

## 5 Diskussion

### 5.1 Kritische Bewertung der verwendeten Methoden

#### 5.1.1 Methoden der Probengewinnung

##### Aufbau der Studie

Die Proben, die dieser Studie zugrunde gelegt wurden, waren für die Einschätzung des Vorhandenseins von VRE in der normalen Bevölkerung erhoben worden. Als Teilnehmer für die Studie wurden Personen des Institutes, bzw. Freunde und Kommilitonen rekrutiert, durch dieses Vorgehen kann man nur eine eingeschränkte Aussage über die normale Bevölkerung machen. Eine bessere Aussage wäre möglich, wenn die Probanden zufällig ausgewählt worden wären. Erschwerend kommt hinzu, dass die Probanden teilweise im selben Haushalt leben und somit eventuell Übertragungen stattgefunden haben könnten. Die Auswahl dieses Vorgehens war durch seine Praktikabilität bedingt. Trotz der Einschränkungen können Ergebnisse dieser Studie Hinweise auf die allgemeine Bevölkerung geben.

Die Auswahl der Enterokokken von den Platten war primär auf das Vorhandensein von Vancomycin-resistenten Stämmen ausgerichtet. Daher wurden nur maximal fünf Kolonien von Enterokokken pro Proband und Monat ausgewählt. Insbesondere wurden Isolate von Nährmedien mit Vancomycin-Zusatz gewonnen. Dadurch entsteht ein Selektionsbias zu den resistenten Stämmen. Davon ausgehend, dass eine Person eine Vielzahl von nicht resistenten aber nur wenige resistente Stämme hat, kann dadurch ein gleicher Stamm unter den resistenten eher "wieder" gefunden werden. Auch diese Einschränkung muss daher bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Abstriche wurden monatsweise abgenommen, somit kann man jeden Abstrichmonat als Prävalenzstudie ansehen. Durch die wiederholten Abstriche bei denselben Personen werden die Beobachtungen zu einer Inzidenzstudie. Bisher ist nicht bekannt, wie lange ein *Enterococcus*-Stamm bei einer Person verweilt, und wieviele verschiedene Enterokokken-Stämme bei einer Person "normal" sind. Die vorliegende Untersuchung kann also nur Aussagen über einen

Unterschied in der Besiedlung in Monaten feststellen. Für Stämme, die zweimal gefunden wurden, ergeben sich daraus die folgenden Möglichkeiten. Der Stamm war während der gesamten Zeit auch vorhanden, oder der Stamm wurde zwischenzeitlich wieder erworben. Für nicht "wiedergefundene" Stämme ergibt sich noch die dritte Möglichkeit, dass bei der Auswahl der Enterokokken von der Platte dieser Stamm nicht ausgewählt wurde.

#### Abstriche

Von den Probanden wurden Rektalabstriche gesammelt und diese direkt ausgestrichen. Einige Untersuchungen haben diese Methode mit der Untersuchung von Stuhlproben, bzw. Rektalabstrichen, die zuvor in einem Nährmedium angereichert wurden, verglichen. Dabei fanden Ieven et al., dass bei Rektalabstrichen sehr viel weniger resistente Stämme isoliert werden können als bei der Untersuchung von Stuhlproben<sup>132</sup>. Van der Auwera et al. hingegen fanden, dass die Untersuchung der Rektalabstriche genauso sensitiv sei<sup>133</sup>.

#### Selektion der Isolate und Probenauswahl

Die Selektion der Enterokokken erfolgte durch Ausstrich der Proben auf Enterococcosel Agar. Die Selektion erfolgt durch die Galletoleranz und Hydrolyse des Äsculins. Diese Methode wurde von mehreren Autoren zur Selektion von Enterokokken beschrieben<sup>134-136</sup>. Von diesen so gewonnenen Isolate wurde zur weiteren Spezifizierung das Wachstum in 6,5% NaCl getestet<sup>135</sup>. Durch die kurze biochemische Reihe konnte bereits eine Einteilung in die häufig vorkommenden Enterokokken getroffen werden. Insgesamt können aber bei diesem Vorgehen einige Isolate, als Enterokokken missklassifiziert worden sein.

Die Selektion für Vancomycin-resistente Enterokokken erfolgte nach dem gleichen Schema. Hinzu kam allerdings, dass dem Nährmedium 4 µg/ml bzw. 16 µg/ml Vancomycin zugesetzt worden war. Dieses Vorgehen wird weltweit für VRE –Screeninguntersuchungen empfohlen<sup>137-140</sup>. Allerdings besteht über die Menge des zugesetzten Vancomycins kein Konsensus<sup>141</sup>. Von den meisten Autoren wird ein Zusatz von 6 µg/ml Vancomycin benutzt. In einer Untersuchung von Wendt et al. wurde die Validität des Screeningagars mit 4 µg/ml und 16 µg/ml untersucht, dabei zeigte der Zusatz mit 4 µg Vancomycin eine Sensitivität von 97,6% mit einer Spezifität von 35% und der Agar mit 16µg eine Sensitivität von 92,5% mit einer Spezifität von 89,3%<sup>142</sup>.

Bei der Auswahl der Proben wurden nur Isolate berücksichtigt, die in der kurzen biochemische Reihe nicht als *E. faecalis* identifiziert worden waren. Möglicherweise befanden sich unter diesen noch missklassifizierte *E. faecium*-Isolate.

### 5.1.2 Methoden der Prävalenz von Resistenzgenen

#### Speziesnachweis mit phänotypischen Methoden (Biochemische Reihe)

Phänotypische Eigenschaften sind sehr von den Umgebungsbedingungen abhängig, zusätzlich werden Variationen der Ausprägungen beschrieben<sup>143</sup>. In der Literatur ist mittlerweile häufig beschrieben worden, dass die Identifikation von *E. gallinarum* und *E. casseliflavus/E. flavescens* oft fehlerhaft ist<sup>15,137,140,144-153</sup>. Auch in einem Ringversuch vom Nationalen Referenzzentrum für Enterokokken (RKI, Wernigerode) wurde dieses deutlich. An dem Versuch hatten sich 56 deutsche und 6 österreichische Labore beteiligt. Während *E. faecalis* in 100% und *E. faecium* in 96% der Labore richtig identifiziert wurden, wurde *E. gallinarum* nur von 36% und *E. casseliflavus/E. flavescens* nur in 59% der Labore richtig identifiziert.

