

Aus dem **Institut für Hygiene und Umweltmedizin**
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Abschätzung eines Ausbruchs durch *Enterobacter cloacae* auf einer
neonatologischen Intensivstation in Deutschland, 2015**

**Estimation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a
neonatal intensive care unit in Germany, 2015**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gyde Steffen

aus Hamburg

Datum der Promotion:
04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungen und Tabellen	III
Vollständige Bezeichnung der Publikation.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung	1
Abstract	3
Einleitung.....	4
Nosokomiale Infektionen.....	4
Nosokomiale Ausbrüche	4
Typisierungsmethoden bei nosokomialen Ausbrüchen.....	5
Ausgewählte Testverfahren zur Genotypisierung.....	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	8
Nosokomiale Infektionen und Infektionsausbrüche bei Früh- und Neugeborenen.....	9
Hypothese und Zielstellung der Arbeit	10
Methoden.....	11
Ausbruchsbeschreibung.....	11
Setting.....	11
Falldefinition.....	12
Fallsuche.....	13
Umwelt- und Personaluntersuchungen	13
Maßnahmen zur Ausbruchsbekämpfung	13
Mikrobiologische Untersuchungen	14
Epidemiologische Analyse	16
Ethik	16
Ergebnisse.....	17

Verlauf des Ausbruchs	17
Deskription der Ausbruchsfälle	21
Mikrobiologische Ergebnisse	23
Erregernachweis	23
Genotypisierung	23
Diskussion	31
Literaturverzeichnis	37
Eidesstattliche Versicherung	40
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	42
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM).....	43
Publikation: Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S. Overestimation of an Outbreak of Enterobacter cloacae in a Neonatal Intensive Care Unit in Germany, 2015. Pediatr Infect Dis J, 2019 June; 38(6):631-637 doi: 10.1097/INF.0000000000	45
Lebenslauf.....	53
Publikationsliste.....	56
Danksagung	58

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Darstellung geeigneter Methoden zur Genotypisierung von Bakterien (1)

Abbildung 2: Epidemische Kurve zu Fällen mit mikrobiologischem Nachweis von *E. cloacae* auf der NICU zum Zeitpunkt der Einbeziehung des RKI, 24.06.2015 – 05.11.2015

Abbildung 3: Epidemische Kurve zu vorläufigen Fällen mit mikrobiologischem Nachweis von *E. cloacae* nach Ausdehnung der Fallsuche, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Abbildung 4: Epidemische Kurve zu in der AP-PCR bestätigten Fällen, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Abbildung 5: Epidemische Kurve zu in der PFGE und NGS bestätigten Fällen, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Abbildung 6: Abschließende epidemische Kurve aller zum Ausbruch zählenden Fälle, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Abbildung 7: Stufendiagramm zur Eingrenzung aller zum Ausbruch gezählten Fälle durch verschiedene molekulare Typisierungsverfahren, 01.01.2015 – 31.12.2015

Abbildung 8: UPGMA (Unweighted Pair Group Method) clustering des genetischen Zusammenhanges der in der PFGE untersuchten *E. cloacae* Isolate (XbaI Makrorestriktion, PFGE). In grau die ST 815 Ausbruchs isolate der 10 bestätigten Fälle+ ein Umweltisolat aus einem Siphon auf der NICU. Das Dendrogramm wurde mit Bionumerics software (version 7.6.2, parameters tolerance 1.0; optimization 0.5) erstellt. (2)

Abbildung 9: Phylogenetischer Baum (RAxML 7,2,8, GTR GAMMA model, Rapid hill-climbing, 100 starting trees) der *E. cloacae* Isolate auf Grundlage von 3,161 SNP Positionen (150 bp exclusion distance) nach Vergleich der Daten mit Referenz-Sequenzen (NZ_CP008823.1). Ausbruchs isolate sind in grau hervorgehoben. (2)

Tabelle 1: Klinische Daten der Ausbruchsfälle (n = 16; PFGE-/NGS- bestätigte Fälle n = 10), 01.01.2015 - 31.12.2015 (2)

Tabelle 2: Charakteristika der *E. cloacae* Ausbruchsisolate, 1.1.2015-31.12.2015,
(Ampicillin (AMP); Cefotaxim (CTX); Ceftazidim (CAZ); Ciprofloxazin (CIIP); Ertapenem
(ETP); intermediär resistent (I))

Vollständige Bezeichnung der Publikation

Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S.

Overestimation of an Outbreak of *Enterobacter cloacae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Germany, 2015.

The Pediatric Infectious Disease Journal, 2019 June ;38(6):631-637

Doi: 10.1097/INF.0000000000002264

Abkürzungsverzeichnis

AP-PCR	arbitrarily primed PCR
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRGN	Multiresistente gramnegative Erreger
NGS	Next generation-Sequenzierung
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gel-Elektrophorese
RKI	Robert Koch-Institut
SSW	Schwangerschaftswoche
ST	Sequenztyp
UPGMA	Unweighted Pair Group Method

Zusammenfassung

Enterobacter (E.) cloacae spielt als Kommensale, welcher auch nosokomiale Infektionen hervorrufen kann, eine wichtige Rolle auf Intensivstationen. Nosokomiale Ausbrüche unter anderem mit schwerwiegenden Infektionen und Todesfällen werden immer wieder beschrieben.

Durch die Eigenschaften von *E. cloacae*, wie zum Beispiel seiner fakultativen Pathogenität und seinem wandelndem Resistenzmuster innerhalb eines Stammes, kann bei Ausbrüchen die Identifizierung von Ausbruchsfällen erschwert sein. Zur Unterscheidung von Ausbruchs- und koinzidenten Fällen bedarf es daher möglichst spezifischer mikrobiologischer Typisierungsmethoden. Die begrenzte Diskriminierungsfähigkeit einiger Genotypisierungs-Verfahren kann zur Überschätzung der Fallzahl in einem Ausbruch führen, was unter Umständen weitreichende Konsequenzen für alle beteiligten Personen hat.

In dieser Arbeit wird anhand eines Ausbruchs mit *E. cloacae* auf einer neonatologischen Intensivstation (NICU) in Deutschland die Problematik der Eingrenzung von Ausbrüchen mit *E. cloacae* erläutert. Im Fokus steht die Fragestellung nach geeigneten molekularbiologischen Typisierungsverfahren, um im Falle eines fraglichen nosokomialen Ausbruchs mit *E. cloacae* zwischen Ausbruchsstamm und ko-inzidenten *E. cloacae* unterscheiden zu können.

Ende August 2015 wurde auf einer neonatologischen Intensivstation in Deutschland der Verdacht auf einen *E. cloacae* Ausbruch mit zu diesem Zeitpunkt 17 potentiell betroffenen Kindern gestellt. Das Robert Koch-Institut wurde eingeladen, die eingeleitete Ausbruchsuntersuchung zu unterstützen. Es wurde eine ausgedehnte retrospektive und prospektive Fallsuche durchgeführt. Durch Genotypisierung der Isolate aller vorläufigen Fälle mittels Zufalls-geprimter Polymerase-Kettenreaktion (arbitrarily primed PCR, AP-PCR) wurden 23 Fälle auf mehreren Stationen bestätigt. Die Isolate aller in der AP-PCR bestätigten Fälle wurden in der Folge erneut durch Pulsfeld-Gel-Elektrophorese und Ganzgenomsequenzierung genotypisiert. Beide Verfahren bestätigten lediglich (dieselben) zehn Fälle. Dem Ausbruch wurden schließlich diese zehn sowie sechs weitere wahrscheinliche Fälle zugeordnet, für die keine Isolate mehr zur Genotypisierung zur Verfügung standen, die aber einen engen epidemiologischen Zusammenhang zu den bestätigten Fällen aufzeigten. Bei allen anderen Patientinnen und Patienten mit

phänotypischem *E. cloacae* Nachweis und Bestätigung durch AP-PCR fehlte der epidemiologische Link und die Isolate zeigten zum Ausbruchsstamm unterschiedliche Typisierungsergebnisse in PFGE und NGS.

Diese praktische Ausbruchsuntersuchung zeigt, dass die AP-PCR bei Ausbrüchen mit *E. cloacae* nicht ausreichend diskriminiert. Trotz größerem Aufwand und höherer Kosten sind hoch diskriminierende molekulargenetische Vergleichsverfahren wie PFGE oder NGS essentiell, um das wahre Ausmaß von Ausbrüchen mit *E. cloacae* abzuschätzen und die mit einer Überschätzung verbundenen negativen Konsequenzen zu vermeiden.

Abstract

Enterobacter (E.) cloacae is a commensal of the human gastrointestinal tract and an important facultative pathogen responsible for healthcare-associated infections on intensive care units. Healthcare-associated (HA) outbreaks with *E. cloacae* have been reported previously involving fatalities and severe sequelae. The characteristics of *E. cloacae* can complicate the identification of outbreak-associated cases. Therefore, highly discriminating genotyping methods are needed for a clear differentiation of outbreak and non-outbreak isolates, to avoid an overestimation of outbreak-related cases and subsequently negative consequences for affected patients and facilities.

Based on the investigation of an *E. cloacae* outbreak on a neonatal intensive care unit (NICU) in Germany difficulties in the case search within HA outbreaks will be analysed in this work. The focus is on adequate genotyping methods to discriminate between cases and non-cases.

In August 2015 a cluster of neonates with *E. cloacae* complex colonisation was identified in a NICU of a tertiary care hospital in Germany and the Robert Koch Institute was invited to support the outbreak investigation. To identify all outbreak-related cases a comprehensive retrospective and prospective case search was conducted. The isolates of all potential cases were initially genotyped by arbitrarily primed PCR (AP-PCR), resulting in 23 confirmed cases with isolates belonging to the outbreak strain. Because of implausible epidemiological links between the confirmed cases, the isolates of all AP-PCR confirmed cases were additionally genotyped by pulsed-field gel electrophoresis and whole genome sequencing. Both confirmed only ten cases to belong to the outbreak. Finally, these 10 confirmed cases plus six probable cases without isolates available for genotyping but with a clear epidemiological link in place and time were attributed to the outbreak. For all other patients with phenotypical *E. cloacae spp. dissolvens* detection a clear epidemiological link to confirmed cases was missing and isolates were assigned to non-outbreak related *E. cloacae* strains by PFGE/NGS.

This outbreak investigation highlights the insufficient discriminatory power of AP-PCR in *E. cloacae* outbreaks. Despite higher costs and expenses highly discriminating genotyping methods like PFGE and NGS are essential to reveal the true extension of *E. cloacae* outbreaks and to prevent further harm related to outbreak overestimation.

