hierzu wurde die Nomenklatur für VNTR1398

und der konsekutiven ST_{MLVST} aus der Voruntersuchung (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung) übernommen, bei der neu identifizierten Allelen von VNTR1398 bzw. neu identifizierten MLVST-Profilen fortlaufende Nummern zugewiesen wurden.

Aus den mittels rep-PCR gewonnenen Daten wurden mithilfe der DiversiLab®-Software v.r3_4_40 virtuelle DNA-Fingerprints generiert und bezüglich Intensität und Bandenlokalisierung miteinander verglichen. Auf Basis der Pearson-Korrelation und der Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) wurde ein Dendrogramm erstellt (17,34). Um die Ergebnisse der rep-PCR-Untersuchung mit denen der MLVST-Analyse vergleichen zu können, wurden die Bakterienstämme anhand der Morphologie ihrer Fingerprints in Cluster sortiert. Bei über 95 % Übereinstimmung ihrer Fingerprints wurden die Bakterienstämme dem gleichen Fingerprint-Cluster zugeordnet (Definition der DiversiLab®-Software v.r_3_4_40).

Der DI von MLVST und rep-PCR wurde mithilfe von Ridom EpiCompare v1.0 (Ridom GmbH, Münster) nach dem Simpson's Index of Diversity ermittelt (21). Er beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei nicht verwandte Stämme innerhalb einer Testpopulation mithilfe einer Typisierungsmethode zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (21). Zur Ermittlung der Konkordanz von MLVST und DiversiLab® wurde der Adjusted Rand Index sowie der Wallace Koeffizient mithilfe von Ridom EpiCompare ermittelt (5,20). Der Adjusted Rand Index gibt das Verhältnis der kongruenten Paarungen zu allen möglichen Isolat-Paarungen an. Kongruente Paarung bedeutet, dass entweder zwei Isolate bei beiden Methoden paarig gruppieren oder zwei Isolate bei beiden Methoden unpaarig gruppieren. Im Vergleich zum Rand Index ist beim Adjusted Rad Index zusätzlich ein Korrekturfaktor einberechnet für die Möglichkeit, dass sich Gruppen, die durch Zufall gebildet wurden und ohne gemeinsame Eigenschaften sind, in zwei unterschiedlichen Fällen unterschiedlich gruppieren könnten und der Rand Index somit null sein könnte (5). Der Adjusted Rand Index ist richtungslos, das heißt, es ist nicht von Bedeutung, welche der zwei Typisierungsmethoden als Referenz angesehen wird und welche mit ihr verglichen wird. Anders ist dies bei der Verwendung des Wallace-Koeffizienten. Hier ist entscheidend, welche Typisierungsmethode als Referenz gesehen wird (5). Der Wallace-Koeffizient $W_{repPCR-MLVST}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Paar

bei gleichem FP dem gleichen ST_{MLVST} angehört. Wallace-Koeffizient $W_{MLVST-repPCR}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Paar bei gleichem ST_{MLVST} dem gleichen FP angehört.

3. Ergebnisse

3.1 Typisierbarkeit der verwendeten VREF-Isolate mittels MLVST und rep-PCR

Es konnten bei jedem der 38 untersuchten VREF-Stämme VNTR1398-, *atpA*- und *ddl*-spezifische PCR-Fragmente nachgewiesen und sequenziert werden, wodurch in allen Fällen ein charakteristischer ST_{MLVST} ermittelt wurde (Tabelle 3). Die Typisierbarkeit mittels MLVST lag damit bei 100 %.

Darüber hinaus ließen sich für alle untersuchten Isolate mittels rep-PCR spezifische Fingerprints erzeugen; somit erzielte diese Methode ebenfalls eine Typisierbarkeit von 100 %.

Tabelle 3: VNTR1398-, *atpA*- und *ddl*-spezifische Allele, konsekutive ST_{MLVST}, FP, Resistenztyp sowie Herkunft und Entnahmezeitpunkt der untersuchten VREF-Stämme

Stamm	VNTR1398	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	ST _{MLVST}	FP	Resistenztyp ^a
4679	34	15	1	79	10	VanA
4686	7	9	1	43	9	VanA
4701	7	9	1	43	9	VanA
4703	2	9	1	23	9	VanA
4711	2	15	1	25	11	VanB
4712	2	15	1	25	1	VanB
4715	7	9	1	43	6	VanA
4732	34	15	1	79	10	VanA
4739	2	15	1	25	12	VanB
4742	34	15	1	79	10	VanA
4743	7	9	1	43	9	VanA
4753	2	15	1	25	10	VanB
4759	2	15	1	25	10	VanB
4773	34	1	1	77	1	VanA
4795	2	15	1	25	10	VanB
4796	7	9	2	44	9	VanA
4797	7	9	1	43	9	VanA
4799	2	15	1	25	13	VanB
4800	7	9	1	43	15	VanA
4804	2	15	1	25	13	VanB
4805	2	15	1	25	13	VanB

Stamm	VNTR1398	atpA	ddl	ST _{MLVST}	FP	Resistenztyp ^a
4806	35	7	3	80	14	VanA
4807	2	15	1	25	13	VanB
4808	2	15	1	25	8	VanB
4814	7	9	1	43	15	VanA
4815	35	7	3	80	4	VanA
4816	7	9	1	43	7	VanA
4817	2	9	1	23	7	VanA
4824	7	9	1	43	7	VanA
4837	34	1	1	77	3	VanA
4851	7	9	48	45	7	VanA
4852	34	15	1	79	3	VanA
4873	2	15	3	26	5	VanA
4874	7	9	2	44	9	VanA
5014	2	15	1	25	8	VanB
5015	2	15	1	25	8	VanB
5016	2	15	1	25	8	VanB
5017	2	1	1	15	2	VanB

^a Der Resistenztyp wurde im Rahmen der Routinediagnostik mittels Multiplex-PCR und reverser Hybridisierung bestimmt.

3.2 Vergleich von MLVST und rep-PCR

Unter den 38 untersuchten VREF-Stämmen wurden für VNTR1398 vier verschiedene Allele unterschiedlicher Länge nachgewiesen (Tabelle 3): Allel 2 (850 bp), Allel 7 (793 bp), Allel 34 (855 bp) und Allel 35 (733 bp). Für die Gene *atpA* und *ddl* wurden ebenfalls je vier verschiedene Allele ermittelt, darunter für Stamm 4851 ein neues *ddl*-spezifisches Allel (Allel 48; Tabelle 3). Damit ergaben sich für die untersuchten Stämme insgesamt zehn verschiedene ST_{MLVST}, denen 15 FP gegenüberstanden. ST_{MLVST} 25, welcher bei 14 Isolaten (36,84 %) nachgewiesen wurde, war am häufigsten. Im Gegensatz dazu umfasste das größte mittels rep-PCR identifizierte FP 9 lediglich 7 Stämme (18,42 %). Keines der untersuchten Isolate konnte dabei gleichzeitig ST_{MLVST} 25 und FP 9 zugeordnet werden.

Drei der ST_{MLVST} (15, 26 und 45) umfassten jeweils nur einen Stamm, während dies für acht FP (2, 4, 5, 6, 11, 12, 14) der Fall war. Bei diesen so genannten Singletons konnten zwei Übereinstimmungen identifiziert werden: ST_{MLVST} 15 und FP 2 sowie ST_{MLVST} 26 und FP 5.

Isolate, die den häufigsten ST_{MLVST} 25 und 43 angehörten, gruppieren in sechs bzw. vier unterschiedliche FP (FP 1, 8, 10, 11, 12 und 13 bzw. FP 6, 7, 9 und 15). Seltene Sequenztypen wie ST_{MLVST} 23, 77, 79 und 80 gliederten sich dagegen jeweils auf zwei FP auf, während ST_{MLVST} 44 mit FP 9 lediglich einem FP-Cluster zugeordnet werden konnte. Analog teilten sich FP 1, 3, 7, 9 und 10 jeweils auf zwei bis drei verschiedene ST_{MLVST} auf, während FP 8, 13 und 15 mit je einem ST_{MLVST} clusterten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Isolate nicht übereinstimmend gruppieren bzw. die Ergebnisse beider Typisierungsverfahren nicht analog sind.