Phänotypisch unterscheiden sich *E. casseliflavus* und *E. flavescens* durch die Fermentation von Ribose, diese wird von *E. casseliflavus* fermentiert, nicht aber von *E. flavescens*. Durch die DNA:DNA Hybridisierung von diesen beiden Spezies und Vergleich der 16S RNA zeigte sich aber ein so hoher Verwandtschaftsgrad, dass *E. flavescens* eher eine Subspezies von *E. casseliflavus* zu sein scheint<sup>15,16</sup>, weshalb in der vorliegenden Untersuchung keine Unterscheidung zwischen den beiden Spezies gemacht wurde.

#### Erweiterte Biochemische Reihe

Bei der Einführung der speziesspezifischen PCR sollte eine phänotypische Untersuchung zur Überprüfung des Ergebnisses eingesetzt werden. Zur Verbesserung der Spezifität der Reaktionen wurde daher die Reaktion mit  $\alpha$ -Methy-D-Gluco-Pyranosidase eingeführt<sup>115,116,154,155</sup>; insbesondere, da die Unterscheidung von *E. faecium* und *E. casseliflavus/E. flavescens* bzw. *E. gallinarum* durch die kurze biochemische Reihe oft nicht möglich ist<sup>156</sup>.

#### Speziesnachweis mit PCR

Die PCR als Methode zur Identifizierung von Krankheitserregern ist für viele Spezies mittlerweile etabliert und akzeptiert<sup>157</sup>. Der Nachweis mit PCR-Methoden ist sehr spezifisch und

in der Regel schnell. Allerdings gibt es einige Fragen, die weiterhin offen geblieben sind. Allein die Frage der Spezies, die nach wie vor mehr historisch bedingt ist, wirft Fragen in der Zuordnung von Isolaten zu bestimmten Spezies auf. Die heutige Einteilung und Bestimmung der Spezies für Enterokokken beruhen auf 16S RNA und DNA:DNA Hybridisierungsversuchen. Dabei wurden klassische Vertreter der einzelnen Gruppen verglichen und anhand der Kriterien der Übereinstimmung einer Spezies zugeordnet <sup>21,158</sup>. Bei der Auswahl von PCR-Zielgenen wiederum werden Sequenzen ausgewählt, die spezifisch für die getesteten Isolate sind und keine Überschneidung mit den in den Datenbanken vorkommenden Sequenzen aufweisen. Dadurch, dass es nicht die Möglichkeit gibt, die gesamte DNA-Sequenz des jeweiligen Isolates zu bestimmen, bleibt die Frage, wie Isolate betrachtet werden sollen, die phänotypisch die erforderlichen Eigenschaften besitzen, aber nicht das Zielgen der PCR.

Die Durchführung der PCR ist zudem fehleranfällig <sup>159</sup>. Da eine Kopie der DNA oder auch nur des PCR-Produktes theoretisch genügt, um eine positive Bande zu produzieren, können leicht Kontaminationen auftreten. Um dies zu vermeiden, wurden Aufarbeitung und Ansetzen der PCR räumlich strikt getrennt, sowie die Ansätze nur unter Laminar-Airflow-Bedingungen behandelt. Zusätzlich wurde bei jedem Versuch eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen des Mastermixes zu erkennen.

Zur Bestimmung der Spezies der *E. faecium* haben wir zwei Protokolle benutzt <sup>121-123</sup>. Die jeweilige Spezifität der Protokolle wurde von den Autoren an eigenen Isolaten getestet und wie oben beschrieben mit den Datenbanken verglichen. Das Protokoll von Dutka-Malen et al. ist in verschiedenen Untersuchungen benutzt worden <sup>86,109</sup>. Das Zielgen dieser PCR-Untersuchung ist das ddl-Gen (D-Alanine:D-Alanine-Ligase, siehe Abbildung 1). Dieses Gen ist das Gen, das bei Vancomycin resistenten Enterokokken verändert ist. Durch Untersuchungen von Evers et al. konnte gezeigt werden, dass dieses Gen sehr konserviert ist und daher als phylogenetischer Marker benutzt werden kann <sup>160</sup>. Die Lokalisation des Gens bei der von Cheng et al. <sup>121</sup>verwendeten Primern ist nicht beschrieben, es ist auch nicht dokumentiert, wie gut dieser als phylogenetischer Marker benutzt werden kann.

Das Protokoll von Cheng et al. <sup>121</sup> ergab zunächst sehr gute Ergebnisse. Die PCR sollte spezifisch für *Enterococcus faecium* sein. Bei unseren Versuchen konnten wir allerdings bei zwei der vier *E. faecium* Kontrollstämmen kein positives Signal erzielen. Dies blieb unverändert auch nach

verschiedenen Kombinationen der Vorgehensweise der PCR, Veränderung der Temperatur und Veränderungen in der Zusammensetzung des Mastermixes. Neben der Möglichkeit eines Laborfehlers, den wir nicht ganz ausschließen können, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass das Zielgen dieser PCR in einigen *E. faecium* Stämmen verändert ist. Eventuell wird durch diese PCR eine Subspezies von *E. faecium* detektiert. Diese Frage führt zurück auf die Festlegung von Spezies. Welche Gene müssen bei Isolaten gleich sein, um eine Spezies zu charakterisieren. Da bisher nur einige Isolate vollständig sequenziert sind und die Homologie durch DNA:DNA Hybridisierung geführt wird, bzw. durch Studien an der 16S-RNA, sind einige Zielgene vielleicht nicht speziesspezifisch oder kommen nur in Subspezies vor.