Einleitung

Nosokomiale Infektionen

Im Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) wird eine nosokomiale Infektion als eine „(...) Infektion mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen als Reaktion auf das Vorhandensein von Erregern oder ihrer Toxine, die im zeitlichen Zusammenhang mit einer stationären oder einer ambulanten medizinischen Maßnahme steht, soweit die Infektion nicht bereits vorher bestand, (...)“ (IfSG §2 Abs.8) bezeichnet. Dabei kann das Risiko für eine nosokomiale Infektion in Abhängigkeit von endogenen (Suszeptibilität des Empfängers) und exogenen (Art der medizinischen Maßnahme, z.B. Dauer eines Krankenhausaufenthaltes) Faktoren variieren. Besonders gefährdet sind Patienten in intensivmedizinischer Behandlung, sehr alte oder sehr junge Patienten, Patienten mit schweren Grunderkrankungen (z.B. onkologische Patienten) sowie Patienten in intensivmedizinischer Betreuung.

Nosokomiale Ausbrüche

Unter einem nosokomialen Ausbruch nach IfSG versteht man „(...) das Auftreten von zwei oder mehr nosokomialen Infektionen, bei denen ein epidemischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird (...)“ (IfSG §6 Abs. 3). Infektionsquellen nosokomialer Ausbrüche können kontaminierte Oberflächen, (Medizin-) Produkte oder Nahrungsmittel sowie Menschen (Patienten, Angehörige, Personal) sein. Die weitere Übertragung des Ausbruchserregers erfolgt dann entweder als punktuell über die Infektionsquelle oder kontinuierlich über die unbelebte Umgebung oder als Mensch- zu-Mensch Übertragung. Die Mensch-zu Mensch Übertragung kann dabei entweder direkt über Träger des Ausbruchserregers oder durch Kreuz-Kontaminationen (z.B. vorübergehend kontaminierte Hände) erfolgen.

Die systematische Untersuchung nosokomialer Ausbrüche folgt mehreren Arbeitsschritten, die teilweise parallel ablaufen (3). Der Verdacht auf einen nosokomialen Ausbruch besteht wenn Erregernachweise oder Anzahl der Infektionen über dem endemischen Niveau liegen. Nach entsprechender Vorbereitung (Bildung eines Ausbruchsteams, Ortsbegehung, Hintergrundrecherche) erfolgen die Bestätigung des Ausbruchsgeschehens und die Suche nach dem Ausbruch zugehörigen Fällen. Die Ausbruchsbestätigung erfolgt durch den Nachweis eines epidemiologischen

Zusammenhangs (zeitlich und örtlich) der fraglichen Fälle und der genetischen Verwandtschaft der assoziierten Isolate. Für die Fallsuche wird zunächst eine Falldefinition erstellt, die relevante Gemeinsamkeiten der fraglichen Fälle in Betracht zieht. Auf der Grundlage der Falldefinition erfolgen die retrospektive und prospektive Fallsuche. Dabei erfolgt in der Regel:

1. die Suche nach möglichen Fällen in klinikeigenen Datenbanken
2. eine mikrobiologische Testung aller Personen, die einen klinischen Verdacht auf eine Infektion mit dem Ausbruchserreger aufweisen
3. Insbesondere bei Ausbrüchen durch Infektionserreger die nur bei wenigen Patienten zu klinischen Infektionen führen (wie auch bei Ausbrüchen mit Kommensalen) sollte ein mikrobiologisches Screening von Personen, die in epidemiologischem Zusammenhang zu den Fällen stehen implementiert werden.

Zusätzlich wird in der Regel die unbelebte Umgebung beprobt, um eine gegebenenfalls bestehende Infektionsquelle zu identifizieren. Alle asservierten und neu gewonnenen Proben werden mikrobiologisch auf den Ausbruchserreger hin geprüft und die Zugehörigkeit zum Ausbruchstamm wird getestet. Der epidemiologische Zusammenhang zu bestätigten Fällen wird für jeden möglichen Fall geprüft. Bei Vorliegen eines Verdachts auf einen regionalen Ausbruch wird auch nach möglichen Fällen außerhalb des Krankenhauses gesucht (z.B. Aufnahme-Screening neuer Patienten, Rücksprache mit anderen Krankenhäusern der Region über das zuständige Gesundheitsamt).

Bei Verdacht auf ein Ausbruchsgeschehen sollten bereits Kontrollmaßnahmen zur Eingrenzung des Ausbruchs eingeleitet werden. Im Verlauf müssen die Kontrollmaßnahmen den aktuellen Hypothesen zum Übertragungsweg angepasst werden.

Typisierungsmethoden bei nosokomialen Ausbrüchen

Um die Zugehörigkeit zweier bakterieller Isolate einer Spezies zu einem Stamm zu testen, unterzieht man diese einer Typisierung (1, 4). Neben der phänotypischen Typisierung, z.B. durch Serotypisierung und Erstellung eines Resistogrammes, liegt der Schwerpunkt heute immer mehr auf der Genotypisierung. Mit dieser erfolgt eine molekulargenetische Charakterisierung (Typisierung) des untersuchten Isolats. Es kann zudem eine Vergleichsuntersuchung potentieller Ausbruchsisolate mit Prüfung auf Klonalität erfolgen. Dabei wird zwischen Isolaten, die durch Zellteilung aus einem

Ursprungsisolat entstanden sind und solchen, die nicht molekulargenetisch verwandt sind unterschieden (Diskriminierung). Die Diskriminierungsfähigkeit (auch Test-Spezifität) eines Verfahrens zur Genotypisierung ist die Fähigkeit, epidemiologisch nicht verwandte Stämme als solche zu erkennen. Eine hohe Diskriminierungsfähigkeit ist für genotypisierende Testverfahren im Rahmen von nosokomialen Ausbruchsuntersuchungen essentiell, um bei bestehender epidemiologischer Verbindung zwischen Ausbruchs- Patienten und ko-inzidenten Nachweisen unterscheiden zu können. Es gibt aktuell viele Verfahren zur Genotypisierung bakterieller Isolate, wobei jede Methode Vor- und Nachteile hat. Primäre Kriterien der Bewertung von Typisierungsverfahren sind neben der Diskriminierungsfähigkeit die Typisierbarkeit (Anteil typisierbarer Stämme) sowie die Reproduzierbarkeit (Wiederholbarkeit des Ergebnisses). Zusätzlich spielen Schnelligkeit, Durchführbarkeit und Kosten eine Rolle.

Für die Praxis werden von Li et al. folgende Testverfahren zur Genotypisierung werden empfohlen:

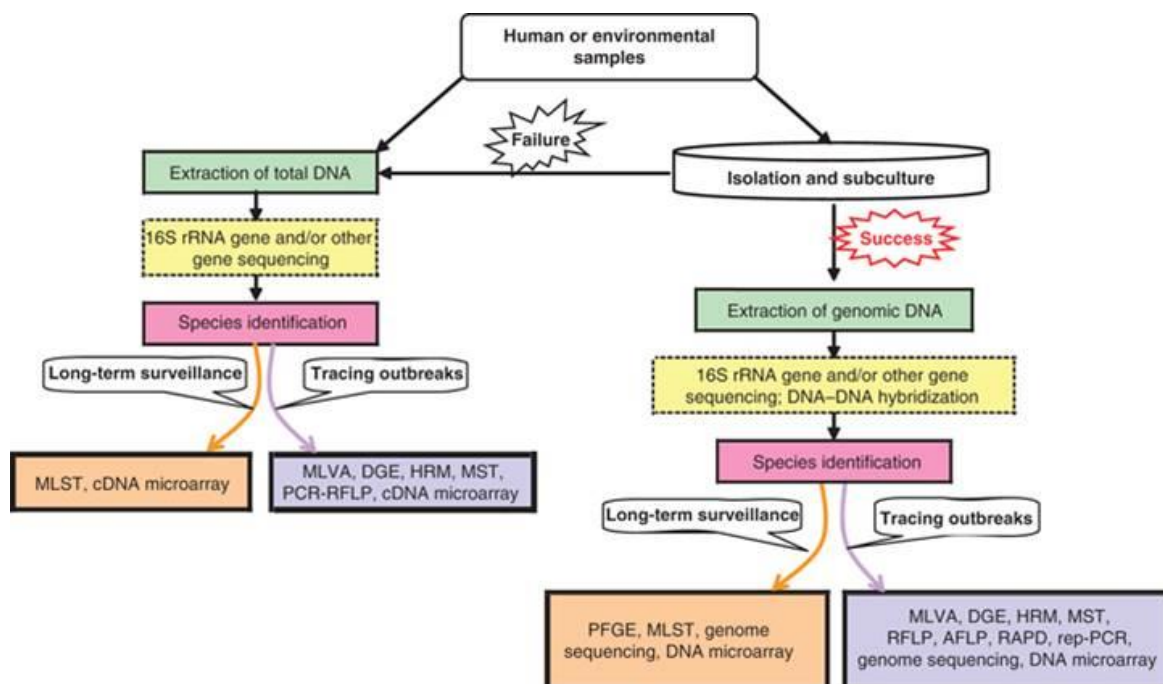


Abb. 1: Darstellung geeigneter Methoden zur Genotypisierung von Bakterien (1)

Ausgewählte Testverfahren zur Genotypisierung

Zufällig geprimte (arbitrarily primed) Polymerase-Kettenreaktion (AP-PCR)

Die AP-PCR (auch als random amplification of polymorphic DNA (RAPD) bezeichnet) beruht auf der Verwendung kurzer ungerichteter Primer, die nicht spezifisch an eine DNA-Sequenz, sondern *zufällig* an verschiedene Bereiche im Genom binden(5). Liegen zwei dieser Bindestellen nahe genug beieinander (0,1-3 kb), wird die entsprechende Sequenz amplifiziert. Die entstehenden Amplifikate eines Isolats können dann in der Gelelektrophorese dargestellt und mit den Amplifikaten anderer Isolate verglichen werden. Die Anzahl und Position der Bindestellen unterscheiden sich nach Grad der genetischen Verwandtschaft der untersuchten Isolate. Die Ergebnisse der AP-PCR sind relativ schwierig zu interpretieren, daher ist die Diskriminierungsfähigkeit begrenzt (4, 6). Zudem wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als schwierig eingestuft. Die AP-PCR ist eine ältere genotypisierende Methode, sie wird aktuell jedoch immer noch vor allem im klinischen Kontext auf regionaler Ebene verwendet, da sie sich durch Schnelligkeit, einfache Durchführbarkeit und geringe Kosten auszeichnet (4, 6, 7).

Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE)

Bei der PFGE werden die zu untersuchenden Bakterien zunächst in Agarose-Gel eingelagert. Dann wird die Zellwand lysiert und die freiwerdende DNA mit einer selten schneidenden Nuklease fragmentiert. Größere DNA-Moleküle müssen sich bei der Wanderung durch die Poren der Gelmatrix entlang der Spannungslinie strukturell mehr verformen als Kleinere. Das pulsartig in verschiedene Richtungen wechselnde Spannungsfeld der PFGE erlaubt kleineren DNS-Fragmenten in der Folge eine schnellere Wanderung durch das Gel, da diese sich schneller umorientieren können. Das fertige Gel kann durch Verwendung eines Markers nach standardisierten Kriterien ausgewertet und mit den Gelen anderer Isolate verglichen werden. Die PFGE zeigt eine hohe Diskriminierungsfähigkeit und Reproduzierbarkeit und ist zurzeit die am häufigsten verwendete Methode zur Genotypisierung in Ausbruchssituationen. Sie ist jedoch relativ aufwendig und kostenintensiv (4, 8, 9).

Next generation-Sequenzierung (NGS)

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Nukleotid-Abfolge der DNA bestimmt. Bei der NGS wird die DNA zunächst fragmentiert, über Primer an eine Platte gebunden und dann in einer PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation werden die komplementären Stränge wieder getrennt. Die entstandenen Sequenz-Cluster werden dann mit Hilfe eines Primers und eines gelabelten Nukleotids sequenziert, durch eine fluoreszierende Markierung entsteht dabei ein messbares Signal. Die NGS ist sehr aufwendig und teuer und kann vor allem aufgrund der aufwendigen Bioinformatik nur in einigen Laboren durchgeführt werden. Die Diskriminierungsfähigkeit ist dafür unter den aufgezählten Verfahren aktuell am höchsten (10).

Enterobacter cloacae

Enterobacter spp. sind fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchenbakterien, die Teil des *Enterobacter cloacae* Komplexes sind (11) und als Kommensale physiologisch die gastrointestinale Flora des Menschen besiedeln. *Enterobacter (E.) cloacae* kann als fakultativ pathogener Erreger Erkrankungen auslösen. Dies kommt zwar selten vor, kann aber durch vorbestehende Risikofaktoren wie z. B. eine Immunsuppression durch Vorerkrankungen, Medikamente, hohes Alter oder Frühgeburtlichkeit begünstigt werden (12, 13). *E. cloacae* sind für 5 - 10% der nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen weltweit verantwortlich (11, 14). Dabei verursachen sie zum Beispiel Pneumonien, Septikämien, Harnwegsinfektionen und Meningitiden.

Enterobacter spp. verfügen über verschiedene Resistenzmechanismen, die über die Expression von β -Lactamasen vermittelt werden. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die β -Lactam-Antibiotika hydrolisieren können. Die Spezies *E. cloacae* besitzt eine intrinsische, durch bestimmte Betalaktame induzierbare AmpC-Betalaktamase. Mutationen in regulatorischen Bereichen können zu einer gesteigerten Expression und damit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation führen. Derartige Stämme können unter Therapie mit Betalaktamen selektioniert werden (14, 15).

Obwohl die meisten nosokomialen Infektionen mit *E. cloacae* endogener Natur sind, kann eine nosokomiale Übertragung von kolonisierten oder infizierten Patient/-innen ausgehen. Dies wurde in der Literatur vor allem auf Stationen der Erwachsenen- und neonatologischen Intensivmedizin beschrieben (16, 17). Die Übertragung erfolgt meist über eine vorübergehende Kontamination der Hände des Pflegepersonals. *E. cloacae*

kann zudem in der unbelebten Umgebung der Patient/-innen überdauern. Es kann daher auch zu einer Übertragung durch kontaminierte Medizinprodukte, Pflegemittel und Medikamente kommen (18, 19). In vielen Fällen wird die Infektionsquelle nicht gefunden. Überbelegung und personelle Unterbesetzung stellen Risikofaktoren für klonale Ausbrüche mit *E. cloacae* dar (16, 20).

Nosokomiale Infektionen und Infektionsausbrüche bei Früh- und Neugeborenen

Intensivmedizinisch betreute Neu- und Frühgeborene haben durch verschiedene endogene und exogene Faktoren ein besonders hohes Risiko für den Erwerb nosokomialer Infektionen (21). Endogene Faktoren liegen dabei z.B. in immunologischen Adaptionsvorgängen direkt nach der Geburt und der Unreife der Haut/Schleimhäute als physiologische Barrieren für Infektionserreger sowie in der Begünstigung von Infektionen durch Komorbidität. Verschiedene Faktoren (z.B. sectio caesara, fehlendes Stillen und direkter Hautkontakt zu den Eltern in den ersten Lebenstagen) auf neonatologischen Intensivstationen können zudem einen Einfluss auf die Kolonisation der gastrointestinalen Flora Neugeborener haben und eine beschleunigte, überproportionale Besiedelung mit bestimmten Kommensalen (z.B. Enterobakterien) fördern. Durch diese können in der Folge in Zusammenhang mit den oben genannten Faktoren Infektionen hervorgerufen werden. Die frühe Kolonisation von Darm und Nasopharynx bei Neugeborenen mit gramnegativen Kommensalen ist auf neonatologischen Intensivstationen (NICU's) verbreitet (22). Vor allem Frühgeborene mit Risikofaktoren wie z. B. niedrigem Gestationsalter, geringem Geburtsgewicht oder längerem Aufenthalt im Krankenhaus sind für eine Infektion empfänglich. In der *Datenbank des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems nosokomialer Infektionen bei Frühgeborenen des Nationalen Referenzzentrums (NEO-KISS)* wurden *Enterobacter spp.* im letzten Referenzbericht von 2017/2018 als fünfthäufigste Erreger für primäre Sepsis genannt (23).

Zu den exogenen Risikofaktoren, die eine nosokomiale Infektion bei Neu- und Frühgeborenen zusätzlich begünstigen können, zählen vor allem die Vielzahl der während eines intensivmedizinischen Aufenthaltes durchgeführten invasiven Prozeduren (z.B. Anlage eines zentralen Venenkatheters, Intubation etc.) Diese Maßnahmen stellen Eintrittspforten für Erreger dar. Nicht zuletzt spielen auch bauliche und personelle Voraussetzungen auf neonatologischen Stationen eine wichtige Rolle in Hinblick auf die Umsetzung der Standardhygiene (21).

Nosokomiale Ausbrüche auf NICU's wurden vielfach in der Literatur beschrieben. Eine systematische Analyse der *worldwide database of health care-associated outbreaks* zählte bis 2005 über 300 Ausbrüche auf NICU's, welche vor allem durch gramnegative Kommensalen (*Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*) und *Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA)* verursacht wurden (24).

Hypothese und Zielstellung der Arbeit

Molekulare Testverfahren zur Genotypisierung nehmen heute einen großen Stellenwert bei Ausbruchsuntersuchungen ein und können einen epidemischen Zusammenhang zwischen möglichen Fällen eindeutig nachweisen. Dies ist bei nosokomialen Ausbrüchen sehr wertvoll, da die epidemiologischen Zusammenhänge zwischen Patienten im Krankenhaus oft schwer durchschaubar sind. Schlecht diskriminierende Typisierungsverfahren können durch die falsche Zuordnung von Isolaten das Ausmaß eines Ausbruchs überschätzen und auf falsche Fährten führen, sowie auch das Vorkommen von Pseudo-Ausbrüchen fördern. Dies kann hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursachen und ist eine Belastung für alle beteiligten Parteien. Auf individueller Ebene bedeutet eine unnötige Isolierung für die betroffenen Patienten zudem häufig auch eine verschlechterte medizinische Versorgung.

Anhand eines aktuellen Beispiels eines Ausbruchs mit *E. cloacae* auf einer neonatologischen Intensivstation soll die Problematik der Einschätzung des Ausmaßes von Ausbrüchen mit *E. cloacae* erläutert und die folgende Fragestellung bearbeitet werden:

Welche der genutzten genotypisierenden Testverfahren sind im Zusammenspiel epidemiologischer und mikrobiologischer Faktoren in der Praxis dazu geeignet, im Falle eines nosokomialen Ausbruchs mit *E. cloacae* zwischen Ausbruchsstamm und ko-inzidenten *E. cloacae* unterscheiden zu können?

Methoden

Ausbruchsbeschreibung

Im vorliegenden Fall kam es zwischen Juni 2015 und Oktober 2015 auf der NICU eines Akutkrankenhauses der Maximalversorgung in Deutschland zu einem Ausbruch mit *E. cloacae* bei insgesamt 16 Kindern. Ende August wurde nach Detektion eines scheinbaren Clusters von mit *E. cloacae* besiedelten Säuglingen ein Ausbruchsteam gebildet. Dem Ausbruch wurden zu diesem Zeitpunkt aufgrund des epidemiologischen Zusammenhanges zunächst 17 Kinder mit mikrobiologischem *E. cloacae* Nachweis auf der NICU zugeordnet. Bei zwei der betroffenen Kinder lagen schwere Infektionen mit Ausbildung von Hirnabszessen vor. Zwischen September und Oktober 2015 wurde die NICU aufgrund des Ausbruchs-Geschehens vorübergehend geschlossen. Nach Wiedereröffnung der Station Ende Oktober kam es erneut zu einem mikrobiologischen *E. cloacae* Nachweis bei einem Kind, welches auf der Station behandelt wurde. Dies führte zu einer Ausweitung der Ausbruchsuntersuchung.

Das Robert Koch-Institut (RKI) wurde am 05.11.2015 vom Ministerium für Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie eingeladen, das verantwortliche Gesundheitsamt bei der Untersuchung des Ausbruchsgeschehens zu unterstützen. Bis zum 31.12.2015 arbeiteten Mitarbeitende des RKI zusammen mit Vertreter/-innen des Krankenhauses, dem die Klinik beratenden Hygieniker, dem zuständigen Gesundheitsamt und der Landesstelle an der Ausbruchsauflärung und orientierten sich dabei an den systematischen Schritten einer Ausbruchsuntersuchung (3). Die Ausbruchsuntersuchung bestand aus retrospektiven und prospektiven Elementen, zudem wurde eine deskriptive Analyse der gesammelten Daten durchgeführt. Regelmäßig fanden Telefonkonferenzen mit dem Ausbruchsteam statt.

Setting

Betroffen war das Perinatal Zentrum eines Krankenhauses der Maximalversorgung mit insgesamt 12 Fachabteilungen und 400 Betten in Deutschland.

Im betroffenen Level 2-Perinatalzentrum wurden im Regelfall Frühgeborene ab 1.250 g und ab der Schwangerschaftswoche 29 +0 behandelt. Es umfasste Betten der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe (Entbindungsstation) und der Kinderklinik inklusive einer NICU mit 13 Behandlungsplätzen. Die NICU erhielt hauptsächlich Zuweisungen aus den klinikeigenen Abteilungen, jedoch auch von extern. Im Jahr 2014

wurden 982 Kinder im Perinatal Zentrum geboren. Auf der NICU wurden 380 (intern und extern geborene) Neugeborene postnatal versorgt, davon 162 in Zusammenhang mit Frühgeburtlichkeit und niedrigem Geburtsgewicht.