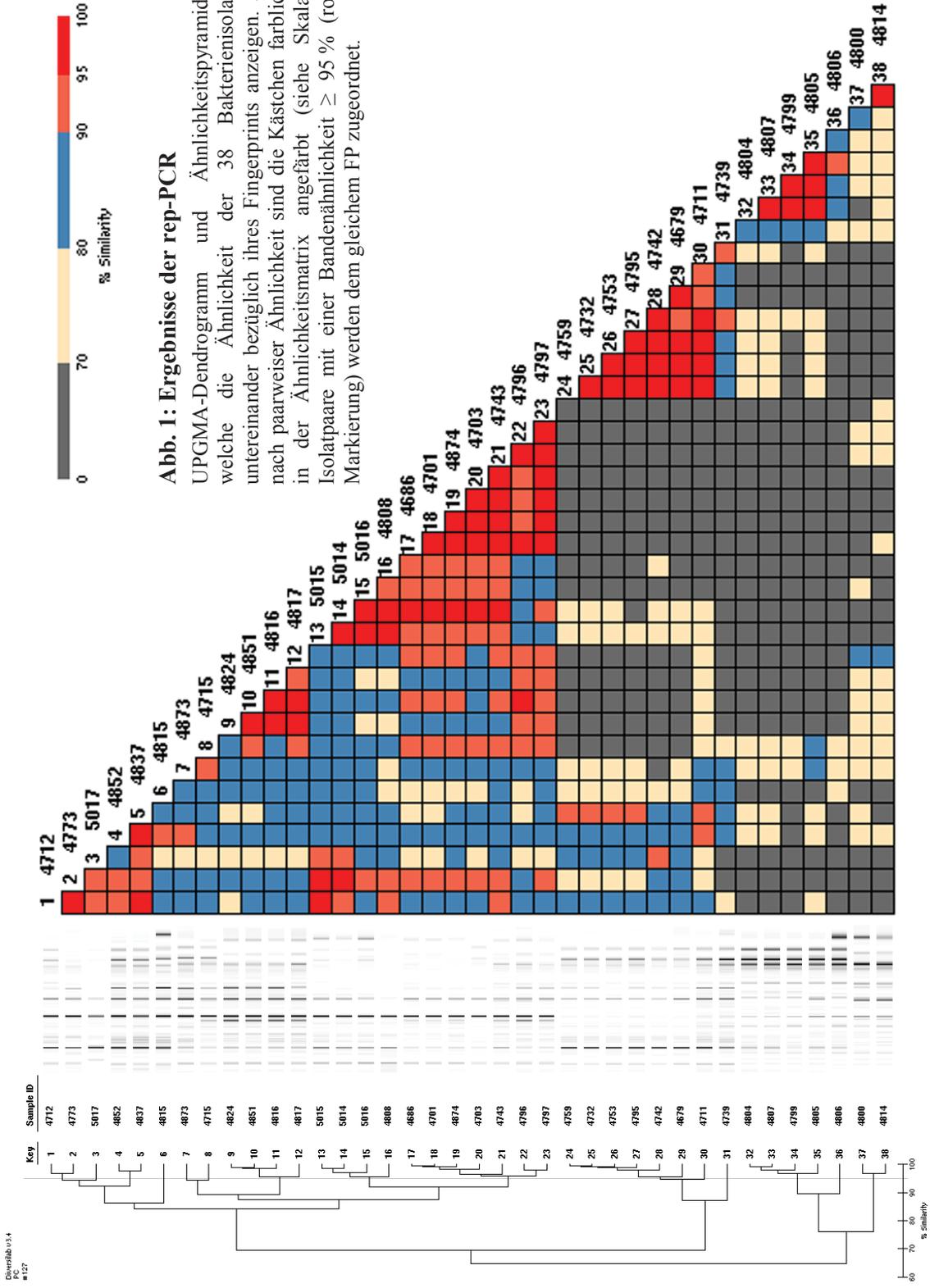


Abb. 1: Ergebnisse der rep-PCR
 UPGMA-Dendrogramm und Ähnlichkeitspyramide, welche die Ähnlichkeit der 38 Bakterienisolate untereinander bezüglich ihres Fingerprints anzeigen. Je nach paarweiser Ähnlichkeit sind die Kästchen farblich in der Ähnlichkeitsmatrix angefärbt (siehe Skala). Isolatpaare mit einer Bandenähnlichkeit $\geq 95\%$ (rote Markierung) werden dem gleichem FP zugeordnet.

Zur Untersuchung der Diskriminationsfähigkeit beider verwendeter Methoden wurde der *DI* berechnet. Er betrug für die MLVST-Untersuchung 0,805 (95 %-Konfidenzintervall 0.717-0.893) und für die rep-PCR-Untersuchung 0,919 (95 %-Konfidenzintervall 0.882-0.955).

Zur Untersuchung der Konkordanz beider Typisierungsmethoden wurden der Wallace-Koeffizient sowie der Adjusted Rand Index (ARI) berechnet (5,20). $W_{\text{repPCR-MLVST}}$ liegt bei 0,474, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Paar bei gleichem FP dem gleichen ST_{MLVST} angehört, liegt somit bei 47,4 %. $W_{\text{MLVST-repPCR}}$ liegt bei 0,197, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Paar bei gleichem ST_{MLVST} dem gleichen FP angehört, liegt somit bei 19,7 %. Der ARI beträgt 0,185. Das bedeutet, dass in 18,5 % der Fälle für MLVST und rep-PCR kongruente Paarungen vorliegen, also entweder zwei Isolate bei beiden Methoden paarig gruppieren oder zwei Isolate bei beiden Methoden unpaarig gruppieren

3.3 Korrelation zwischen ST_{MLVST} , FP und Resistenztyp

Unter den 38 untersuchten VREF-Isolaten waren 15 Isolate vom Resistenztyp VanB und 23 Isolate vom Resistenztyp VanA (Tabelle 3).

Innerhalb eines ST_{MLVST} wurde für alle Bakterienstämme immer der gleiche Resistenztyp identifiziert. Dies trifft auch bis auf zwei Ausnahmen bei FP 1 und 10 innerhalb der FP zu. Umgekehrt traten jedoch sowohl bei Resistenztyp VanA als auch VanB unterschiedliche ST_{MLVST} und FP auf.

3.4 Korrelation zwischen ST_{MLVST} , FP und Herkunftsstation

Innerhalb einer Station trat bis zu dreimal derselbe ST_{MLVST} auf (Station 1: ST_{MLVST} 43, Station 2: ST_{MLVST} 25). Weitere vier ST_{MLVST} tauchten je Station doppelt auf (ST_{MLVST} 44, 79, 25 und 43 auf den Stationen 1, 3 und 11).

Innerhalb einer Station wurde bis zu sechsmal dasselbe FP bestimmt (Station 1: FP 9). Weitere Häufungen traten auf Station 3 (viermal FP 10) sowie Station 2 und Station 11 auf (jeweils zweimal FP 1 und FP 7).

Daten bezüglich der Zimmerlokalisierung bzw. dem behandelnden Pflegepersonal zur weiteren Ausbruchsdifferenzierung lagen nicht vor.

Für die Bakterien, die dem peripheren Akutkrankenhaus entstammten, gab es keine Informationen bezüglich der Herkunftsstationen.

3.5 Etablierung einer Multiplex-PCR

Als Templates für die Entwicklung eines Multiplex-PCR-Protokolls für die parallele Amplifizierung VNTR1398-, *atpA*- und *ddl*-spezifischer Genfragmente wurden hierzu DNAs stichprobenartig ausgewählter Stämme der Stammsammlung verwendet, welche im Vorhinein bereits sequenziert wurden und diverse ST_{MLVST} vertraten (Stämme 4686, 4701, 4715, 4739, 4759, 4796; Tabelle 3). Darüber hinaus wurde auch die DNA von VREF-Stämmen eingesetzt, welche in Voruntersuchungen ein VNTR1398-Fragment von 994 bp Länge oder größer aufwiesen (Stämme 2564, 2583, 2591, 2676; Tabelle 4). Hierbei sollte getestet werden, ob die Multiplex-PCR auch bei VREF-Stämmen mit langen VNTR1398-Fragmenten anwendbar ist.