Wir haben daher beschlossen, den Primer nicht weiter für die Speziesdiagnostik zu verwenden. In einer weiteren Studie könnte untersucht werden, ob sich die EM-negativen Isolate, die in den anderen Untersuchungen als *E. faecium* erkannt worden waren, in phänotypischen Charakteristika unterscheiden. Auch wäre es interessant, die Region des Zielgens von diesen Stämmen zu untersuchen und mit den EM-positiven Isolaten zu vergleichen.

Das Protokoll von Dutka-Malen et al.<sup>122,123</sup> enthält auch einen speziesspezifischen Primer für *E. faecalis*. Auch diese Primer haben als Zielgen das ddl. Für die intrinsisch Vancomycin-resistenten Enterokokken, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, liegen die Zielgene der Primer ebenfalls in dieser Region. Diese werden als vanC1 und vanC2/3 bezeichnet. Für das vanC1-Gen liegen mehrere Untersuchungen vor, dass dieses Gen für *E. gallinarum* spezifisch ist<sup>16,125,126</sup>. Zwar wurde in der Erstbeschreibung des PCR-Protokolls von Patel et al. ein *E. faecium* mit vanC-Gen beschrieben, aber 1998 nach Studien an der 16S RNA konnte die Studiengruppe zeigen, dass das vanC1-Gen für *E. gallinarum* spezifisch ist und es sich um eine Missklassifikation des *E. faecium* gehandelt hatte<sup>16,124</sup>. Bei den Spezies *E. casseliflavus* und *E. flavescens* ist mittlerweile die Eigenständigkeit der Spezies *E. flavescens* in Frage gestellt<sup>15,16,141</sup>. Nach neueren Untersuchungen wird empfohlen, *E. flavescens* als Subspezies von *E. casseliflavus* zu zählen<sup>161</sup>. Eine weitere Studie untersuchte die Verteilung der vanC1-, vanC2- und vanC3-Gene, dabei wurden alle *E. gallinarum* durch das Vorhandensein von vanC1-Gen identifiziert und alle *E. casseliflavus* und *E. flavescens* durch vanC2/3<sup>16</sup>. In keinem anderen *Enterococcus* wurden die Gene sonst nachgewiesen, so dass man von der Speziesspezifität dieser Primer ausgehen kann. In unserer Untersuchung haben wir zur Speziesbestimmung diese Primer benutzt.

### Phänotypische Methoden zur Resistenzbestimmung

Zur Bestimmung der Resistenz wurden die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt, der Disk-Diffusionstest und der E-Test durchgeführt. Die meisten Evaluationsversuche für Resistenztestmethoden vergleichen die Ergebnisse mit der MHK-Methode. Die E-Test-Methode wurde von mehreren Autoren als valide Methode getestet<sup>142,162-164</sup>. Auch die Disk-Diffusions-Methode wurde evaluiert und ist als Methode zur Erkennung von Vancomycin-resistenten Enterokokken anerkannt. Allerdings werden teilweise unterschiedliche Hemmhofgrößen zur Festlegung der Resistenz benutzt. Von den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) wurden 1992 neue Durchmesser für die Bestimmung eines resistenten Keimes festgelegt. Danach sollten Keime mit einem Hemmhof von  $\leq 14$  mm als resistent gewertet werden, zwischen 15 und 16 mm als intermediär und Hemmhöfe  $\geq 17$  mm als sensibel<sup>165</sup>. In der Untersuchung von Wendt et al. wurde die größte Sensitivität für die Vancomycin-resistenten Enterokokken bei einem Hemmhof von  $< 16$  mm gefunden<sup>142</sup>. Wir haben die von den CDC empfohlenen Hemmhofgrößen benutzt.

### Resistenzgen-Nachweis mit PCR

Zum Nachweis der Resistenzgene wurden PCR-Untersuchungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen Protokolle für die Vancomycin-Resistenzgene vanA, vanB, vanC1 und vanC2/3 vor: das Protokoll von Patel et al.<sup>124</sup> sowie das Protokoll von Dutka-Malen et al.<sup>122,123</sup>. Da in dem Protokoll von Patel et al.<sup>124</sup> die Banden für die Gene vanA und vanB auf derselben Höhe sind, wurden die Primer von Dutka-Malen et al.<sup>122,123</sup> für das vanB-Gen benutzt. Dadurch ergab sich eine Verteilung der Banden, die ohne weitere Methoden unterscheidbar waren. Die Untersuchung wurde als Multiplex-PCR durchgeführt. Anhand der Kontrollstäme und auch im Rahmen eines Ring-Versuches, durchgeführt vom Nationalen Referenzzentrum für Enterokokken in Wernigerode, zeigte sich, dass die Kombination der Primer einsetzbar ist. Das Protokoll von Dutka-Malen et al. wurde auch zur Identifizierung von Resistenzgenen direkt aus dem Stuhl bereits eingesetzt<sup>109</sup>.

### 5.1.3 Methoden für die Persistenz

#### Methode der Typisierung mit PCR

Zur Identifizierung der Stämme unter den *E. faecium*-Isolaten wurde eine Zufalls-PCR durchgeführt. Diese Methode wird auch als random amplified polymorphic DNA (RAPD) oder arbitrarily primed PCR (AP-PCR) bzw. DAF (DNA amplified fingerprint) bezeichnet. In den letzten Jahren sind sehr viele Publikationen zu dem Thema der Typisierung veröffentlicht worden, und etwa in der Hälfte dieser Veröffentlichungen wurde die Zufalls-PCR benutzt<sup>166</sup>. Zwei Übersichtsarbeiten über die Methode sind in den letzten Jahren veröffentlicht worden<sup>167,168</sup>, die in ihren Diskussionen zu unterschiedlichen Ergebnissen in bezug auf die Einsatzmöglichkeiten der Zufalls-PCR kommen. Kritisiert wird an der Methode der Zufalls-PCR die mangelnde Reproduzierbarkeit und hier insbesondere im Vergleich zwischen Laboren<sup>169,170</sup>. Während Power<sup>168</sup> in der Methode Chancen in der Zukunft sieht, raten Tyler et al.<sup>167</sup> eher zur Verwendung der REP-PCR. Van Belkum<sup>166</sup>, der diese beiden Übersichtsarbeiten kommentiert, weist darauf hin, dass jede Methode und deren Einsatz davon abhängt, was damit untersucht werden soll, sowie von materiellen und personellen Ressourcen.