Falldefinition

Patienten, die zwischen dem 01.01.2015 und dem 31.12.2015 auf einer Station der Perinatal-Zentrums (NICU, Entbindungsstation, Stationen der Kinderklinik) behandelt wurden, wurden definiert als

- **bestätigte Fälle**, wenn in einer Probe der *E. cloacae* Komplex labordiagnostisch nachgewiesen wurde und die molekulare Typisierung einen Zusammenhang mit anderen Ausbruchsisolaten zeigte,

- **wahrscheinliche Fälle**, wenn in einer Probe der *E. cloacae* Komplex labordiagnostisch nachgewiesen wurde und ein epidemiologischer Zusammenhang (zeitlich und örtlich) mit einem bestätigten Fall bestand, aber kein Isolat für die molekulare Typisierung verfügbar war.

- **vorläufige Fälle**, wenn in einer Probe der *E. cloacae* Komplex labordiagnostisch nachgewiesen wurde, bevor eine molekulare Typisierung der Isolate durchgeführt werden konnte.

Eine **Kolonisation** mit *E. cloacae* wurde definiert als der labordiagnostische Nachweis des *E. cloacae* Komplex ohne das Vorliegen spezifischer klinischer Infektionszeichen.

Eine durch *E. cloacae* verursachte **Sepsis** wurde definiert als Infektion mit dem Nachweis des *E. cloacae* Komplexes in der Blutkultur.

Ein durch *E. cloacae* verursachter **Hirnabszess** wurde definiert als das Vorliegen radiologischer Zeichen für einen Hirnabszess in Zusammenhang mit einer intraoperativen Isolierung von des *E. cloacae* Komplexes.

Andere **Infektionen** mit *E. cloacae* wurden definiert als der labordiagnostische Nachweis des der *E. cloacae* Komplexes in Zusammenhang mit dem Vorliegen spezifischer klinischer Infektionszeichen zusammen mit einer erregerspezifischen Antibiotikatherapie.

Fallsuche

Die prospektive Fallsuche erfolgte mit Hilfe einer Ausweitung des bestehenden mikrobiologischen Screenings auf der NICU ab dem 18.10.2015. Dieses wurde bei Aufnahme und dann fortlaufend zweimal die Woche bei allen Patientinnen und Patienten der NICU sowie einmalig bei deren Eltern mittels Abstrich von Nasen-/Rachen-Raum und Perineum durchgeführt. Auch die Entbindungsstation wurde in das Screening eingeschlossen, um einen dortigen Ausbruch auszuschließen. Nach dem Auftreten von weiteren vorläufigen Fällen auf den zwei Stationen der Kinderklinik erweiterten wir das Screening ab dem 5.11.2015 auch auf diese.

Im Rahmen der retrospektiven Fallsuche sammelten wir in den Dokumentationssystemen des Krankenhauses Informationen zu allen *E. cloacae* positiven Patientinnen und Patienten der Kinderabteilung und auf der Entbindungsstation im Jahr 2015. Zusätzlich wurde die Datenbank im RKI der nationalen Surveillance nosokomialer Ausbrüche in Deutschland durchsucht (25), um einen überregionalen *E. cloacae*-Ausbruch auszuschließen.

Umwelt- und Personaluntersuchungen

Mehr als 200 Umweltproben wurden auf der NICU und der Entbindungsstation gesammelt. Zusätzlich wurde ein Screening der 121 Mitarbeiter (Stuhlproben und/oder perianale Abstriche, nasale Abstriche), die der NICU und dem Kreißsaal im Zeitraum vom 20.08. und 18.10.2015 zugeordnet waren, durchgeführt.

Durch die Mitarbeiter/-innen der Krankenhaushygiene wurden zwischen dem 20.08.2015 und dem 18.10.2015 Umgebungsuntersuchungen auf der NICU und im Kreißsaal durchgeführt. Es erfolgten die Beprobungen von Flächen, Arbeitsmaterialien, Parenteralia und Enteralia. Flächenproben wurden aus Siphons der NICU und des Kreißsaals sowie von den Toiletten auf beiden Stationen entnommen. Zudem erfolgte eine Probenentnahme aus enteralen Medikamenten, vorkonfektionierten Milchpräparaten sowie von bei deren Zubereitung notwendigen Materialien.

Maßnahmen zur Ausbruchsbekämpfung

Das Routinevorgehen des Krankenhauses zur frühen Erkennung und Verhinderung der Übertragung von nosokomialen Erregern auf der NICU richtete sich nach den aktuellen Empfehlungen zu *Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen* und *Prävention nosokomialer Infektionen bei*

neonatologischen Intensivpflegepatienten mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 g der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) (13, 26).

Entsprechend der Empfehlungen erfolgte die wöchentliche Durchführung eines Kolonisationsscreenings bei Frühgeborenen unter 1.500 g unter anderem auf *Enterobacter* spp. (unabhängig der phänotypischen Resistenz).

Nach Verdacht auf das Vorliegen eines Ausbruchs wurden die grundlegenden Hygienemaßnahmen auf den betroffenen Stationen von der Krankenhaushygienikerin und dem örtlichen Gesundheitsamt überprüft. Zusätzlich wurden sofortige Maßnahmen zur sogenannten Barriere-Pflege getroffen, die unter anderem das Wickeln der Kinder im eigenen Bett sowie Nutzung eigener Pflegeprodukte für jedes Kind beinhaltet. Es erfolgten zusätzliche Schulungen von Pflegepersonal und Eltern der Kinder zur Händehygiene. Verfahrensanweisungen zur Anwendungsvorbereitung parenteraler Medikamente wurden überprüft. Die oben beschriebenen Maßnahmen zur Fallsuche und Identifizierung der Infektionsquelle wurden eingeleitet. Alle identifizierten Fälle (vorläufig, wahrscheinlich und bestätigt) wurden kohortiert (d.h. ausschließlich in bestimmten Bereichen der betroffenen Stationen behandelt) und das konsequente Nutzen von Schutzkitteln und Einmalhandschuhen bei jedem Kontakt wurde angeordnet und überprüft. Ab November 2015 gab es zudem einen erneuten partiellen Aufnahmestopp für besonders gefährdete Kinder (z. B. Frühgeburten unter 1.500 g) auf der NICU. Dieser wurde bis zum Ende des Jahres 2015 beibehalten. Die Siphons auf der NICU und im Kreissaal wurden ausgetauscht.

Mikrobiologische Untersuchungen

Erregernachweis und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung

Für die Erregeridentifizierung wurde der VITEK 2 mit GN card (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) verwendet. Die genaue Spezies wurde im Rahmen der Sequenzierung identifiziert (siehe unten). Die Empfindlichkeitsprüfung erfolgte mittels Agar-Diffusionstestung und wurde gemäß EUCAST v6.0 (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) bestimmt. Die Empfindlichkeitsprüfung für Tigecyclin, Colistin und Imipenem und Ertapenem wurde mittels VITEK2 (card AST-N248, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) und Etest durchgeführt.

Genotypisierung

Zunächst führte das Krankenhauslabor eine Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) nach Makrorestriktion mit dem Restriktionsenzym XbaI durch. Hier waren aufgrund einer durch den Erreger produzierten DNase, die zu einer Zersetzung der DNA während des Isolierungsprozess führte, keine Banden identifizierbar. Daher wurde das Verfahren vor Ort auf eine zufalls-geprimte PCR (Arbitrary-Primed-PCR, AP-PCR) mit DNA-Isolierung durch den MAXWELL16Dx (Promega) umgestellt. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Gel-Elektrophorese verglichen. Parallel dazu wurden alle verfügbaren Isolate an das RKI geschickt, um sie mittels Next-Generation-Sequenzierung (NGS) zu analysieren. Die PFGE-Analyse wurde zudem wiederholt, wobei ein modifiziertes Verfahren (Zusatz von 39 µM Thiourea zum Puffer) angewendet wurde, um eine vorzeitige Zersetzung der DNA zu vermeiden (27). Die Bandenmuster wurden nach den Kriterien von Tenover et al. (9) interpretiert.

Die Genomsequenzierung wurde mit dem MiSeq-System (Illumina, USA) unter Verwendung der Nextera XT-library (Illumina, USA) und des MiSeq v3-reagent kit mit einer Leseweite von 2x300 base pairs (bp) paired-end reads durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden an das European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena; PRJEB22570>) übermittelt. Die Reads wurden mit Trimmomatic (v. 0.0.9; Standardparameter außer maxinfo 15:0.5) und dem A5-miseq (v. 0.0.9 beta; Standardparameter) (28) bearbeitet. Die entstandenen Contigs wurden beim Centre for Genomic Epidemiology (CGE) eingereicht. Im Rahmen der Sequenzierung wurde die Subspezies *E. cloacae* ssp. *dissolvens* bestätigt. Bekannte Antibiotikaresistenzmarker mit ResFinder 2.1 bzw. PlasmidFinder 1.3 extrahiert (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Die Multilocus Sequenz Types (MLST) der *E. cloacae* Isolate wurden mit MLST 1.8 (29) identifiziert. Drei neue Sequenztypen (ST) wurden bei <https://pubmlst.org/ecloacae/> eingereicht.

Die phylogenetische Analyse erfolgte anhand des Referenzgenoms (*E. cloacae* Komplex ECNIH2 (NZ_CP008823.1). Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) wurden aus dem abgebildeten Referenzgenom mittels SNPfilter (30) identifiziert (<https://gitlab.com/s.fuchs/snpfilter>). Ein phylogenetischer Baum wurde basierend auf 3.161 SNP-Positionen berechnet (RAxML 7.2.8, GTR GAMMA-Modell, Rapid Hill-Climbing, 100 starting trees) (31).

Um die molekulargenetische Ursache der unterschiedlichen Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz der Ausbruchs isolate zu untersuchen, wurden *de novo* zusammengesetzte Kontigs mit Hilfe bekannter Wildtyp-Sequenzen (ampD (Z14003) und ampR (X04730 und M27222.1), sowie ompF (KT780421.1), ompC (KT780422.1)) und dazugehörigen Promotor Regionen mit Geneious (v. 10.0.5, Biomatters Ltd, New Zealand) auf bekannte ampC-Phänotyp-induzierende Regionen hin analysiert.

Epidemiologische Analyse

Für die epidemiologische Auswertung wurden folgende Daten aus den klinischen Dokumentationssystemen erhoben: Patientennummer, Geburtsdatum, Aufnahmegrund, Entbindungswoche, Geburtsgewicht, Zwilling ja/nein, Aufnahmestation, Datum des Erstdiagnoses, Station des Erstdiagnoses, Entlassungsdatum, alle vorhandenen Laborergebnisse.