Zunächst wurden die drei zu verwendenden Oligonukleotidpaare separat unter gleichen PCR-Bedingungen getestet (d. h. initiale Denaturierung für 3 Min. bei 95 °C, anschließend 30 Zyklen mit 45 Sek. bei 95 °C, 45 Sek. bei 50 °C, 90 Sek. bei 72 °C und finale Elongation für 3 Min. bei 72 °C). Obwohl dies für das Oligonukleotidpaar Efm_TR1398f/Efm_TR1398r eine Verringerung der optimalen Annealingtemperatur um 9 °C bedeutete, war eine gleichbleibende Sensitivität und Spezifität zu beobachten, da die entsprechende Zielsequenz wie auch die *atpA*- und *ddl*-spezifischen Fragmente in ausreichender Menge und Reinheit amplifiziert wurden.

Anschließend wurden alle drei Oligonukleotidpaare gemeinsam in einer Multiplex-PCR getestet. Hierbei wurden zunächst Kombinationen aus verschiedenen absoluten Mengen der Oligonukleotide von 5 pmol bis 15 pmol in einem Ansatz von 20 µl Endvolumen getestet, wobei *atpA*- und *ddl*-spezifische Oligonukleotide zunächst in identischer Menge eingesetzt wurden. Bei der anschließenden Gelelektrophorese zeigten sich für alle durchgeführten Kombinationen drei distinkte Banden, welche mithilfe des mitgeführten Molekulargewichtstandards als *atpA*-, *ddl*- und VNTR1398-spezifische Fragmente identifiziert werden konnten. Die Bildung von Primer-Dimeren wurde nicht beobachtet. Jedoch stellte sich die Bande des Gens *atpA* relativ schwach dar bei gleichzeitig guter Bandenintensität der *ddl*- und VNTR1398-spezifischen Genfragmente (Abbildung 2).

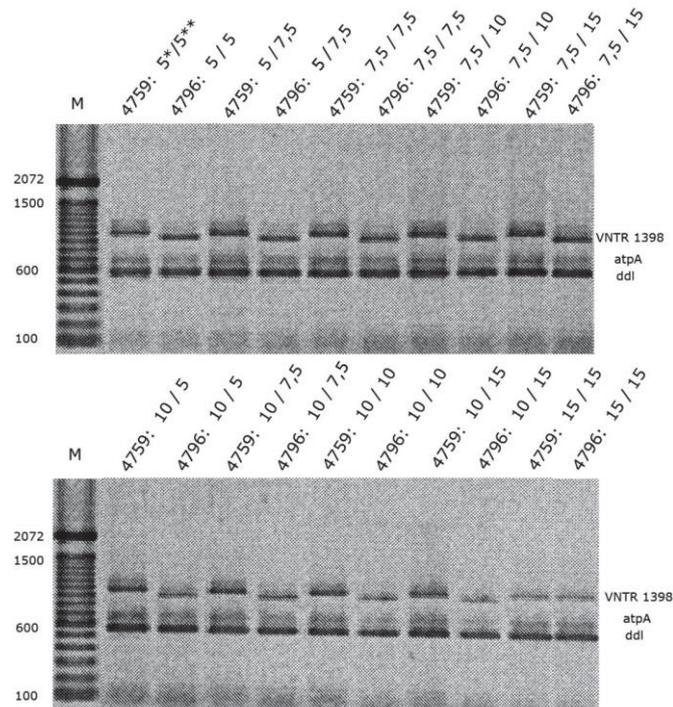


Abb. 2: Exemplarische Resultate der Multiplex-PCR bei variabler Primerkonzentration

Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare Efm_TR1398f/Efm_TR1398r, ddl1/ddl2 und atpA1/atpA2 variierend in einer absoluten Menge von 5 bis 15 pmol pro 20 µl Endvolumen mit Template DNA der Stämme 4759 und 4796 (30 PCR-Zyklen). Spur M: 100 bp DNA-Leiter.

* Die erste Zahl gibt jeweils die absolute Menge der Oligonukleotidpaare ddl1/ddl2 und atpA1/atpA2 an.

** Die zweite Zahl gibt jeweils die absolute Menge des Oligonukleotidpaares Efm_TR1398f/Efm_TR1398r an.

In einem weiteren Versuch wurde daher zum einen die Konzentration des Oligonukleotidpaares atpA1/atpA2 in absoluten Mengen zwischen 5 und 15 pmol in einem Ansatz von 20 µl variiert, während die Konzentrationen der beiden anderen Oligonukleotidpaare konstant gehalten wurden. Gewählt wurde hierfür die niedrigste Oligonukleotid-Konzentration bei gleichzeitig guter Bandenintensität für *ddl* und VNTR 1398 (Efm_TR1398f/Efm_TR1398r 7,5 pmol bzw. ddl1/ddl2 5 pmol pro Ansatz). Zusätzlich wurde ein zweites Oligonukleotidpaar (atpA1n/atpA2n) getestet, welches wie atpA1/atpA2 aus dem MLST-Schema für *E. faecium* stammt (18). Als Template wurde die DNA der vier VREF-Stämme 2564, 2583, 2591 und 2676 verwendet (Tabelle 4). Die anschließend erfolgte Gelelektrophorese zeigte, dass sich die *atpA*-Bande bei Verwendung des Primerpaares atpA1n/atpA2n intensiver darstellte als bei Verwendung des Primerpaares atpA1/atpA2, im Gegenzug jedoch die *ddl*-Bande etwas schwächer wurde (Abb. 3).

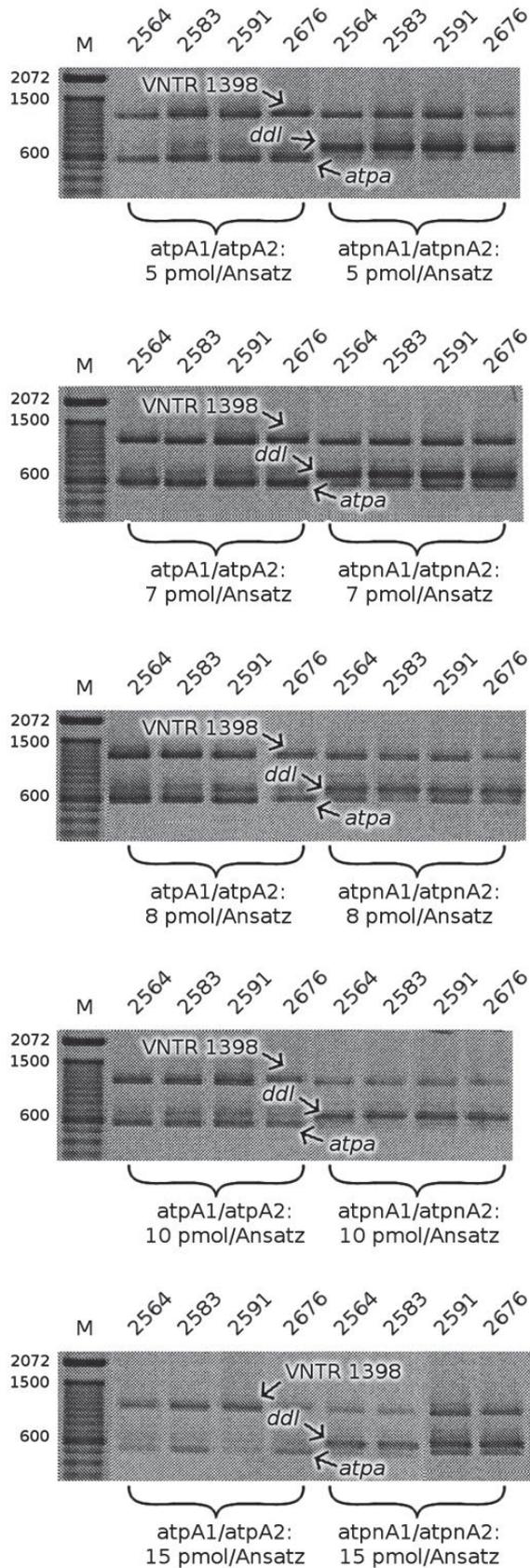


Abb. 3: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 2564, 2583, 2591, 2676

Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare Efm_TR1398f/Efm_TR1398r (7,5 pmol/Ansatz), ddl1/ddl2 (5 pmol/Ansatz), atpA1/atpA2 bzw. atpA1n/atpA2n in variierender Konzentration. Spur M: 100 bp DNA-Leiter.