Mehrere Studien haben die Methode zur Typisierung von Enterokokken eingesetzt<sup>41,118,128,171</sup>. Diese Methode der Typisierung ist besonders anfällig für Variationen im Versuchsansatz, wie der Ionenkonzentration, Pufferkonzentration, der Reaktionstemperatur und der benutzten Polymerase<sup>129,167,170,172-174</sup>. Diese Anfälligkeit führt zu einer geringen Reproduzierbarkeit der Banden bei gleichen Isolaten in unterschiedlichen Untersuchungen<sup>175</sup>. Diese Methode kann daher nicht genutzt werden, um Fingerprints aus verschiedenen Laboren zu vergleichen. Allerdings wurde in der Untersuchung von van Belkum et al.<sup>170</sup>, die *Staphylococcus*-Isolate mit der Zufalls-PCR in verschiedenen Laboren untersuchen ließen, von den Laboren die gleiche Cluster-Zugehörigkeit der Isolate gefunden, auch wenn die einzelnen Fingerprints nicht vergleichbar waren<sup>170</sup>.

Zur Reduzierung dieser Problematik wird empfohlen, die Reaktionen so standardisiert wie möglich durchzuführen und die zu vergleichenden Isolate möglichst im selben Ansatz zu testen<sup>131,167</sup>. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung der standardisierten Ready To Go RAPD-beads erreicht. Durch die Verwendung dieser vorgefertigten Reaktionsgefäße, die außer der DNA, dem Primer und Wasser schon alle Reagenzien enthalten, verringert man mögliche

Fehler beim Pipettieren. Puffer, Polymerase und Temperatur der PCR-Reaktionen wurden über die gesamte Untersuchung gleich gehalten. Isolate eines Patienten wurden im gleichen PCR-Ansatz untersucht. Weiterhin wurden alle Isolate mit zwei verschiedenen Primern untersucht und die Ergebnisse in der Auswertung kombiniert.

#### Methode zur Auswertung der Fingerprints

Zur Auswertung der Fingerprints gibt es zwei Methoden: der Vergleich mit dem Auge und der Vergleich mit Hilfe einer Software. Beide Methoden benötigen die Visualisierung der Fingerprints durch ein Photo, digitalisiert oder auf Papier. Bei der Auswertung von Fingerprints auf einem Gel ergeben sich kaum Probleme, aber bei Vergleich von verschiedenen Gelen können durch unterschiedliche Färbungen Banden besser oder schlechter zu sehen sein. Bei der Auswertung der Gele mit dem Auge ist die Interpretation vom Untersucher abhängig. Mit der Software durchgeführte Vergleiche benötigen Einstellungen, welche Banden noch als Banden gezählt werden. Bei der von uns durchgeführten Untersuchung wurden alle Vergleiche nur von mir selbst durchgeführt. Die Einstellungen zur Einlesung der Gele wurden über die gesamte Untersuchung beibehalten und das Einlesen der Gele immer selbst durchgeführt, um eine Untersuchervariation zu vermeiden.

Neben den Problemen des Vorhandenseins und Visualisierens von Banden ist auch nicht bekannt, wie viele verschiedene Banden nötig sind, um einen Stamm von einem anderen zu unterscheiden. Bisher gibt es keine festgelegte oder empfohlene Vorgehensweise zur Auswertung von PCR-Fingerprints<sup>167</sup>. Durch die Benutzung der GelCompare Software lassen sich Dendrogramme der Fingerprints erstellen, die durch die Clusteranalyse angeben, in wie weit die Korrelation zwischen den Fingerprints in Prozent übereinstimmt. Dabei stellt sich die Frage, ab welchem Prozentsatz von Übereinstimmung man von einem Stamm sprechen kann, bzw. ab wann ein Cluster nicht mehr zum selben Stamm zu zählen ist. Wir haben in dieser Arbeit Isolate als ein Stamm gewertet, wenn eine Übereinstimmung von 90% mit einem Primer und gleichzeitiger Übereinstimmung von mindestens 80% mit dem zweiten Primer vorhanden war. Bei im Schnitt 7-10 Banden pro Fingerprint wird mit diesem Verfahren das Fehlen von einer bis zwei Banden toleriert. Dieses Verfahren wurde aus den Empfehlungen zur Interpretation von Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE)-Mustern von Tenover abgeleitet<sup>176</sup>. Die Übereinstimmung von 90% ist



als eher konservativ anzusehen, dies kann dazu führen, dass die wahre Zahl der identischen Stämme unterschätzt wurde.