Die Daten wurden in einer Linelist zusammengefasst und mit den mikrobiologischen Ergebnissen zusammengeführt. Es wurde eine epidemische Kurve (zur Darstellung der Anzahl der Neuinfektionen) erstellt und die vorhandenen Daten wurden deskriptiv ausgewertet. Demographische Daten und Daten zu Expositionen wurden dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und STATA 14.1.

Ethik

Diese Ausbruchuntersuchung wurde entsprechend § 25 Abs.1 IfSG durchgeführt, weshalb keine Prüfung durch eine Ethikkommission erforderlich war.

Ergebnisse

Verlauf des Ausbruchs

Bis zur Einbeziehung des RKI wurden dem Ausbruch insgesamt 18 Kinder auf der NICU mit mikrobiologischem *E. cloacae* Nachweis zwischen dem 24.06.2015 und dem 18.10.2015 zugeordnet (Abbildung 1).

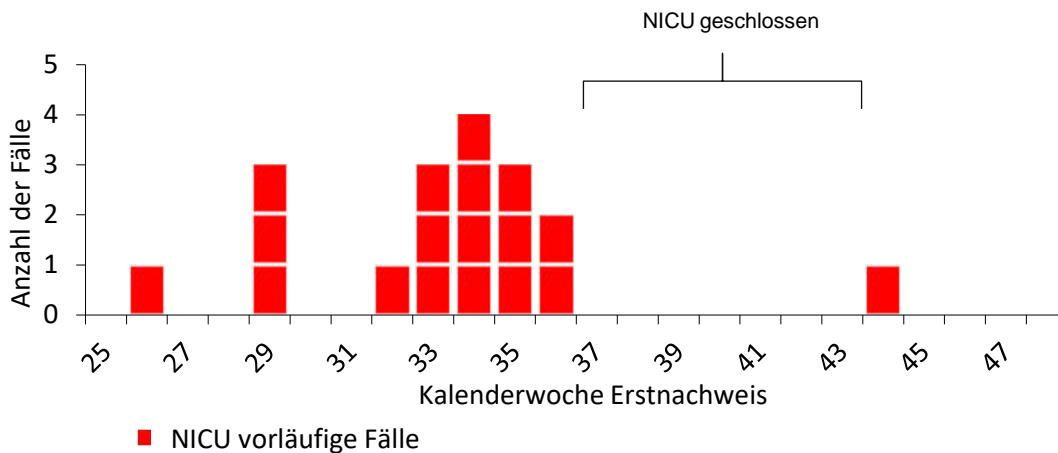


Abbildung 2: Epidemische Kurve zu Fällen mit mikrobiologischem Nachweis von *E. cloacae* auf der NICU zum Zeitpunkt der Einbeziehung des RKI, 24.06.2015 – 05.11.2015

Durch die ausgeweitete prospektive und retrospektive Fallsuche erhöhte sich die Fallzahl auf 41 vorläufige Fälle, die zwischen dem 08.04.2015 und dem 15.11.2015 auftraten. Darunter waren 20 Neugeborene und ein sechsmonatiges Kind auf der NICU, 5 Neugeborene und 10 Kinder zwischen 4 Wochen und 7 Jahren auf der Kinderstation sowie ein erwachsener (fremdbelegter) Patient auf der Kinder- und vier auf der Entbindungsstation. (Abbildung 3).

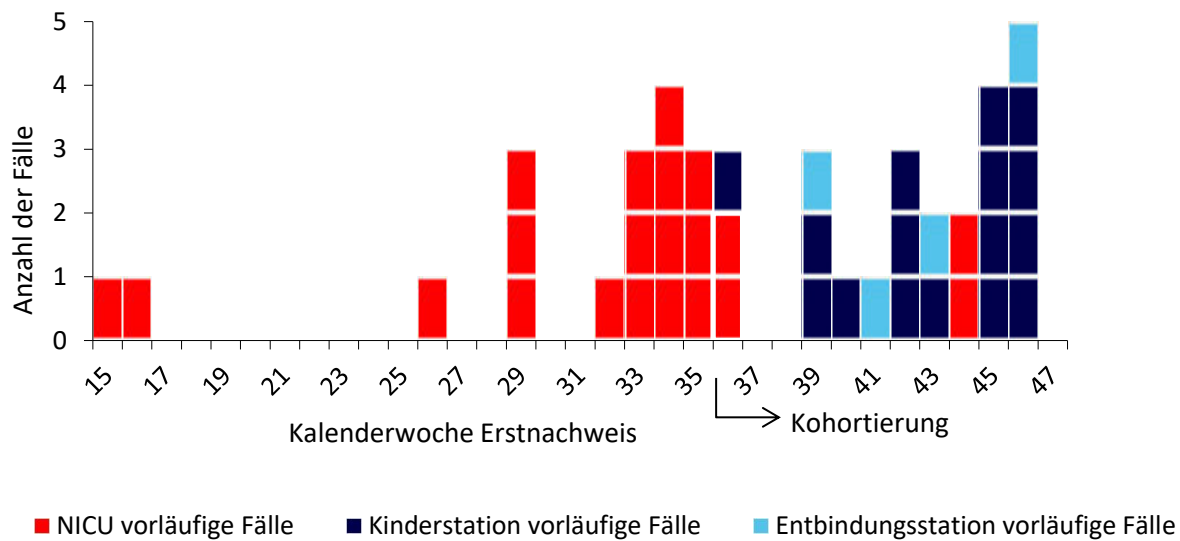


Abbildung 3: Epidemische Kurve zu vorläufigen Fällen mit mikrobiologischem Nachweis von *E. cloacae* nach Ausdehnung der Fallsuche, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Alle vorläufigen Fälle mit *E. cloacae* wurden sofort nach dem Nachweis kohortiert und es wurden Barriere Maßnahmen (z.B. Pflege am Bett, siehe oben) getroffen.

Da die zur molekularen Typisierung durchgeführte PFGE zunächst nicht aussagekräftig war (s. Methoden), wurde zur Bestätigung der vorläufigen Fälle eine AP-PCR durchgeführt. Die Isolate von 28 der 41 vorläufigen Fälle waren für molekulargenetische Untersuchungen verfügbar, davon zeigten 23 identische AP-PCR Bandenmuster (Abbildung 4). Jedoch konnte für drei dieser 23 Fälle kein epidemiologischer Zusammenhang mit den anderen bestätigten Fällen festgestellt werden.

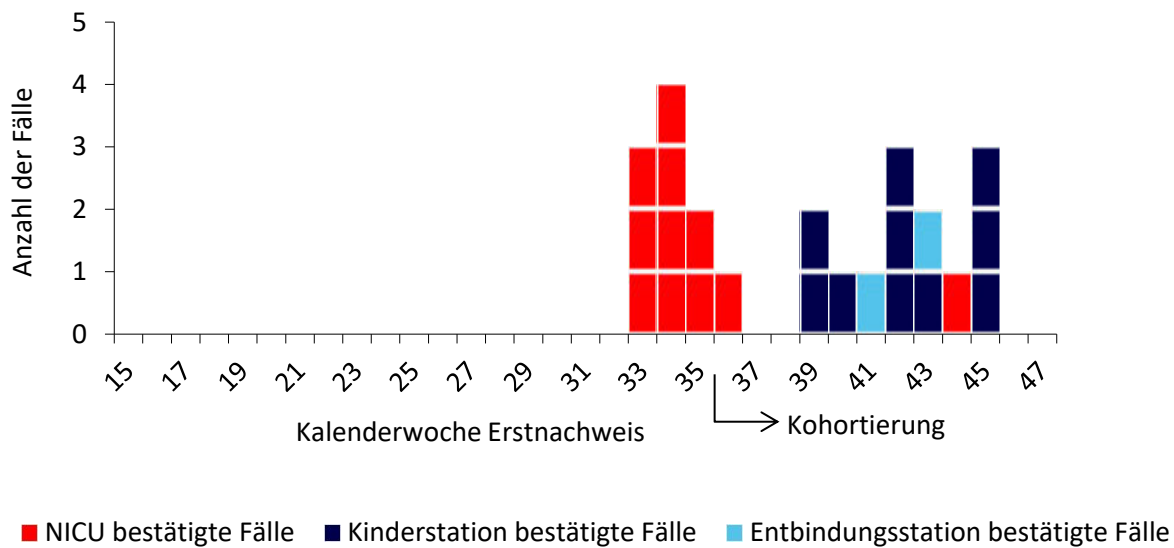


Abbildung 4: Epidemische Kurve zu in der AP-PCR bestätigten Fällen, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Im Verlauf konnte dann die PFGE unter einer Modifikation des Verfahrens (s. Methoden) am RKI wiederholt werden. Für die PFGE waren die Isolate von 19 Fällen verfügbar (davon 18 in der AP-PCR positiv und einer in der AP-PCR negativ). Dabei zeigten sich nur für die Isolate von 10 dieser Fälle identische Makrorestriktionsbanden (siehe Abbildung 5). Diese waren alle auch in der AP-PCR zusammengehörig. Die nachfolgend durchgeführte NGS-Analyse bestätigte die Zusammengehörigkeit der zehn Fälle und diese wurden abschließend als bestätigte Fälle gewertet.

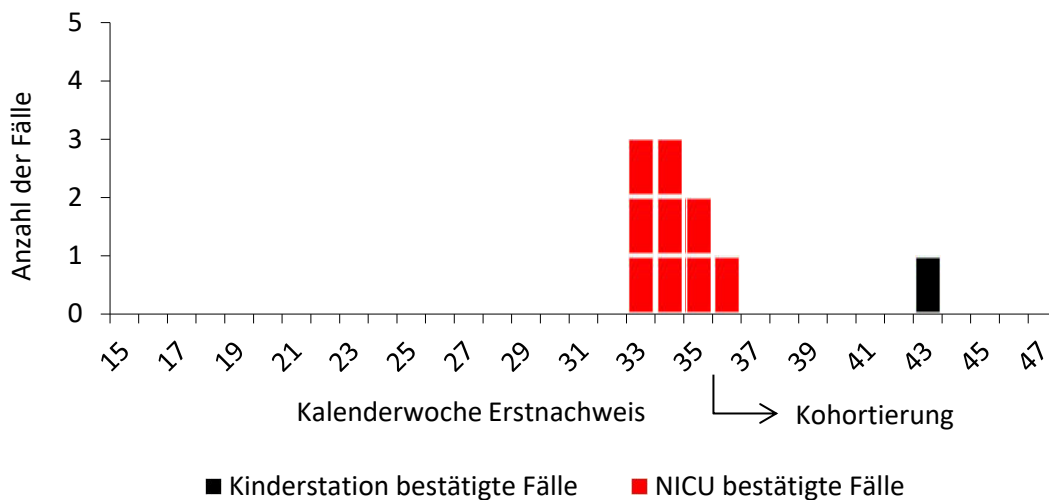


Abbildung 5: Epidemische Kurve zu in der PFGE und NGS bestätigten Fällen, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Darüber hinaus wurden dem Ausbruch sechs weitere der in Abbildung 2 identifizierten vorläufigen Fälle zugeordnet, zu denen es keine Isolate für eine weitere Typisierung gab, die jedoch in einem engen epidemiologischen Zusammenhang mit den PFGE/NGS-bestätigten Fällen standen. Diese wurden abschließend als wahrscheinliche Fälle gewertet. Damit wurden dem Ausbruch schlussendlich 16 Fälle (10 bestätigte und 6 wahrscheinliche Fälle) zugeordnet, die zwischen dem 24.06.2015 und dem 22.10.2015 auf zwei verschiedenen Stationen (15 Neugeborene auf der NICU und ein Kleinkind auf einer Kinderstation) auftraten (siehe Abbildung 6).