Die deutlichste Bandenintensität zeigte sich bei der Konzentration für *atpAn1/atpAn2* von 5 und 7 pmol/Ansatz. Dementsprechend wurde mit dem Primerpaar *atpA1n/atpA2n* weitergearbeitet und um die Produktmenge insgesamt zu erhöhen, die Konzentrationen der Oligonukleotide angehoben, ohne das Verhältnis der Primermengen zueinander zu verändern. Die Zyklenzahl wurde zusätzlich von 30 auf 35 erhöht. Die Darstellung der anschließend erfolgten Gelelektrophorese ist in Abb. 4 zu sehen.

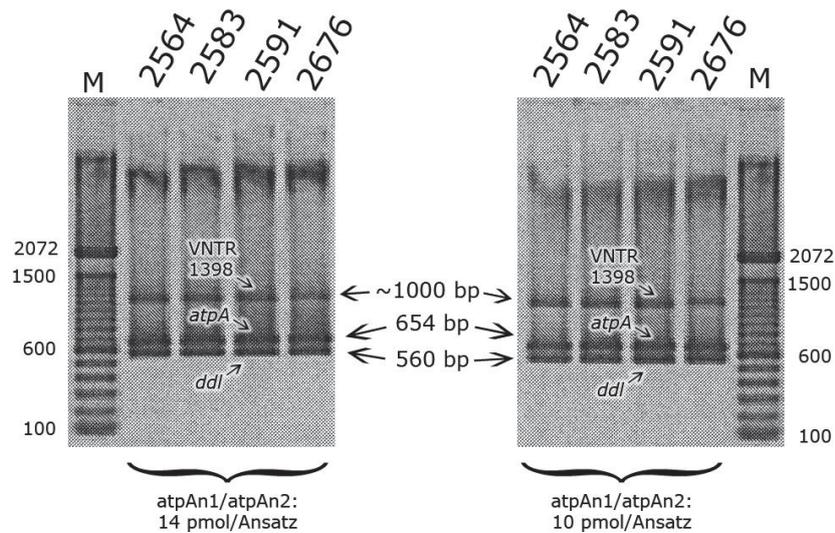


Abb. 4: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 2564, 2583, 2591, 2676 mit erhöhter Zyklenzahl.

Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare *Efm_TR1398f/Efm_TR1398r* (15 pmol/Ansatz), *ddl1/ddl2* (10 pmol/Ansatz), *atpA1n/atpA2n* (10 bzw. 14 pmol/Ansatz), 35 PCR-Zyklen. Spur M: 100 bp DNA-Leiter.

Sowohl mit der Konzentration für *atpAn1/atpAn2* von 10 als auch von 14 pmol/Ansatz ergaben sich jeweils drei distinkte Banden in gleich starker Intensität. Es wurde mit der absoluten Menge von 10 pmol *atpAn1/atpAn2* pro Ansatz weitergearbeitet.

Damit ergaben sich abschließend folgende absolute Primermengen pro Versuchsansatz à 20 µl Endvolumen: je 15 pmol *Efm_TR1398f/Efm_TR1398r* sowie je 10 pmol *ddl1/ddl* und *atpA1n/atpA2n*. Die anschließende Sequenzierung der PCR-Fragmente zeigte, dass in der Multiplex-PCR genügend Amplifikat entstanden war, um die Sequenz der untersuchten Fragmente eindeutig analysieren zu können. Die Allele der Gene *atpA* und *ddl* sowie des VNTR1398 ließen sich eindeutig bestimmen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzergebnisse der zur Etablierung der Multiplex-PCR verwendeten VREF-Stämme mit langem VNTR1398-Fragment

Stamm-Nr.	MLVST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	VNTR1398	Größe VNTR1398
2564	27	3	2	3	994 bp
2583	28	5	2	3	994 bp
2591	29	9	2	3	994 bp
2676	73	9	5	30	1018 bp

Abschließend wurde nun das unter Kapitel 2.2.4 aufgeführte endgültige Multiplex-PCR-Protokoll exemplarisch an vier stichprobenartig ausgewählten VREF-Stämmen 4686, 4701, 4715 und 4739 getestet, welche diverse ST_{MLVST} vertraten.

Eine Darstellung der im Anschluss durchgeführten Gelelektrophorese ist in Abbildung 5 zu sehen. Mithilfe der anschließenden Sequenzierung konnten die Sequenzen der untersuchten Fragmente VNTR1398, *atpA* und *ddl* eindeutig bestimmt werden.

Mithilfe des Multiplex-PCR-Protokolls konnte bei gleichbleibender Spezifität und Sensitivität gegenüber den Einzelreaktionen der zeitliche und finanzielle Aufwand reduziert werden.

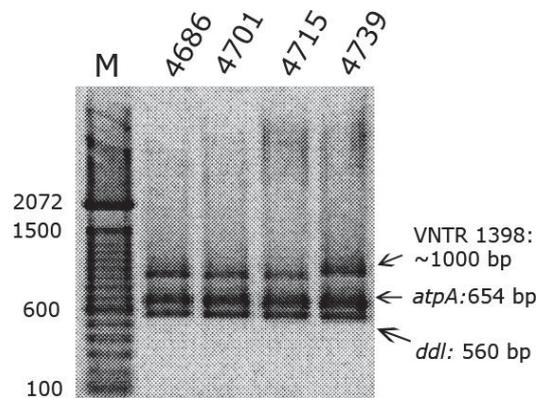


Abb. 5: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 4686, 4701, 4715 und 4739

Verwendet wurden die synthetischen Oligonukleotide Efm_TR1398f/Efm_TR1398r (15 pmol), *ddl1/ddl2* (10 pmol) und *atpA1n/atpA2n* (10 pmol) in einem Ansatz mit 20 μ l Endvolumen (35 PCR-Zyklen). Spur M: 100 bp DNA-Leiter.

4. Diskussion

Die Wahl einer Typisierungsmethode zur infektionsepidemiologischen Untersuchung von VREF wird durch die für eine Analyse zur Verfügung stehende Zeit und die Fragestellung der Untersuchung beeinflusst. Bei der Ausbruchsdagnostik im Krankenhaus sollte eine schnelle Typisierungsmethode mit hoher Diskriminationsfähigkeit vorgezogen werden. Der Goldstandard aufgrund der hohen Diskriminationsfähigkeit ist nach wie vor PFGE (4,9,30), allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwändig und laborintensiv. Die Interpretation der Ergebnisse beruht auf der visuellen Betrachtung der Bandenmuster, wodurch ein gewisser subjektiver Interpretationsspielraum gegeben ist. Eine automatisierte Durchführung und Auswertung der PFGE ist schwierig zu gestalten, hierdurch ist die intra- und interlaboratorielle Reproduzierbarkeit beeinträchtigt (16,42,48). Wünschenswert wäre eine schnell durchführbare Typisierungsmethode mit hohem Diskriminationspotential, die gleichzeitig seriell reproduzierbare Ergebnisse liefert (11,16,48).

Bei der MLVST werden Informationen aus der Sequenzierung des VNTR1398 und zweier Haushaltsgene kombiniert und zur Typisierung verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Testpopulation bestehend aus 38 VRE-Bakterienstämmen mithilfe der MLVST typisiert. Ziel war die Bestimmung der Typisierbarkeit und der Diskriminationsfähigkeit der MLVST, die Bestimmung der Konkordanz der MLVST mit dem rep-PCR-Verfahren sowie die Etablierung einer Multiplex-PCR zur simultanen Amplifizierung der drei zu untersuchenden Fragmente VNTR1398, *atpA* und *ddl*. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der MLVST-Untersuchung im Hinblick auf Primär- und Sekundärkriterien von Typisierungsmethoden sowie Vor- und Nachteile der MLVST diskutiert werden.

4.1 Diskriminationspotential von MLVST und rep-PCR

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte *DI* für die MLVST-Analyse liegt bei 0,805 (95 %-Konfidenzintervall 0.717-0.893). Die Tatsache außer Acht lassend, dass für verschiedene epidemiologische Fragestellungen Typisierungsmethoden mit unterschiedlich hohen *DI* erwünscht sind, sollte ein Typisierungsverfahren dennoch einen *DI* größer als 0,9 aufweisen, da sonst die gewählte Typisierungsmethode nicht ausreichend zwischen nicht verwandten Stämmen zu unterscheiden vermag (21,36).