#### 5.1.4 Statistische Methoden

Die Untersuchung entsprach wiederholten Querschnittstudien bei denselben Personen. Die Abgrenzung zu einer Kohortenstudie ist schwierig. Bei einer Kohortenstudie verfolgt man eine Gruppe von Personen über einen gewissen Zeitraum und beobachtet das Eintreten z.B. einer Erkrankung. Bei unserer Untersuchung wurde die Besiedlung mit Bakterien oder Stämmen von Bakterien untersucht, da das Eintreten des Ereignisses nur beobachtet werden kann, wenn auch ein Abstrich entnommen worden ist, dies entspricht nicht einer klassischen Kohortenstudie. Bei Querschnittstudien wird das Odds Ratio als Maß der Assoziation benutzt. Bei einer Assoziation, die nicht gefunden wird, muss immer die Studienpower dazu betrachtet werden. Dabei bedeutet die Power, mit welcher Sicherheit man eine tatsächlich vorhandene Assoziation auch findet. In den meisten Studien wird diese bei der Berechnung der Studienteilnehmerzahl mit 80% angesetzt. Die Power ist neben der Teilnehmerzahl auch von dem Odds Ratio abhängig, das man in der Studie entdecken will, und von der Häufigkeit der Exposition unter den Probanden, die in unserem Fall keinen Spezies-Nachweis haben. Bei den hier vorliegenden Zahlen wäre ein OR von 3 mit einer Power von 80% nachzuweisen gewesen. Ein OR von 1,5 z.B. kann nur noch mit einer Power von 20% angegeben werden.

Bei der hier nicht gefundenen Odds Ratio kann also nicht sicher gesagt werden, ob nicht doch noch ein kleines Risiko gefunden worden wäre, wenn mehr Probanden in die Studie eingeschlossen worden wären.

## 5.2 **Diskussion der Ergebnisse**

### 5.2.1 Prävalenz von Resistenzgenen

#### Ergebnisse der Speziesidentifikation

In der Literatur wird angegeben, dass etwa 97% der Menschen Enterokokken im Darm tragen<sup>18-20,177-179</sup>. Teilweise werden davon aber auch sehr abweichende Zahlen gefunden. So fanden Silverman et al.<sup>180</sup> unter 200 Probanden nur bei 107 Enterokokken. Bei den Studien, die eine

Speziesidentifizierung durchgeführt haben, wird *E. faecalis* am häufigsten gefunden<sup>18-20</sup>. Nobel et al.<sup>20</sup> fanden unter Erwachsenen *E. faecalis* in 59% und *E. faecium* in 38%. Eine Untersuchung auf *E. gallinarum* und *E. casseliflavus/E. flavescens* war nicht durchgeführt worden. In der Untersuchung von Enzensberger et al.<sup>19</sup> wurde *E. faecalis* in 21 der 22 untersuchten Personen gefunden und *E. faecium* in neun der 22 Personen, auch hier wurde *E. gallinarum* oder *E. casseliflavus/E. flavescens* nicht bestimmt. In der phänotypisch durchgeführten Speziesbestimmung von Silverman, waren 68% *E. faecalis*, 24% *E. faecium* und 4% *E. gallinarum*.

Toye et al.<sup>150,151</sup> untersuchten die Verteilung von vanC-Gen tragenden Enterokokken bei 679 Patienten und fanden bei 82 vanC-Gen tragenden Enterokokken, dies entsprach 12%. Davon waren 6,3% vanC1-Gen tragende *E. gallinarum* und 5,7% vanC2/3-Gen tragend. In einer französischen Untersuchung von Gambarotto et al.<sup>68</sup>, die Krankenhauspatienten und Personen außerhalb des Krankenhauses untersuchten, fanden unter den isolierten VRE 70,7% *E. gallinarum*, 10,8% *E. casseliflavus* und 18,5% *E. faecium*. Nourse et al.<sup>181</sup> fanden unter hospitalisierten Kindern einer onkologischen Station 2,5% vanC-Gen tragenden Enterokokken.

Interessant war die Untersuchung von van den Braak et al.<sup>84</sup>, die eine deutlich höhere Besiedlung mit vanC-Gen tragenden Enterokokken bei Vegetariern im Vergleich zu fleischessenden Vergleichspersonen fanden.

Unsere Ergebnisse für die Besiedlung mit *E. faecalis* und *E. faecium* liegen somit in den beschriebenen Häufigkeiten. Die Besiedlung mit *E. casseliflavus/E. flavescens* scheint in unserem Kollektiv häufiger zu sein. Insbesondere, dass *E. casseliflavus/E. flavescens* häufiger gefunden wurde als *E. gallinarum*, scheint eine Besonderheit zu sein.

Für die Beurteilung der Bedeutung einer Spezies für Infektionen ist es wichtig, die Speziesverteilung unter klinischen Isolaten zu kennen. In klinischen Isolaten werden am häufigsten *E. faecalis* isoliert. Im NNIS-System (National Nosocomial Infections Surveillance-System), das seit den 70er Jahren nosokomiale Infektionen in den USA erfasst, werden Enterokokken an dritter Stelle der verantwortlichen Keime genannt<sup>27</sup>. Dabei sind unter den Enterokokken 90% *E. faecalis* und 10% *E. faecium*. Andere Enterokokken Spezies werden in dieser Statistik nicht erwähnt. In Belgien wurden in einer Untersuchung an klinischen Enterokokken-Isolate von 16 beteiligten Laboren *E. faecalis* in 89,4%, *E. faecium* in 9,1% und

andere Enterokokken Spezies in 1,5% identifiziert <sup>182</sup>. Eine Studie, die 4208 klinische Enterokokken-Isolate aus 27 Ländern Europas untersuchte, fand 83% *E. faecalis*-Isolate, 13,6% *E. faecium*-Isolate und 3,4% Isolate anderer Spezies <sup>183</sup>. Eine deutsche Untersuchung, von Kaufhold et al. <sup>32</sup> an 315 Isolaten wies *E. faecalis* in 87,3%, *E. faecium* in 9,2% *E. gallinarum* in 1% und *E. casseliflavus* in 0,3% nach. Eine weitere Untersuchung, die klinische Isolate von 100 deutschen Kliniken untersuchte, fand eine ähnliche Verteilung der Spezies in diesen Isolaten. *E. faecalis* wurden in 88,8%, *E. faecium* 9,9% und *E. casseliflavus* in 0,5% dieser klinischen Isolaten identifiziert <sup>184</sup>. Insgesamt wurden vanC-Gen tragende Enterokokken selten in klinischen Isolaten gefunden. So fanden Ruoff et al. <sup>185</sup> in 2% der klinischen Enterokokken-Isolate das vanC-Gen und Gordon et al. <sup>30</sup> in 1,1% der Isolate.