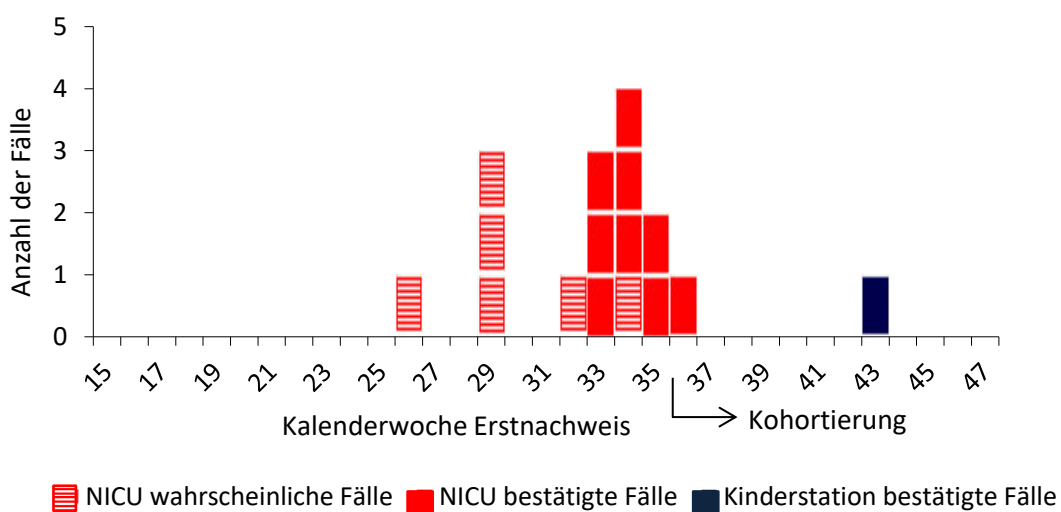
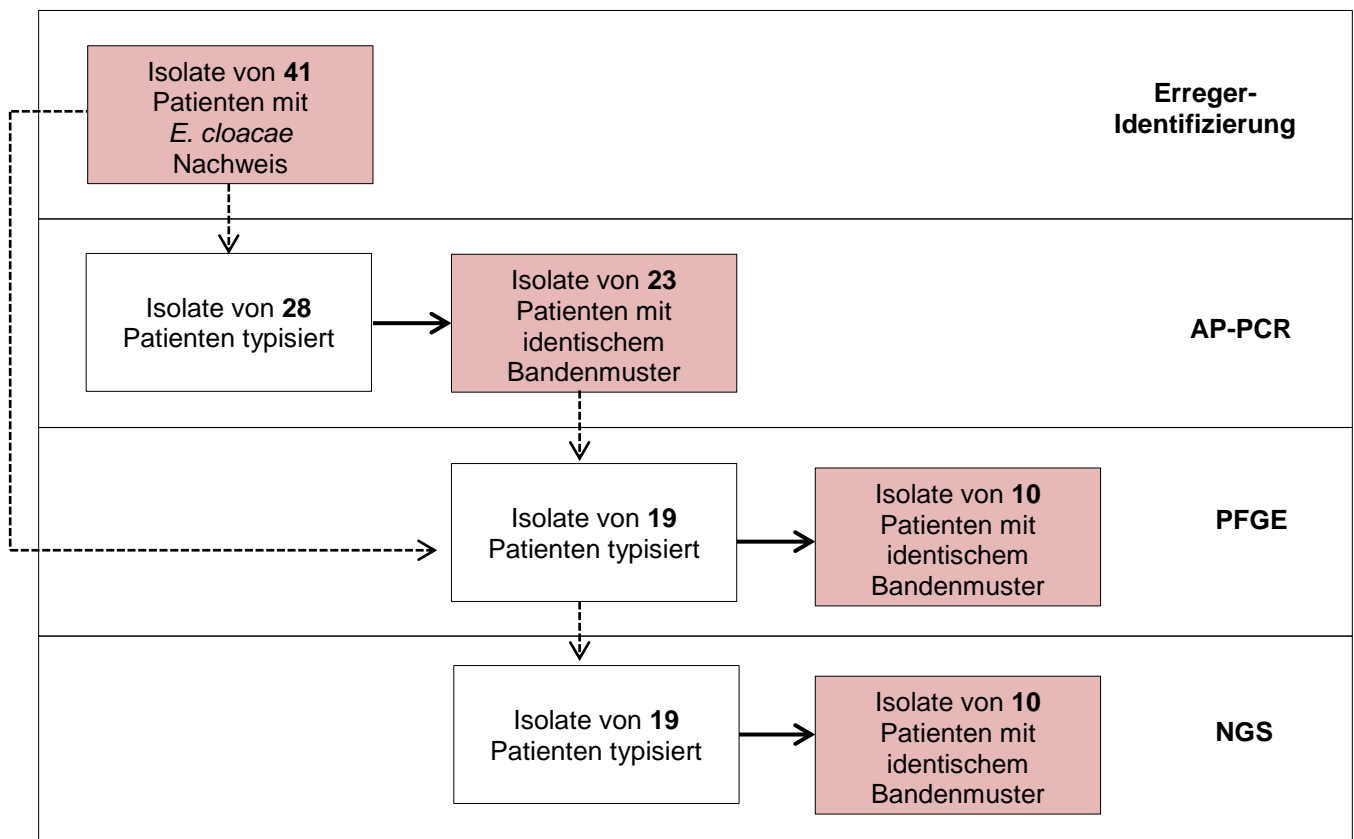


Abbildung 6: Abschließende epidemische Kurve aller zum Ausbruch gezählten Fälle, 01.01.2015 – 31.12.2015 (2)

Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 7 die stufenweise Reduzierung der bestätigten Fälle durch die unterschiedlichen Diskriminierungsverfahren.



-----> Ursprung Isolate

Abbildung 7: Stufendiagramm zur Eingrenzung aller zum Ausbruch gezählten Fälle durch verschiedene molekulare Typisierungsverfahren, 01.01.2015 – 31.12.2015

In Hinblick auf die Personal- und Umweltuntersuchungen zeigten sich bei 17 Mitarbeitenden sowie an drei Siphons (NICU und zwei Kreissälen) mikrobiologische Nachweise von *E. cloacae*. Sechs der vorläufigen Fälle unter den Mitarbeitenden wurden in der AP-PCR bestätigt, PFGE und NGS zeigten jedoch schlussendlich keine Verwandtschaft der zugehörigen Isolate zum Ausbruchstamm. Eine der Umweltproben wurde molekulargenetisch sowohl durch AP-PCR, als auch durch PFGE und NGS bestätigt und somit abschließend dem Ausbruch zugeordnet.

Deskription der Ausbruchsfälle

Insgesamt drei betroffene Kinder entwickelten eine schwere Infektion mit dem Ausbruchstamm. Zwei Säuglinge entwickelten einen Hirnabszess bei bekannter

Kolonisation durch *E. cloacae*. Ein Säugling entwickelte eine Sepsis ohne vorher erkannte *E. cloacae* Kolonisation.

Zweiundsechzig Prozent (10/16) der Fälle waren weiblich (Tabelle 1). Das mittlere Alter zum Zeitpunkt des Nachweises von *E. cloacae* betrug zehn Tage [Spannweite 1-86]. Frühgeborene Neugeborene (Schwangerschaftsalter <37 Wochen) stellten 87% der Fälle dar (14/16). Das mittlere Geburtsgewicht betrug 1805 g [Spannweite 1210-4040 g], 19% (3/16) wiesen ein sehr geringes Geburtsgewicht (<1500 g) auf.

Tabelle 1: Epidemiologische Basisdaten der Ausbruchsfälle (n = 16; PFGE-/NGS- bestätigte Fälle n = 10), 01.01.2015 - 31.12.2015 (2)

n = 16		median	[min-max.]
Gestationsalter (Wochen)	total	34+3	[30+3-39+1]
	weiblich	34+3	[30+3-36+4]
	männlich	34+4	[31+4-39+1]
Geburtsgewicht (g)	total	1.810	[1,210-4 040]
	weiblich	1.795	[1,210-2 780]
	männlich	1.885	[1,700-4 040]
Alter bei Erstnachweis (Tage)	total	10	[1-86]
	weiblich	10	[2-31]
	männlich	9.5	[1-86]
Zeitspanne Aufnahme bis Erstnachweis (Tage)	total	6.5	[0-22]
	weiblich	10	[0-22]
	männlich	5	[0-13]

Mikrobiologische Ergebnisse

Erregernachweis

Zwischen dem 08.04.2015 und dem 15.11.2015 wurde *E. cloacae* Komplex in 92 Isolaten von 41 Patienten und 18 Proben von medizinischem Personal (17 Personen) durch den Vitek 2 nachgewiesen. *E. cloacae* Komplex wurde zudem in vier Umweltproben an Siphons auf der NICU und in zwei Kreissälen nachgewiesen. Die genaue Identifizierung der Spezies erfolgte im Rahmen der Sequenzierung (siehe unten).

Genotypisierung

Fünfunddreißig Isolate von 28 Patienten, 18 von Mitarbeitern (17 Personen) und alle aus der Umgebung gewonnenen Isolate waren für die Typisierung durch eine AP-PCR verfügbar.