Der *DI* der hier durchgeführten MLVST-Analyse ist im Vergleich sowohl niedriger als der *DI* der hier angewandten rep-PCR-Analyse (*DI* 0,805 vs. 0,919) als auch im Vergleich mit dem *DI* von 0,964 in einer früheren Anwendung der MLVST für eine Stammsammlung von 144 gut charakterisierten und ausgesprochen heterogenen Umwelt- und klinischen VREF-Isolaten (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung).

Ein Grund für die Diskrepanz dieser aus zwei verschiedenen MLVST-Analysen stammenden *DI* liegt vermutlich in der Tatsache, dass nahezu 90 % der hier untersuchten Bakterienstämme in einem Zeitraum von lediglich vier Monaten innerhalb des UKM isoliert wurden. Im Gegensatz dazu wurden lediglich vier Isolate aus einem peripheren Akutkrankenhaus einer anderen Region untersucht. Bereits frühere Studien haben gezeigt, dass bei einem regional und zeitlich begrenzten Bakterienkollektiv eine geringere Diversität zu erwarten ist (9,21).

Die Betrachtung der Herkunftsstationen der untersuchten Isolate zeigte, dass es zu stationären Häufungen von Isolaten desselben ST_{MLVST} kommt (s. 3.4), die möglicherweise durch eine nosokomiale Übertragung erklärt werden könnten. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das geringe Diskriminationsvermögen der MLVST-Analyse hier fälschlicherweise das Vorhandensein von Ausbruchsszenarien suggeriert, da die Methode nicht in der Lage ist, genau genug zwischen nicht verwandten Isolaten zu differenzieren. Tatsächlich zeigte in dieser Arbeit der Vergleich von rep-PCR und MLVST, dass die rep-PCR mit dem größeren Diskriminationsvermögen für die Untersuchung möglicher Ausbruchsgeschehen die besser geeignete Methode ist. Jedoch ergaben vorherige Studien, dass im Vergleich zur rep-PCR PFGE immer noch die Referenzmethode zur Bestätigung eines Ausbruchs bleibt (9,30). PFGE-Daten zu den hier untersuchten Stämmen liegen nicht vor.

4.2 Konkordanz von MLVST zu rep-PCR und anderen Typisierungsverfahren

Der ARI ist mit einem Wert von 0,185 sehr niedrig. Es bedeutet, dass etwas weniger als jede fünfte Paarung bei beiden Typisierungsmethoden deckungsgleich ist, d.h. entweder im selben Cluster oder in zwei verschiedenen Clustern vertreten ist. Die niedrige Konkordanz spiegelt sich auch in den berechneten Wallace-Koeffizienten wieder ($W_{repPCR-MLVST} = 0,474$, $W_{MLVST-repPCR} = 0,197$).

Grundsätzlich ist eine hohe Konkordanz zu einem etablierten Verfahren wünschenswert, um mit größerer Wahrscheinlichkeit sagen zu können, dass mittels eines Typisierungsverfahrens die wahren verwandtschaftlichen Beziehungen charakterisiert werden (5).

In einer Studie von Chowdhury *et al.* von 2009 wurde die Trilocus Sequenztypisierung (TLST) zur Typisierung von *E. faecalis* vorgestellt, bei der intragenische Bereiche zweier Antigen-kodierender Gene sowie eines Antibiotika-Resistenzgens sequenziert werden. Die Anwendung auf ein Bakterienkollektiv bestehend aus 50 *E. faecalis* mit 42 distinkten MLST-Sequenztypen zeigte einen nahezu identischen *DI* der Verfahren TLST und MLST (0,981/0,99) sowie eine extrem hohe Konkordanz von TLST zu MLST (ARI 0,956). Die TLST-Analyse von 10 VRE-Krankenhausisolaten, welche sich aus vier PFGE-Subtypen zusammensetzten, zeigte zudem eine hohe Kongruenz im Vergleich zur PFGE (7).

Die oben genannte Studie befasst sich mit der sequenzbasierten Typisierung von *E. faecalis* mittels dreier Genloci. In der vorliegenden Arbeit jedoch wird erstmalig ein entsprechender Vergleichsansatz für *E. faecium* vorgestellt, wobei es sich hier um den epidemiologisch relevanteren Keim unter Vancomycin-resistenten Enterokokken handelt.

In einer Studie von 2015 verglichen Klare *et al.* die Performance von DiversiLab®, MLST und PFGE anhand von 65 klinischen Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten. Hier zeigte sich im qualitativen Vergleich eine gute Konkordanz zwischen PFGE, DiversiLab® und MLST. ARI oder Wallace-Indices wurden nicht berechnet (47).

Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen, dass die Konkordanz eines rep-PCR basierten Verfahrens zu PFGE bei der VRE-Typisierung gut bis sehr gut ist: in einer Studie von Pounder *et al.* (30) gruppierten 83 von 95 untersuchten VRE-Isolaten identisch mittels beider Methoden; in einer Studie von Chuang *et al.* (9), bei der 90 VREF-Isolate untersucht wurden, ergab sich ein Wallace-Koeffizient von 0,93 beim Vergleich von rep-PCR zu PFGE bzw. von 0,14 beim Vergleich von PFGE zu rep-PCR. In einer Voruntersuchung (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung) zur Etablierung des MLVST-Schemas wurde ein Bakterienkollektiv bestehend aus 144 Umwelt- und klinischen Isolaten Vancomycin-resistenter *E. faecium* untersucht. Die

144 Isolate wurden auch mittels MLST und MLVA charakterisiert. Weitere 94 zusammenhängende und nicht-zusammenhängende klinische Isolate aus dem Bereich des UKM, für die z. T. auch PFGE-Daten zur Verfügung standen, wurden ebenfalls mittels MLVST untersucht. Es zeigte sich eine gute bis sehr gute Konkordanz von MLVST zu MLST (ARI 0,987) und zu MLVA (ARI 0,936). Auch der qualitative Vergleich von MLVST und PFGE zeigte eine hochkonkordante Gruppierung (Daten nicht gezeigt).

Die Ursache der Diskrepanz der einerseits hohen Konkordanz von MLVST zu MLST, MLVA und PFGE in jener Voruntersuchung und der andererseits geringen Konkordanz zur rep-PCR in der vorliegenden Arbeit (ARI 0,185) liegt vermutlich in der unter 5.1 beschriebenen Auswahl des untersuchten Bakterienkollektivs begründet: in der Voruntersuchung handelte es sich um ein sehr heterogenes Kollektiv, welches sich sowohl aus Krankenhausisolaten als auch aus Umweltisolaten zusammensetzte, während in dieser Arbeit nahezu 90 % der untersuchten Bakterien Krankenhauskeime waren, welche in einem Zeitraum von lediglich vier Monaten innerhalb des UKM isoliert wurden. Wenn bei zwei Typisierungsmethoden das Diskriminationsvermögen deutlich voneinander abweicht, wird auch die Konkordanz dementsprechend niedrig sein, da in diesem Fall zwei Isolate mittels der weniger diskriminatorischen Methode in einigen Fällen in dem gleichen Cluster und mittels der höher diskriminatorischen Methode unterschiedlich gruppieren (15).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass MLVST nicht genügend kongruent mit einer etablierten Methode wie der rep-PCR ist, um in einem Kollektiv nosokomialer Isolate die korrekten Verwandtschaftsverhältnisse anzuzeigen. Rep-PCR-basierte Verfahren erscheinen den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge hierfür im Vergleich zu MLVST die geeignetere Methode zu sein.

Interessant wäre es zu sehen, wie sich - bezogen auf das in dieser Arbeit untersuchte Stammkollektiv – die Konkordanz von MLVST zu MLST, MLVA und PFGE verhalten würde. Für die 38 untersuchten VREF-Isolate sind jedoch keine entsprechenden Daten vorhanden, um eine Aussage hierüber treffen zu können.

4.3 Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit mittels MLVST und rep-PCR im Vergleich zu anderen Typisierungsverfahren

Die Typisierbarkeit mit MLVST wäre eingeschränkt bei Abwesenheit des VNTR1398 oder bei Anwesenheit eines für eine Sequenzierung zu langen VNTR1398 (>1100 bp). Mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Verfahren MLVST und rep-PCR ließ sich für die 38 untersuchten Bakterienisolate eine Typisierbarkeit von 100 % erzielen. Für jeden untersuchten Stamm konnte sowohl ein eindeutiger FP als auch ein eindeutiger ST_{MLVST} bestimmt werden. In der unter 1.2 beschriebenen Anwendung der MLVST auf 144 VRE-Isolate (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung) konnte in nur 86,1 % der Fälle eine VNTR1398-Region sequenziert werden. Es zeigte sich also eine deutliche Einschränkung der Typisierbarkeit.