Trotz der oben genannten relativ seltenen Isolierung von vanC-Gen tragenden Enterokokken in klinischen Isolaten wurden schwere Infektionen mit diesen Spezies mehrfach beschrieben <sup>13,31,186</sup>. Zusätzlich wird sehr häufig von Missklassifikationen gerade dieser Spezies berichtet <sup>15,137,140,144-153</sup>. Es bleibt daher die Frage, ob nicht vielleicht doch mehr vanC-Gen tragende Enterokokken auch für klinische Infektionen verantwortlich sind.

VanC-Gen tragende Enterokokken konnten wir bei unseren Probanden sehr häufig nachweisen. Insbesondere der hohe Anteil an Besiedlung mit *E. casseliflavus*/*E. flavescens* fiel auf. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist schwierig einzuschätzen. Bisher wurde mit vanC-Gen tragenden Enterokokken nur ein Ausbruch mit *E. gallinarum* beschrieben <sup>28</sup>. In den meisten Veröffentlichungen werden keine speziellen Kontrollmaßnahmen bei Patienten mit vanC-Gen tragenden Enterokokken gefordert <sup>138,139,150,151,187</sup>. Da die *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, *E. gallinarum* und auch *E. durans* häufig missklassifiziert werden, sollte es vor allem das Ziel sein, diese Spezies in den Laboren zu identifizieren, um das tatsächliche Ausmaß der Bedeutung einschätzen zu können.

### Ergebnisse der Resistenzgenachweise

International sind mittlerweile verschiedene Untersuchungen bekannt, die das Vorhandensein von VRE bei gesunden Probanden untersucht haben. Wie bereits erwähnt, wurden in Europa bei Gesunden VRE häufig nachgewiesen, während dies in den USA selten war.

Bei dem Vergleich von Studien zur Besiedlung mit VRE wird deutlich, dass verschiedene Methoden auch sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielen. Wichtig ist zu beachten, dass teilweise

alle Resistenzgen tragenden Enterokokken als VRE gewertet werden und somit die intrinsisch resistenten Enterokokken, *E. casseliflavus*/*E. flavescens* und *E. gallinarum*, mit gezählt werden, während andere Studien, nur phänotypisch resistente Stämme als VRE werten.

Aus verschiedenen Ländern liegen Untersuchungen zur VRE-Besiedlung bei Gesunden bzw. bei Patienten bei Aufnahme ins Krankenhaus vor. So fanden Nourse et al. in Dublin bei gesunden Kindern keine VRE<sup>181</sup>. Gambarotto et al.<sup>68</sup> fanden in Frankreich unter gesunden Probanden 11,8% VRE, davon waren allerdings 70% *E. gallinarum*. Taylor et al.<sup>188</sup> fanden in 2,3% nicht hospitalisierter Probanden in Manchester VRE, davon waren 91% vanA-Gen tragende *E. faecium*. Andere Untersuchungen aus den USA hatten unter gesunden Probanden keine Träger von VRE gefunden<sup>189,190</sup>. Auch in einer weiteren Untersuchung in den USA bei Hochrisiko-Patienten einer pädiatrischen Station wurden keine Patienten mit VRE gefunden<sup>191</sup>, wobei in der Untersuchung von Silvermann et al.<sup>180</sup>, der 200 Patienten bei Aufnahme ins Krankenhaus untersuchte, drei Patienten mit *E. gallinarum* besiedelt waren. In der Auswertung des NNIS-System 1999, in der zum ersten Mal aus 59 ambulanten Versorgungseinrichtungen Daten ausgewertet wurden, wird die Anzahl der VRE unter den isolierten Enterokokken mit 3,6% angegeben<sup>27</sup>.

1998 wurden in Berlin Patienten im Krankenhaus auf einer Normalstation und auf einer Intensivstation, Personen aus einem Altersheim und Studenten auf VRE untersucht<sup>70</sup>. Dabei fanden sich unter den untersuchten Studenten 0,9% mit VRE besiedelt, 4,2% unter den Altersheimbewohnern, 1,8% unter den Patienten auf einer normalen Station, aber 16,3% unter denen auf der Intensivstation. In Sachsen-Anhalt zeigte sich eine Reduktion der VRE-Prävalenz<sup>100</sup>. So waren 1994 12% der Probanden mit VRE besiedelt, 1996 6% und 1997 nur noch 3%.

Wir fanden bei den untersuchten Enterokokken 109 *E. faecium*-Isolate mit vanA-Gen. In der gesamten Untersuchungszeit wiesen 33% der Probanden mindestens ein *E. faecium* mit vanA-Resistenz-Gen auf. Betrachtet man die Monate einzeln, wurde im Durchschnitt pro Monat bei 7% der Probanden *E. faecium* mit vanA-Gen nachgewiesen. Die Prävalenz pro Monat ist bei unseren Probanden also eher hoch.

Wiederum ist es für die Beurteilung der klinischen Bedeutung wichtig, die Verteilung der Vancomycin-Resistenz unter den klinischen Isolaten zu kennen. Der Anteil der Vancomycin resistenten Stämme unter den Enterokokken, die nosokomiale Infektionen verursachten, stieg in

den USA von 0,3% 1989 auf 7,9% 1993, auf 23,9% 1998 und auf 25,2% 1999<sup>27,63</sup>. Bei einer weiteren Studie aus den USA, an der 41 Krankenhäuser beteiligt sind, die nur die Erreger von Sepsisfällen ausgewertet hat, standen die Enterokokken an dritter Stelle der Sepsis verursachenden Keime. Der Anteil der Vancomycin resistenten Enterokokken unter den Sepsis verursachenden Keimen wurde mit 36,4% angegeben, dabei schwankte dieser Anteil von 11,6-60,9 % in den beteiligten Instituten<sup>192</sup>.