Dreiundzwanzig Isolate von Patienten, sechs von medizinischem Personal und drei Umweltisolate wiesen in der AP-PCR identische Bandenmuster auf. Für die nachfolgende PFGE am RKI standen nur 26 Isolate zur Verfügung: 22 Isolate von 19 Patienten, zwei von medizinischem Personal auf der NICU und zwei Umweltproben von NICU und Entbindungsstation. Die PFGE war nach Modifikation des Protokolls (siehe Methoden) für alle Isolate auswertbar. Dreizehn Isolate von zehn Säuglingen und ein Isolat eines Siphons auf der NICU wurden einem Ausbruchstamm zugeordnet (Abbildung 8). Die getesteten Isolate aus Mitarbeiterproben waren genetisch nicht mit diesem Ausbruchstamm verwandt.

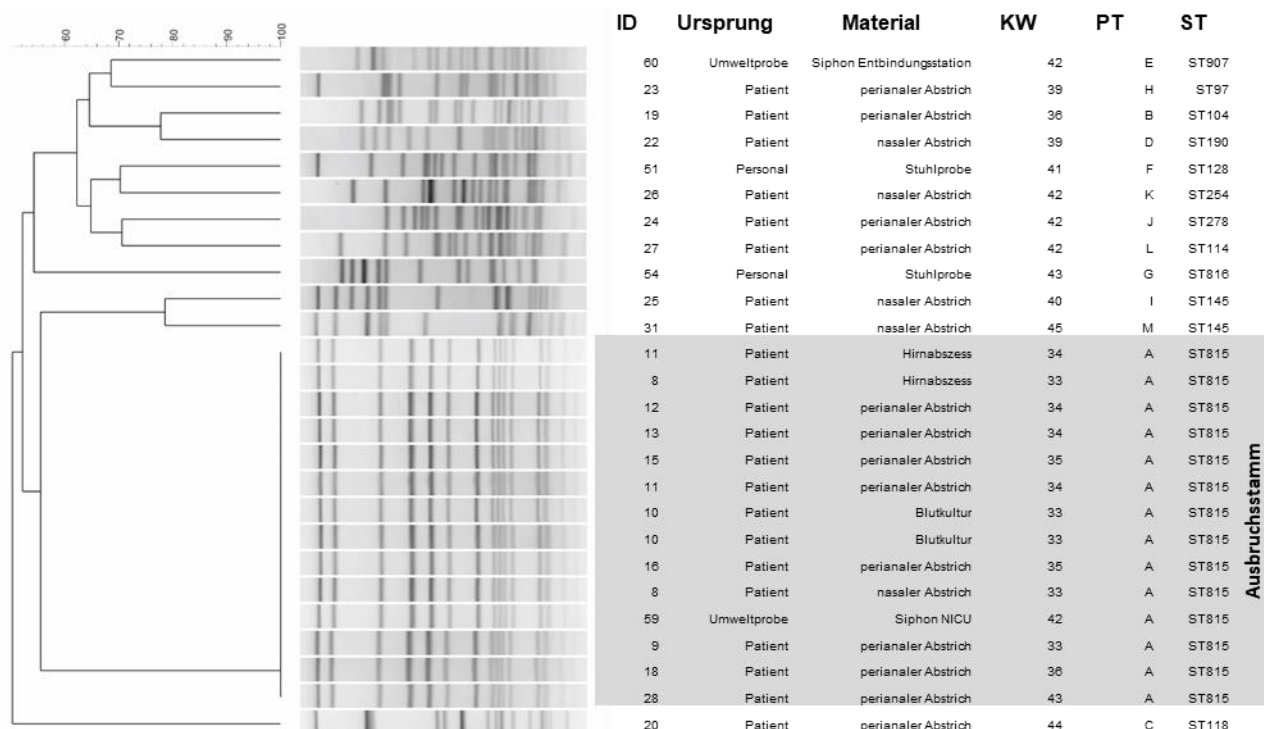


Abbildung 8: UPGMA (Unweighted Pair Group Method) clustering der genetischen Zusammenhänge der in der PFGE untersuchten E. cloacae Isolate (XbaI Makrorestriktion, PFGE), 01.01.2015-31.12.2015. Das Dendrogramm wurde mit Bionumerics software (version 7.6.2, parameters tolerance 1.0; optimization 0.5) erstellt. Ausbruchsisolate sind in grau hervorgehoben. (Kalenderwoche (KW), Pulsotyp (PT), Sequenztyp (ST)) (2)

NGS wurde für 26 Isolate durchgeführt, welche alle bereits PFGE-typisiert waren. Die Analyse bestätigte 14 Isolate (von zehn Patienten und einer Umweltprobe) als zum Ausbruchstamm zugehörig. Diese wurden dem Sequenztyp (ST) 815 zugeordnet, welcher den Ausbruchsstamm darstellt (Abbildung 9). Die nicht dem Ausbruch zugeordneten Isolate wurden elf verschiedenen STs zugeordnet. Zwei von ihnen zeigten den gleichen ST (ST145), zwei wiesen neue STs auf (ST816 und ST907).

Die SNP-Analyse zeigte eine enge Verwandtschaft zwischen den 14 Ausbruchisolaten, nur 15 SNPs wurden nachgewiesen. Einzelne Isolate zeigten im direkten Vergleich lediglich einen Unterschied von null bis acht SNP-Positionen. Vergleiche mit Nichtausbruchisolaten zeigten ein vielfältigeres SNP-Muster (Differenz minimal 1.043 SNPs bis maximal 1.529 SNPs). Der phylogenetische Baum in Abbildung 9 stellt die Ausbruchgruppe dar, die Ergebnisse stimmen mit den PFGE-Ergebnissen überein.

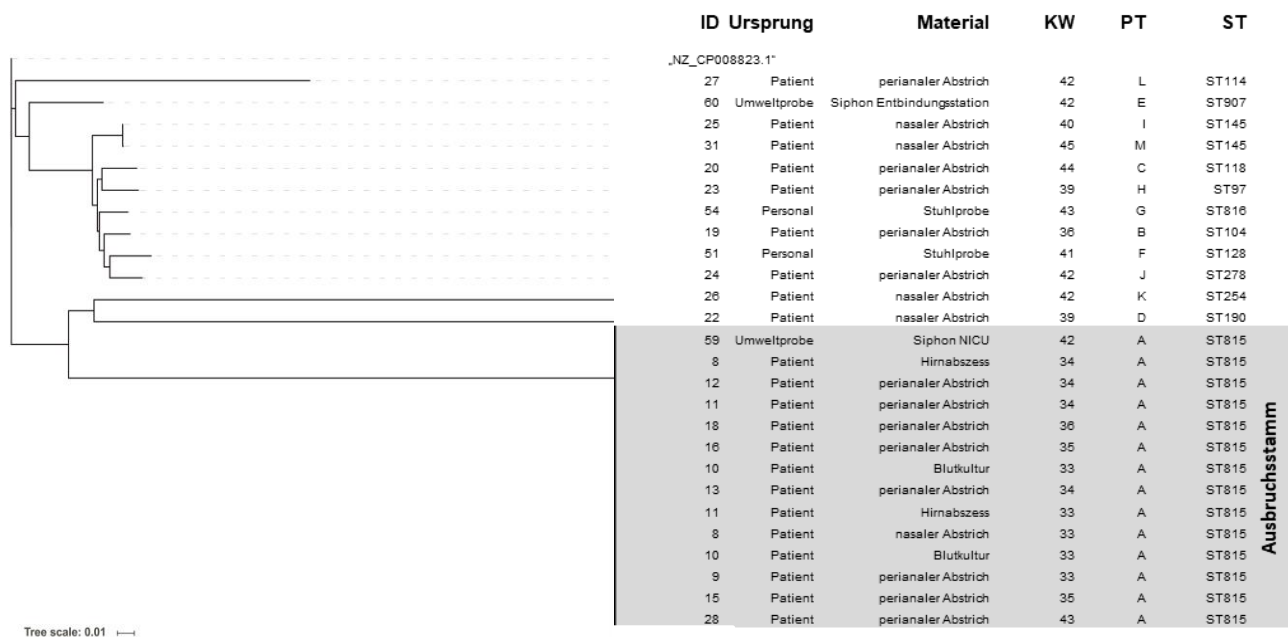


Abbildung 9: Phylogenetischer Baum (RAxML 7,2,8, GTR GAMMA model, Rapid hill-climbing, 100 starting trees) der E. cloacae Isolate auf Grundlage von 3,161 SNP Positionen (150 bp exclusion distance) nach Vergleich der Daten mit Referenz-Sequenzen (NZ_CP008823.1). 01.01.2015 - 31.12.2015. Ausbruchsisolate sind in grau hervorgehoben. (Kalenderwoche (KW), Pulsotyp (PT), Sequenztyp (ST)) (2)

Neun der Ausbruchsisolate (7 Fälle) sowie zwei nicht dem Ausbruch zugehörige Isolate von Patienten waren resistent gegen Cefotaxim und Ceftazidim, ein Ausbruchsisolat war nur resistent gegen Cefotaxim (siehe Tabelle 2). Die NGS-Analyse mit ResFinder 2.1 und PlasmidFinder 1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) ergab keine durch Plasmide vermittelten Resistenzmechanismen. Es wurden allerdings bei den Isolaten von 3 Ausbruchsfällen Sequenzvarianten von ampC, ampR und ampD erkannt.

Tabelle 2 fasst die Typisierungsergebnisse aller angewendeten Verfahren, die Ergebnisse der Resistenzprüfung sowie die schlussendliche Einschätzung der Zugehörigkeit zum Ausbruch aller vorläufigen Fälle zusammen.