Die Ergebnisse einer Typisierungsmethode sollten reproduzierbar sein und bei Wiederholung im gleichen Labor oder in einem anderen Labor zu einem hohen Prozentsatz das identische Ergebnis liefern (49). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die MLVST bei insgesamt acht Bakterienstämmen doppelt durchgeführt (Stämme 2564, 2583, 2591, 2676, 4686, 4701, 4715 und 4739). Für alle acht Stämme wurde jeweils der gleiche ST_{MLVST} erzielt, so dass man insgesamt von einer guten Reproduzierbarkeit ausgehen kann. Die Reproduzierbarkeit der rep-PCR wurde nicht getestet. Allerdings zeigte eine Studie von Deplano *et al.* (15), bei der 165 multiresistente Stämme von *E. faecium*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* mittels rep-PCR charakterisiert und je nach Bakterienspezies ab einer Bandenübereinstimmung zwischen 94-97 % einem rep-PCR-Cluster zugeordnet wurden, eine 100 %ige Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der rep-PCR für alle untersuchten Bakterien.

In einer Studie von Top *et al.* von 2008 wurde die Typisierung von 393 VREF-Krankenhausesisolaten aus dem Rush University Medical Center (Chicago) basierend auf PFGE- und MLVA-Daten verglichen (39). Die Typisierbarkeit mittels PFGE lag nur bei 91,1 % (358 von 393); für 35 Isolate ergab sich kein interpretierbares PFGE-Bandenmuster. Eine denkbare Erklärung hierfür wird nicht diskutiert. Die Typisierbarkeit mittels MLVA lag dagegen bei 99,5 % (391 von 393); lediglich 2 Isolate ließen sich nicht mittels MLVA typisieren. MLVA wird ferner als hoch reproduzierbare Methode beschrieben (38,39).

In einigen Studien werden Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit von PFGE-Analysen dargestellt (10,12,42). In der Studie von Van Belkum *et al.* (42) wurde beispielsweise die interlaboratorielle Reproduzierbarkeit anhand einer PFGE-Untersuchung von 20 *S. aureus*-Stämmen in 12 verschiedenen Laboren aus neun Ländern nach laboreigenem PFGE-Protokoll sowie mithilfe eines kommerziellen PFGE-Kits analysiert. Dabei zeigte sich, dass vier von 12 Zentren mittels des standardisierten PFGE-Protokolls keine Daten generieren konnten. Von den übrigen acht Studienteilnehmern konnten nur fünf die korrekten Verwandtschaftsverhältnisse ermitteln. Schwierigkeiten gab es weiterhin bei drei Laboren bezüglich der korrekten Anzeige der PFGE-Subtypen. Fazit der Studie war, dass zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Austauschbarkeit der Daten eine Minimierung der möglichen Variabilität im Rahmen der Durchführung der PFGE wie z.B. DNA-Präparation, PFGE-Apparatur, Wahl des Restriktionsenzym und Elektrophoresebedingungen stattfinden muss (42). Eine entsprechende Empfehlung wurde ebenso in einem Übersichtsartikel über Anwendung und Interpretation der PFGE von Goering *et al.* aus dem Jahr 2010 beschrieben (16).

In den bereits erwähnten TLST-basierten Studien von Chowdhury *et al.*, die auf der Sequenzierung intragenischer Bereiche zweier Antigen-kodierender Gene sowie eines Antibiotika-Resistenzgens zur Typisierung von *E. faecalis* basierten, wurden keine Daten zu Reproduzierbarkeit oder Typisierbarkeit der Methode erhoben (7,8). Jedoch ist in der Literatur beschrieben, dass sich sequenzbasierte Typisierungsverfahren aufgrund der Eindeutigkeit von Sequenzierungsdaten grundsätzlich durch eine hohe Reproduzierbarkeit auszeichnen (2). Dies trifft somit auch auf TLST und MLST zu.

Zusammenfassend kann festhalten werden, dass die in dieser Arbeit auf 38 VRE-Stämme angewandten Methoden MLVST und rep-PCR im Vergleich zu den oben genannten Typisierungsmethoden sehr gute Typisierbarkeit zeigen und dass MLVST - bezogen auf die acht doppelt untersuchten VRE-Stämme - ebenfalls eine sehr gute Reproduzierbarkeit zeigt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Typisierbarkeit der MLVST bei einem größeren und heterogenen Bakterienkollektiv Einschränkungen aufweist, wie dies zuvor bereits beobachtet wurde (B. Middendorf-Bauchart, persönliche Mitteilung).

4.4 Korrelation zwischen MLVST-Profil und Resistenztyp

Bei Betrachtung der Typisierungsergebnisse sowie der Resistenztypbestimmung fiel auf, dass innerhalb eines ST_{MLVST} immer der gleiche Vancomycin-Resistenztyp vertreten war (Tabelle 3).

Die Bakterien innerhalb eines ST_{MLVST} besitzen die gleichen Allele für die Haushaltsgene *atpA* und *ddl* sowie das gleiche Allel für VNTR1398. VNTR1398 zeichnet sich durch große Variabilität aus. Vermutlich ist unter Bakterien mit gleichem ST_{MLVST} ein hoher Verwandtschaftsgrad anzunehmen; dies ist die Überlegung, die der Idee der MLVST-Typisierung zu Grunde lag. Bakterien mit hohem Verwandtschaftsgrad weisen Charakteristika auf, die sie epidemiologisch von nicht verwandten Bakterien unterscheiden (35). Somit wäre verständlich, dass VREF-Stämme mit gleichem ST_{MLVST} den gleichen Resistenztyp besitzen.

Einige Typisierungsschemata ziehen die Bestimmung des Resistenztyps als zusätzliche Information zur Verbesserung der Diskriminierung hinzu. In dem vorliegenden Fall hätte dies jedoch das Diskriminationspotential der MLVST aufgrund der oben beschriebenen Beobachtung nicht verändert.

4.5 Etablierung einer Multiplex-PCR

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Multiplex-PCR etabliert, bei der PCR-Produkte der Zielsequenzen VNTR1398, *atpA* und *ddl* zunächst in vergleichbarer Menge amplifiziert und anschließend sequenziert werden konnten. Dabei besteht generell die technische Herausforderung, Zielsequenzen unterschiedlicher Größe gleichermaßen anzureichern (*ddl* 560 bp, *atpA* 654 bp, VNTR1398 391-1018 bp). In der Literatur wird geraten, dass die in einer Multiplex-PCR zu amplifizierenden Elemente eine Längendifferenz von 300 bp möglichst nicht überschreiten sollten (50). Ein Ungleichgewicht der Reaktionsabläufe in der Elongationsphase, in der es durch die Anlagerung von dNTP zur Kettenverlängerung kommt, wird bei größerer Längendifferenz der zu amplifizierenden Elemente wahrscheinlicher. Ein längeres zu amplifizierendes Fragment benötigt tendenziell eine höhere dNTP-Konzentration und eine längere Elongationsphase als ein kürzeres, in einer Multiplex-PCR unterliegen jedoch alle Fragmente denselben Bedingungen. Darüber hinaus besteht bei der Verwendung multipler synthetischer Oligonukleotide in einem PCR-Reaktionsansatz

die Möglichkeit, dass die Oligonukleotide miteinander Dimere bilden, anstatt an die Zielsequenz zu binden (50). Dies würde dazu führen, dass für die miteinander hybridisierten synthetischen Oligonukleotide kein PCR-Produkt entsteht. In der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese würde sich eine Bande im unteren Molekulargewichtsbereich abzeichnen. Die Tatsache, dass dieses Phänomen bei der in der vorliegenden Arbeit etablierten Multiplex-PCR nicht beobachtet wurde, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei nur drei verwendeten Primerpaaren die Kombinationsmöglichkeiten und somit die Möglichkeiten zur Primer-Dimer-Bildung gering sind.

4.6 Vorteile und Nachteile der MLVST

Im Folgenden sollen die Stärken und Schwächen der MLVST-Untersuchung dieser Arbeit einander gegenübergestellt werden.