In Europa hingegen ist der Anteil der Vancomycin-resistenten Enterokokken bei klinischen Isolaten niedriger. In einer europaweiten Studie, die 4208 klinische Isolate aus 27 Ländern untersuchte, wurden Vancomycin Resistenzen bei 3,8% der *E. faecium*-Isolaten gefunden<sup>183</sup>. In einer deutschen Studie mit 2046 Enterokokken-Isolaten aus verschiedenen Laboren waren in diesen klinischen Isolaten 0,6% mit Vancomycin-Resistenz<sup>33</sup>.

Nach den amerikanischen Empfehlungen zur Prävention der Vancomycin-Resistenz sollen Patienten mit einem Vancomycin-resistenten *Enterococcus* isoliert werden<sup>193</sup>. Bei einer so hohen Besiedlungsrate unter Gesunden, wie sie bei uns gefunden wurde, auf der einen Seite und dem noch sehr geringen Anteil an VRE unter den klinischen Isolaten auf der anderen Seite scheint dieses Vorgehen zumindest fraglich.

#### Bedeutung der Vancomycin-Konzentration in den Nährmedien

Zur Identifizierung der vanA- und vanB-Gen resistenten Enterokokken wurden die Abstriche auf Nährmedien mit Zusatz von Vancomycin durchgeführt. In den ersten drei Monaten der Studie wurden neben dem Enterococcosel-Agar mit 16 µg/ml Vancomycin auch Enterococcosel-Agar mit 4 µg/ml Vancomycin benutzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Nährmedium mit 16 µg/ml Vancomycin selektiver für die Isolation von vanA-Gen tragenden Enterokokken ist, als das mit 4 µg/ml. Bis auf einen Probanden, wurden alle Probanden mit einem vanA-Gen tragenden *Enterococcus* auf dem Nährmedium mit 16 µg/ml Vancomycin identifiziert. Der Enterococcosel-Agar mit 4 µg/ml Vancomycin wurde allerdings nur in den ersten Monaten der Untersuchung parallel benutzt, so dass eventuell noch weitere Probanden positiv gefunden worden wären. Die Isolation von *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*/*E. flavescens* hingegen, ist auf dem Enterococcosel-Agar mit 16 µg/ml Vancomycin durch ihre nur intermediäre Resistenz gegen Vancomycin geringer.

International sind viele verschiedene Medien zur Identifizierung von VRE benutzt worden, bisher wurde das ideale Medium noch nicht identifiziert<sup>190</sup>. Teilweise wurden verschiedene Medien verglichen, eine abschließende Beurteilung über das ideale Medium kann allerdings mit den vorliegenden Arbeiten nicht getroffen werden. Abhängig ist die Entscheidung neben der Selektivität und Spezifität der Medien auch von den Kosten und der Häufigkeit der zu findenden VRE. Von dem amerikanischen Hospital Infection Program wurde eine standardisierte Screeningmethode zur Isolierung von VRE empfohlen. Darin wird als Screeningmedium BHI (brain-heart-infusion) Agar mit 6 µg/ml Vancomycin-Zusatz vorgeschlagen<sup>194</sup>. Bei vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Medien zeigte auch Gallensäure-Äsculin-Agar mit 6 µg/ml und Enterococcosel Brühe bzw. Agar mit 6 µg/ml Vancomycin gute Ergebnisse<sup>138,141,190,195</sup>. Nach den Erfahrungen mit einem Ausbruch von vanB-Gen tragenden *E. faecium* spricht sich Boyce gegen die Verwendung von Agarplatten mit weniger als 8 µg/ml Vancomycin für die Identifikation von VRE aus<sup>36</sup>. Wendt et al.<sup>142</sup> hingegen fanden für die Diagnostik von VRE mit einer 16 µg/ml Vancomycin-Konzentration ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Welche Agarplatten mit welchem Zusatz benutzt werden, sollte davon abhängig gemacht werden, welche Konsequenzen aus der Identifizierung der unterschiedlichen VRE gezogen werden. Bei Benutzung von niedrigeren Vancomycin-Zusätzen werden zumindest häufiger *E. gallinarum* und *E. casseliflavus/E flavescens* gefunden. Dies konnten wir auch in unserer Untersuchung zeigen.

#### Vergleich phänotypischer Nachweis und genotypischer Nachweis der Resistenzen

Vergleicht man die Spezifität der PCR-Methode zum Nachweis der Resistenz mit den phänotypischen Methoden, scheint die molekularbiologische Methode etwas sicherer zu sein. Auch international wird immer häufiger die Untersuchungen der Vancomycin-Resistenz mit der PCR durchgeführt und empfohlen<sup>196</sup>. Betrachtet man zusätzlich den Zeitaufwand für die PCR und die phänotypischen Methoden sowie die Kosten, so ist nach einer Untersuchung aus Kanada die PCR billiger und schneller<sup>197</sup>. Auch das Laboratory of Hospital Infection in London hat nach einem Vergleich der Methoden auf die molekularbiologische Methode umgestellt<sup>198</sup>.

Unsere Studie konnte zeigen, dass die PCR-Untersuchung zur Speziesidentifikation und Resistenz-Bestimmung der phänotypischen überlegen ist. Es sollte überlegt werden, ob die PCR-

Methode zur Identifizierung von Vancomycin resistenten Enterokokken in der Routine eingesetzt werden sollte.

#### Beurteilung möglicher Assoziationen der Expositionen für die Besiedlung

Wir haben für die verschiedenen Besiedlungen mit einer Spezies bzw. Resistenzgenen den Einfluss einiger Expositionen ausgewertet. Für die betrachteten Charakteristika Alter, Geschlecht und die Zugehörigkeit zum Institut konnten wir keine Assoziation finden. Wie bereits in der Diskussion der Methoden 5.1.4 erläutert wurde, könnte dies auch an einer zu kleinen Teilnehmerzahl liegen. Wichtig ist die Beobachtung, dass die Zugehörigkeit zum Institut keine Assoziation für die Besiedlung darstellt. Somit kann eher ein Rückschluss auch auf die normale Bevölkerung gezogen werden.

#### 5.2.2 Persistenz der *E. faecium* Stämme

In der Literatur ist bisher nur die Persistenz von Vancomycin resistenten Enterokokken untersucht worden. Dabei scheint es verschiedene Besiedlungsmuster zu geben. Einige Personen haben eine kurzzeitige bzw. mittelfristige Besiedlung mit VRE, andere eine längerfristig mit ein und demselben Stamm und eine weitere Gruppe mit verschiedenen Stämmen<sup>110</sup>. Martone<sup>71</sup> hat in einer Übersichtsarbeit die bisherigen Berichte von VRE-Persistenzen zusammengestellt. Dabei wurden in den sechs zitierten Untersuchungen Persistenzen der VRE zwischen drei Monaten und zwei Jahren angegeben, jeweils die längste Besiedlungsdauer wurde hier gewertet. Teilweise wurde bei diesen Untersuchungen allerdings der wiederholte Nachweis von VRE als Persistenz gewertet. In unserer Untersuchung fanden wir einen vanA-Gen Stamm über eine Zeitspanne von sechs Monaten, dabei wurde der Stamm bei diesem Probanden in drei der sechs Untersuchungsmonate gefunden.

Auf der anderen Seite gibt es Berichte von verschiedenen VRE-Klonen auch bei einem Patienten. In einem Ausbruch in Taiwan wurden bei 12 Patienten 25 verschiedene VRE-Stämme identifiziert<sup>199</sup>. Bei zwei Patienten eines Altersheimes in den USA wurden sieben verschiedene vanA-Gen *E. faecium*-Stämme identifiziert<sup>111</sup>. Auf einer Intensivstation in den USA wurden bei sechs Patienten mehr als ein VRE-Stamm nachgewiesen<sup>113</sup>. Eine weitere Untersuchung der Stämme während eines Ausbruches konnte zum einen den klonalen Ausbruchstamm nachweisen, aber teilweise zusätzlich einen anderen Stamm bei denselben Personen<sup>112</sup>. Bingen et al.<sup>200</sup>

untersuchte VRE, die im Kinderkrankenhaus in Paris isoliert worden waren, und fand 16 verschiedene Stämme. Eine weitere Studie aus Frankreich untersuchte die Besiedlung mit VRE bei Patienten auf 24 Intensivstationen im Juni 1994 <sup>201</sup>. Die Untersucher fanden dabei 13 Patienten mit VRE, die alle einen anderen Stamm hatten.

Die genetische Verwandtschaft eines sensiblen *E. faecium*-Isolates mit einem vanA-Gen tragenden *E. faecium* wurde in einer Untersuchung in Finnland beschrieben. Dort fand man einen endemischen sensiblen *E. faecium*-Stamm mit gleichem PFGE -Muster, wie der Ausbruchsstamm mit vanA-Gen und teilweise zusätzlich vanB-Gen <sup>202</sup>.

Der Vergleich der Stämme zwischen den Probanden kann nur sehr eingeschränkt beurteilt werden. Wir fanden trotzdem einen *E. faecium* ohne Resistenzgenachweis bei zwei Probanden aus einer Familie und zwei vanA-Gen tragende *E. faecium*-Stämme, die bei Personen nachgewiesen wurden, die nicht miteinander in Verbindung standen. In der Inzidenzuntersuchung <sup>114</sup>, die einige vanA-Gen tragende *E. faecium* mit Hilfe der PFGE verglichen hatte, konnte ebenfalls ein Stamm bei verschiedenen Probanden nachgewiesen werden.

Da wir verschiedene vanA-Gen tragende *E. faecium* Stämme bei ein und derselben Person finden konnten, sowie Stämme mit und ohne vanA-Gen, kann man die Hypothese aufstellen, dass das vanA-Gen unter den *E. faecium* Isolaten übertragen wurde. Ausserdem haben wir Stämme bei verschiedenen Personen gefunden, was für eine Übertragung zwischen Personen spricht. Welche Ausbreitung häufiger und für Patienten schwer wiegender ist, bleibt zu evaluieren. In Ausbrüchen wurden bisher vor allem die Ausbreitung von ein und demselben Stamm auf verschiedene Patienten beobachtet und untersucht <sup>36,37,42,43,47,74,101,201-204</sup>.

### **5.3 Bedeutung der Ergebnisse**

#### Prävalenz von Resistenzgenen

Wir konnten keine phänotypisch sensiblen *E. faecium* nachweisen, die gleichzeitig ein Resistenzgen trugen. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung, dass die Probanden häufig mit intrinsisch resistenten *E. casseliflavus*/*E. flavescens* besiedelt waren. Auch zeigte sich, dass die Sensitivität der PCR-Methode zur Identifizierung von VRE besser ist als der phänotypische Nachweis.



### Persistenz von *E. faecium*

Die Frage, wie lange *E. faecium* bei gesunden Probanden nachgewiesen werden können, ist nur eingeschränkt zu beantworten, da die Anzahl der *E. faecium* Isolate pro Monat und Patient nur gering war. Wir konnten zehn Stämme in verschiedenen Monaten isolieren.

Wir haben einige Stämme identifiziert, die sowohl mit als auch ohne vanA-Gen nachgewiesen wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei Gesunden eine Akquirierung bzw. der Verlust von Resistenzgenen möglich ist.

Durch die Typisierung konnten auch verschiedene VRE-Stämme bei einzelnen Probanden nachgewiesen werden. Dies wirft die Frage auf, wie viele Isolate zu untersuchen sind, wenn der Verdacht eines Ausbruches besteht und evaluiert werden soll, ob die Person mit dem Ausbruchstamm besiedelt ist.