MLVST zeichnet sich durch gute Praktikabilität und leichte Interpretierbarkeit aus. Der finanzielle und zeitliche Aufwand der Methode ist begrenzt, da im Vergleich zu MLST-Analysen bei diesem Verfahren nur drei statt sieben Loci analysiert werden. Außerdem ist die Durchführung einer Multiplex-PCR möglich, wodurch der Arbeitsaufwand der Typisierung zusätzlich reduziert wird. Weiterhin ist die Methode durch hohe Typisierbarkeit und gute Reproduzierbarkeit charakterisiert. Basierend auf den eindeutigen und objektiven Indizes der ST_{MLVST} ist ein Datenaustausch der MLVST-Ergebnisse exzellent möglich.

Allerdings ist die Qualität der Sequenzierung bei einfacher Durchführung nicht immer ausreichend, um zu einem eindeutigen Ergebnis zu kommen. Besonders bei großen Fragmenten mit >600 bp Länge kann die Sequenz aufgrund der technischen Möglichkeiten in der Regel nicht doppelt abgedeckt werden, so dass Basen im randständigen Einzelstrangbereich ggf. nicht eindeutig bestimmbar sind. Darüber hinaus kann die Tatsache, dass es sich bei einem der untersuchten Fragmente um eine VNTR-Region handelt, zu Komplikationen bei der Stranganeinanderlagerung führen. Aus diesen Gründen kann für große VNTR1398-Fragmente eine mehrfache Sequenzierung notwendig sein, um zu einem eindeutigen Ergebnis zu kommen.

Ein bedeutender Vorteil der MLVST ist die mögliche Automatisierbarkeit der Methode, da die verwendeten Labormethoden PCR und Sequenzierung hierfür hervorragend geeignet sind. Bei der PFGE-Typisierung ist eine Automatisierung aufgrund des

aufwändigen apparativen Aufbaus und der DNA-Präparationstechnik nicht ohne weiteres möglich. Grundsätzlich ist die Praktikabilität einer Typisierungsmethode ein wichtiger Aspekt, da sie auch für die Routinediagnostik geeignet sein sollte.

Eine bedeutende Schwäche der MLVST-Untersuchung in dieser Arbeit ist das geringe Diskriminationspotential. Ungeklärt ist, ob das Ergebnis des *DI* durch die lokal begrenzte Auswahl der Isolate verfälscht wird und ob eventuell Ausbruchsisolate Bestandteil der untersuchten Bakterienstämme sind. Die Berechnung des *DI* einer Typisierungsmethode bei Anwendung auf eine Stichprobe, die einer Ausbruchssituation entstammt, ist nicht sinnvoll, da der *DI* darstellt, wie gut eine Methode zwischen nicht verwandten Stämmen differenziert. Für eine Ausbruchssituation ist jedoch typisch, dass die Isolate miteinander verwandt sind (9,21).

Interessant wäre es zu sehen, wie sich der *DI* durch die Hinzunahme der Sequenzierung weiterer Genloci – beispielsweise weitere VNTR oder Haushaltsgene des bekannten MLST-Schemas – verändern würde und somit auf ein ausreichendes Maß gesteigert werden könnte.

Eine weitere Schwäche der MLVST-Untersuchung ist die in dieser Arbeit nachgewiesene geringe Konkordanz zwischen MLVST und rep-PCR. Wünschenswert wäre eine höhere Konkordanz zu einem etablierten Verfahren wie rep-PCR, welche gute Übereinstimmung zum Goldstandard PFGE zeigt (9,30).

4.7 Limitationen der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein rep-PCR-basiertes Typisierungsverfahren als Referenz für die MLVST verwendet. Rep-PCR ist eine schnell durchführbare und praktikable Typisierungsmethode, die gute Konkordanz zu PFGE zeigt (9,30). Verglichen mit PFGE verfügt das rep-PCR-Verfahren jedoch über ein geringeres Diskriminationspotential und wird darum in gewissen Fällen das Vorkommen klonaler Ausbrüche überschätzen (9). Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, ob sich unter den untersuchten Bakterienstämmen Ausbruchsisolate befinden, wäre es hilfreich, die 38 VREF-Isolate zusätzlich mittels PFGE zu untersuchen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bakterien entstammen – bis auf 4 Isolate – alle der Universitätsklinik Münster und wurden innerhalb eines begrenzten Zeitraums von vier Monaten isoliert. Um zu sehen, ob vor einem anderen regionalen und zeitlichen Hintergrund ein höherer *DI* erzielt wird und ob neue Allele auftreten oder die gleichen

MLVST-Profile ermittelt werden, müsste die MLVST-Untersuchung auf ein zeitlich und regional heterogeneres Kollektiv angewandt werden. Das Auftreten neuer Allele würde für die Diversität des VNTR1398 und somit für die Verwendbarkeit dieser Region zur Typisierung sprechen. Das Auftreten derselben ST_{MLVST} würde bedeuten, dass im Klinikkontext bezüglich des VNTR1398 nicht genügend Variabilität besteht, um diesen Locus zur Typisierung zu verwenden.

4.8 Ausblick: Next Generation Sequencing (NGS)

Die technische Entwicklung von Next Generation Sequencing (NGS) hat in den letzten Jahren ermöglicht, DNA-Sequenzierungen auf Gesamtgenomebene immer schneller und kostengünstiger durchzuführen. Die erste vollständige Genomsequenzierung von *E. faecalis* wurde 2003 von Paulsen *et al.* publiziert (28,29), die erste vollständige Genomsequenzierung von *E. faecium* wurde 2012 von Lam *et al.* veröffentlicht (25). Die hierbei gewonnenen Daten gaben im Vergleich mit bestehenden Teilsequenzierungen diverser Enterokokken-Genome Aufschluss über die Differenzierung in Kern- und Pangenom, Verteilung mobiler genetischer Elemente und Verteilung und Bedeutung von Virulenzfaktoren (25).

Die Herausforderung der Zukunft ist es, aus der Fülle der bereits jetzt vorliegenden Daten neue Erkenntnisse abzuleiten und eine Alltagstauglichkeit der gewonnenen Daten für Typisierungsfragestellungen zu erreichen (43).

De Been *et al.* ist es in einer Studie von 2015 gelungen, mithilfe von 40 distinkten Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten ein hoch-diskriminierendes core genome MLST (cgMLST)-Schema zu entwickeln, das sich aus 1423 Genen des Kerngenoms zusammensetzt. Die Anwendung der cgMLST auf ein Kollektiv von 103 klonal verwandten und nicht-verwandten *E. faecium*-Isolaten aus diversen Ausbruchsszenarien zeigte, dass anhand des cgMLST eine klare Aussage über die Ausbruchszugehörigkeit getroffen werden kann. Die Entwicklung des cgMLST für *E. faecium* ermöglichte die Entwicklung einer standardisierten, nicht rechenintensiven überregionalen Datenbank, was von ausschlaggebender Bedeutung für epidemiologische Fragestellungen ist (13).

5. Zusammenfassung

Alle 38 untersuchten VREF-Stämme konnten mittels MLVST typisiert werden. Eine Multiplex-PCR konnte soweit optimiert werden, dass vergleichbare Mengen der PCR-

Produkte erzielt wurden und diese sequenziert werden konnten. Verglichen mit soliden Verfahren wie rep-PCR reichen Diskriminationspotential und Konkordanz der MLVST bezüglich des hier untersuchten Bakterienkollektivs nicht aus, um MLVST als Typisierungsmethode in möglichen Ausbruchsszenarien zu etablieren.

Die Anwendung der MLVST-Untersuchung auf ein zeitlich und regional heterogeneres Kollektiv würde zeigen, ob bezüglich *atpA*, *ddl* und VNTR1398 genügend Diversität besteht, um diese Loci-Kombination zur Typisierung in Ausbruchssituationen zu verwenden oder ob es der Hinzunahme weiterer Genloci zur Steigerung des Diskriminationspotentials bedarf. Jedoch sind aktuell Whole Genome Sequencing-Technologien wie beispielsweise cgMLST für die Typisierung von *E. faecium* auf dem Vormarsch, sodass die Weiterentwicklung der MLVST obsolet erscheint.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Aanensen DM, Spratt BG (2007) The multilocus sequence typing network: mlst.net. Online im Internet: URL: <http://efaecium.mlst.net/misc/info.asp> [Abrufdatum: 2016]
- (2) Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FC, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W (2006) High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 44 (2): 619-621
- (3) Arbeit RD (1995) Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray P, Baron E, Pfaller M (Hrsg) *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 7. Aufl., S. 116-137
- (4) Bourdon N, Lemire A, Fines-Guyon M, Auzou M, Perichon B, Courvalin P, Cattoir V, Leclercq R (2011) Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Methods* 84 (1): 74-80
- (5) Carrico JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, Pinto FR, de Lencastre H, Almeida JS, Ramirez M (2006) Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 44 (7): 2524-2532
- (6) Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 13 (4): 686-707
- (7) Chowdhury SA, Arias CA, Nallapareddy SR, Reyes J, Willems RJ, Murray BE (2009) A trilocus sequence typing scheme for hospital epidemiology and subspecies differentiation of an important nosocomial pathogen, *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 47 (9): 2713-2719
- (8) Chowdhury SA, Nallapareddy SR, Arias CA, Murray BE (2014) The majority of a collection of U.S. endocarditis *Enterococcus faecalis* isolates obtained from 1974 to 2004 lack capsular genes and belong to diverse, non-hospital-associated lineages. *J Clin Microbiol* 52 (2): 549-556
- (9) Chuang YC, Wang JT, Chen ML, Chen YC (2010) Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 48 (8): 2897-2901
- (10) Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P, Multilaboratory Project Collaborators (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6 (3): 189-198
- (11) Cookson BD, Macrae MB, Barrett SP, Brown DFJ, Chadwick C, French GL, Hateley P, Hosein IK, Wade JJ, Combines Working Party of the Hospital Infection Society and Infection

- Control Nurses Association (2006) Guidelines for the control of glycopeptide-resistant enterococci in hospitals. *J Hosp Infect* 62 (1): 6-21
- (12) Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Muller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O'Connell B, Short BD, Thomas J, O'Hanlon S, Enright MC (2007) Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* 45 (6): 1830-1837
- (13) 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, Willems RJ (2015) Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 53 (12): 3788-3797
- (14) Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, Grundmann H, Jonas D, Noordhoek GT, Dijkstra J, van Belkum A, van Leeuwen W, Tassios PT, Legakis NJ, van der Zee A, Bergmans A, Blanc DS, Tenover FC, Cookson BC, O'Neil G, Struelens MJ (2000) Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. *J Clin Microbiol* 38 (10): 3527-3533
- (15) Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M (2011) Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 49 (10): 3616-3620
- (16) Goering RV (2010) Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol* 10 (7): 866-875
- (17) Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR (2005) Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 43 (1): 199-207
- (18) Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ (2002) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 40 (6): 1963-1971
- (19) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (1995) Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16 (2): 105-113
- (20) Hubert L, Arabie P (1985) Comparing partitions. *JOC* 2 (1): 193-218
- (21) Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26 (11): 2465-2466

- (22) Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182 (10): 2928-2936
- (23) Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 88 (2-3): 269-290
- (24) Klare I, Witte W, Fahr A (2008) Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007. *Epidemiolog Bul* 23: 179-192
- (25) Lam MM, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PD, Howden BP, Stinear TP (2012) Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* 194 (9): 2334-2341
- (26) Moellering RC Jr (1992) Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 14 (6): 1173-1176
- (27) Murray BE (2000) Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 342 (10): 710-721
- (28) Palmer KL, van Schaik W, Willems RJL, Gilmore MS (2014) Enterococcal Genomics. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y (Hrsg) *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*, Boston
- (29) Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299 (5615): 2071-2074
- (30) Pounder JI, Shutt CK, Schaecher BJ, Woods GL (2006) Clinical evaluation of repetitive sequence-based polymerase chain reaction using the Diversi-Lab System for strain typing of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54 (3): 183-187
- (31) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104-108
- (32) Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A, European VRE Study Group (2000) Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19 (11): 816-822
- (33) Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC (2008) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis* 46 (5): 668-674
- (34) Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W H Freeman & Co, USA, Bd. 1, 1. Aufl.
- (35) Struelens MJ (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin.Microbiol.Infect.* 2 (1): 2-11

- (36) te Witt R, Kanhai V, van Leeuwen WB (2009) Comparison of the DiversiLab™ system, pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J Microbiol Methods* 77 (1): 130-133
- (37) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV (1997) How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18 (6): 426-439
- (38) Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL (2004) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* 42 (10): 4503-4511
- (39) Top J, Banga NM, Hayes R, Willems RJ, Bonten MJ, Hayden MK (2008) Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 14 (4): 363-369
- (40) Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA (2005) Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol* 43 (1): 462-463
- (41) Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC (1988) Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1 (8575-6): 57-58
- (42) van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brien F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H (1998) Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 36 (6): 1653-1659
- (43) van Schaik W, Willems RJ (2010) Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin Microbiol Infect*
- (44) Werner G, Klare I, Witte W (2007) The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol* 7: 28
- (45) Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 13 (47): 19046
- (46) Werner G, Klare I, Hübner J, Witte W (2008) Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemother J* 17 (5): 183-193
- (47) Werner G, Fleige C, Neumann B, Bender JK, Layer F, Klare I (2015) Evaluation of DiversiLab®, MLST and PFGE typing for discriminating clinical *Enterococcus faecium* isolates. *J Microbiol Methods* 118: 81-84

-
- (48) Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V (2000) Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemother J* 9 (2): 93-98
- (49) Witte W (2002) Molekulare Typisierung bakterieller Infektionserreger. *Chemother J* (3): 95-101
- (50) Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R (1999) Multiplex PCR: Optimization guidelines. In: Innis MA, Sninsky JJ, Gelfand DH (Hrsg) *Pcr Applications: Protocols for Functional Genomics*. Academic Press, S. 73-93

7. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ARI	Adjusted Rand Index
<i>atpA</i>	ATP Synthase, alpha-Untereinheit
bp	Basenpaare
cgMLST	core genome Multilocus Sequenztypisierung
<i>ddl</i>	D-Alanin:D-Alanin-Ligase
DI	Diskriminatorischer Index
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
FP	Fingerprint-Cluster
H ₂ O dest.	Destilliertes Wasser
M	molar, Mol/l
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequenztypisierung
MLVA	Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analyse
MLVST	Multilocus Variable Number Tandem Repeat Sequenztypisierung
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
Rep-PCR	repetitive element sequence-based- Polymerase-Kettenreaktion
ST _{MLVST}	MLST-Sequenztyp
UKM	Universitätsklinikum Münster
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREF	Vancomycin-resistente <i>E. faecium</i>
W	Wallace-Koeffizienz

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Ergebnisse der rep-PCR	S. 27
Abbildung 2: Exemplarische Resultate der Multiplex-PCR bei variabler Primerkonzentration	S. 30
Abbildung 3: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 2564, 2583, 2591, 2676	S. 31
Abbildung 4: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 2564, 2583, 2591, 2676 mit erhöhter Zyklenzahl	S. 32
Abbildung 5: Resultate der Multiplex-PCR mit den Stämmen 4686, 4701, 4715 und 4739	S. 33

8.2 Tabellen

Tabelle 1: Quelle, Entnahmeort und –zeitpunkt der verwendeten 38 <i>E. faecium</i> -Stämme	S. 13
Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide	S. 17
Tabelle 3: VNTR1398-, <i>atpA</i> - und <i>ddl</i> -spezifische Allele, konsekutive ST _{MLVST} , FP, Resistenztyp sowie Herkunft und Entnahmezeitpunkt der untersuchten VREF-Stämme	S. 24
Tabelle 4: Sequenzergebnisse der zur Etablierung der Multiplex-PCR verwendeten VREF-Stämme mit langem VNTR1398-Fragment	S. 33

9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mir das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht haben, mir zur Seite standen und mich immer wieder motiviert haben.

Meinen besonderen Dank möchte ich aussprechen an:

Prof. Dr. Helge Karch für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit

Dr. Barbara Middendorf-Bauchart für die wissenschaftliche Begleitung, für die stete Hilfsbereitschaft und motivierende Worte

Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann für die zuverlässige und hilfreiche Unterstützung

Olena Mantel und allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene für die immer freundliche Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei meiner Arbeit im Labor.

Tobias Glasmacher für deine Hartnäckigkeit und dein geduldiges Zuhören

Meinen Eltern für eure Unterstützung und Förderung, Liebe und Vertrauen

10. Lebenslauf