Tabelle 2: Typisierungsergebnisse aller vorläufigen Fälle nach phäno-/genotypischer Diskriminierungsmethode und antimikrobieller Resistenz, (n = 41), 01.01.2015 - 31.12.2015, (Ampicillin (AMP); Cefotaxim (CTX); Ceftazidim (CAZ); Ciprofloxazin (CIIP); Ertapenem (ETP); Piperacillin (PIP))

ID	Ursprung	Station	Kalenderwoche 2015	Erreger	Phänotypische Resistenz	Ergebnis AP-PCR	Ergebnis PFGE	Ergebnis Sequenzierung	Einschätzung
1	Patient	NICU	15	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
2	Patient	NICU	16	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
3	Patient	NICU	26	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
4	Patient	NICU	29	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
5	Patient	NICU	29	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
6	Patient	NICU	29	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
7	Patient	NICU	32	<i>E. cloacae</i> Komplex diss.		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
8	Patient	NICU	33	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
9	Patient	NICU	33	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
10	Patient	NICU	33	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
11	Patient	NICU	34	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
12	Patient	NICU	34	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
13	Patient	NICU	34	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm fraglich	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
14	Patient	NICU	34	<i>E. cloacae</i> Komplex		Ausbruchsstamm	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Ausbruch
15	Patient	NICU	35	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
16	Patient	NICU	35	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
17	Patient	NICU	35	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
18	Patient	NICU	36	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ (I)	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch

Tabelle 2: Typisierungsergebnisse aller vorläufigen Fälle nach phäno-/genotypischer Diskriminierungsmethode und antimikrobieller Resistenz, (n = 41), 01.01.2015 - 31.12.2015, (Ampicillin (AMP); Cefotaxim (CTX); Ceftazidim (CAZ); Ciprofloxazin (CIIP); Ertapenem (ETP); Piperacillin (PIP))

ID	Ursprung	Station	Kalenderwoche 2015	Mikrobiologischer Erregernachweis	Phänotypische Resistenz	Ergebnis AP-PCR	Ergebnis PFGE	Ergebnis Sequenzierung	Einschätzung
19	Patient	NICU	36	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Nicht Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST104)	Nicht-Ausbruch
20	Patient	NICU	44	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (STST118)	Nicht-Ausbruch
21	Patient	Kinders tation	36	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
22	Patient	Kinders tation	39	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST190)	Nicht-Ausbruch
23	Patient	Kinders tation	39	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		fraglich Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST97)	Nicht-Ausbruch
24	Patient	Kinders tation	42	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST278)	Nicht-Ausbruch
25	Patient	Kinders tation	40	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		fraglich Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST145)	Nicht-Ausbruch
26	Patient	Kinders tation	42	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST254)	Nicht-Ausbruch
27	Patient	Kinders tation	42	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.	CTX/CAZ	Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST114)	Nicht-Ausbruch
28	Patient	Kinders tation	43	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm	Ausbruchsstamm (ST815)	Ausbruch
29	Patient	NICU	44	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
30	Patient	Kinders tation	45	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		fraglich Ausbruchsstamm	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
31	Patient	Kinders tation	45	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm	Nicht-Ausbruchsstamm (ST145)	Nicht-Ausbruch
32	Patient	Kinders tation	45	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch

Tabelle 2: Typisierungsergebnisse aller vorläufigen Fälle nach phäno-/genotypischer Diskriminierungsmethode und antimikrobieller Resistenz, (n = 41), 01.01.2015 - 31.12.2015, (Ampicillin (AMP); Cefotaxim (CTX); Ceftazidim (CAZ); Ciprofloxazin (CIIP); Ertapenem (ETP); Piperacillin (PIP))

ID	Ursprung	Station	Kalenderwoche 2015	Mikrobiologischer Erregernachweis	Phänotypische Resistenz	Ergebnis AP-PCR	Ergebnis PFGE	Ergebnis Sequenzierung	Einschätzung
33	Patient	Kinders tation	45	<i>E. cloacae</i> Komplex		Ausbruchsstamm	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
34	Patient	Kinders tation	46	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
35	Patient	Kinders tation	46	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
36	Patient	Kinders tation	46	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
37	Patient	Kinders tation	46	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
38	Patient	Entbind ungssta tion	41	<i>E. cloacae</i> Komplex		fraglich Ausbruchsstamm	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
39	Patient	Entbind ungssta tion	40	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
40	Patient	Entbind ungssta tion	43	<i>E. cloacae</i> Komplex		Ausbruchsstamm	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
41	Patient	Entbind ungssta tion	46	<i>E. cloacae</i> Komplex		kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	kein Isolat verfügbar	Nicht-Ausbruch
42	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex	CTX/CAZ	Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
43	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
44	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
45	Personal	NICU	37	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
46	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex		Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
47	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex	CTX/CAZ	Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
48	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> Komplex	CTX/CAZ	Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch

Tabelle 2: Typisierungsergebnisse aller vorläufigen Fälle nach phäno-/genotypischer Diskriminierungsmethode und antimikrobieller Resistenz, (n = 41), 01.01.2015 - 31.12.2015, (Ampicillin (AMP); Cefotaxim (CTX); Ceftazidim (CAZ); Ciprofloxazin (CIIP); Ertapenem (ETP); Piperacillin (PIP))

ID	Ursprung	Station	Kalenderwoche 2015	Mikrobiologischer Erregernachweis	Phänotypische Resistenz	Ergebnis AP-PCR	Ergebnis PFGE	Ergebnis Sequenzierung	Einschätzung
49	Personal	NICU	38	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
50	Personal	NICU	41	<i>E. cloacae</i> Komplex		fraglich Ausbruchsstamm	Nicht- Ausbruchsstamm	Nicht- Ausbruchsstamm (ST128)	Nicht-Ausbruch
51	Personal	NICU	39	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
52	Personal	NICU	39	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
53	Personal	NICU	39	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
54	Personal	NICU	41	<i>E. cloacae</i> ssp. diss.		fraglich Ausbruchsstamm	Nicht- Ausbruchsstamm	Nicht- Ausbruchsstamm(ST816)	Nicht-Ausbruch
55	Personal	NICU	43	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
56	Personal	NICU	43	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
57	Personal	NICU	43	<i>E. cloacae</i> Komplex		fraglich Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch
58	Personal	NICU	k.A.	<i>E. cloacae</i> Komplex		Nicht Ausbruchsstamm	nicht getestet	nicht getestet	Nicht-Ausbruch

Diskussion

Der untersuchte Ausbruch mit *E. cloacae* auf einer NICU in Deutschland umfasste zugehörige Fälle. Neben den 10 durch alle drei verwendeten genotypisierende Methoden bestätigten Fällen wurden sechs wahrscheinliche Fälle (Potentielle Fälle, deren Isolate nicht für eine Genotypisierung zur Verfügung standen, die aber einen eindeutigen epidemiologischen Link untereinander zeigten) auf den Ausbruch zurückgeführt. Drei der vom Ausbruch betroffenen Säuglinge entwickelten schwere Infektionen, zwei davon mit Hirnabszessen, eins mit einer Sepsis.

Ausbrüche mit *E. cloacae* auf NICUs wurden in der Literatur bereits vielfach berichtet (16, 17, 32) und Fälle mit durch *E. cloacae* verursachten schweren neurologischen Infektionen wurden bereits beschrieben (33). Dies verdeutlicht die Bedeutung des Erregers bei Neugeborenen und die Bedeutung der frühen Erkennung, Eingrenzung und Beendigung von durch *E. cloacae* verursachten Ausbrüchen. Die Fallsuche mit Identifizierung aller zum Ausbruch gehörenden Fälle ist dabei ein wesentlicher Punkt.

Die Forschungsfrage dieser Arbeit ist, welche der genotypisierenden Testverfahren im Zusammenspiel epidemiologischer und mikrobiologischer Faktoren in der Praxis dazu geeignet sind, im Falle eines fraglichen nosokomialen Ausbruchs mit *E. cloacae* zwischen Ausbruchsstamm und ko-inzidenten *E. cloacae* unterscheiden zu können. Diese wurde mit Hilfe des oben geschilderten Ausbruchsszenarios untersucht.

Die Fähigkeit eines genotypisierenden Verfahrens zur Unterscheidung zwischen dem Ausbruchsstamm und anderen Stämmen einer Spezies wird bestimmt durch seine Diskriminierungsfähigkeit. Diese wird definiert als die Fähigkeit, nicht dem Ausbruchsstamm zugehörige Stämme als solche zu erkennen und entspricht der Spezifität des genutzten Verfahrens. In der Praxis spielen für die Unterscheidung zwischen Ausbruch zugehörigen und nicht-Ausbruch zugehörigen Stämmen aber nicht nur die Spezifität des Testverfahrens, sondern auch die Umstände des Ausbruchs eine Rolle, die zum Beispiel den Patientenpool bestimmen, in dem mit dem Verfahren getestet wird.

Bestimmend für den zu testenden Patientenpool ist die Fallsuche. Diese muss sensitiv genug sein, damit alle Fälle erkannt und in die Kontrollmaßnahmen eingeschlossen

werden können und eine weitere Ausbreitung des Ausbruches verhindert wird. Bei nosokomialen Ausbrüchen mit fakultativ-pathogenen Erregern erfolgt die Fallsuche in der Regel durch eine Testung aller symptomatischen Verdachtsfälle sowie zusätzlich durch ein Screening klinisch unauffälliger Patientinnen und Patienten, die mit bereits bestätigten Fällen in epidemiologischem Zusammenhang stehen. Das Screening wird nach epidemiologischer Abwägung möglicher Transmissionswege initiiert und schrittweise ausgeweitet, bis eine eindeutige räumliche Eingrenzung des Ausbruchs möglich ist.

Durch phänotypisierende Verfahren werden zunächst alle im Rahmen der Fallsuche gewonnenen Isolate auf den Ausbruchserreger getestet und auf eine mögliche Zugehörigkeit zum Ausbruchstamm geprüft. Verdachtsfälle, bei denen eine Besiedelung mit dem Ausbruchserreger bestätigt wurde, werden genotypisiert, um zwischen dem Ausbruch zugehörigen und ko-inzidenten Stämmen unterschieden und eine klare Zuordnung der Fälle zum Ausbruch vornehmen zu können.

Das Vorkommen sowie andere Eigenschaften des Ausbruchserregers können dabei die Diskriminierungsfähigkeit eines genotypisierenden Verfahrens beeinflussen. Die Pathogenität eines Erregers kann zum Beispiel Einfluss auf die Transmissionsrate und die Häufigkeit des Auftretens von Symptomen, aber auch die Ausbildung von Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen haben. Dabei variieren die Eigenschaften unterschiedlicher Ausbruchsstämme innerhalb einer Spezies. Dies kann zu einer Beeinflussung der Fallsuche und der Möglichkeit einer durch phänotypisierende Verfahren getroffenen Vorauswahl, und damit zu einem veränderten Patientenpool für die genotypisierende Testung führen.

Die mangelnde Diskriminierungsfähigkeit eines genotypisierenden Verfahrens kann zu einer größeren Anzahl falsch positiv getesteter Isolate und damit zu einer Überschätzung eines Ausbruchs führen, was sowohl Konsequenzen für das Individuum als auch für die Allgemeinheit hat. Fälschlich dem Ausbruch zugeordnete Patientinnen und Patienten können durch unter Umständen unnötige antibiotische Behandlung sowie Isolierung mit eingeschränktem Zugang zu medizinischer Diagnostik und Therapie geschädigt werden. Zudem entstehen hohe Kosten für das Gesundheitssystem (34) und durch die eventuell stattfindende mediale Berichterstattung (35, 36) eine Verunsicherung der Bevölkerung in Bezug auf Patientensicherheit. Letzteres trifft

besonders auf Ausbrüche zu, in den vulnerable Patientengruppen wie z.B. Kinder involviert sind. Zudem kann gerade auf NICU´s eine unnötige Isolierung von Säuglingen zu einer Störung der wichtigen Mutter-Kind-Bindung und dadurch zu einem schlechteren klinischen Outcome führen (37). Die fälschliche Bestätigung von ko-inzidenten Fällen, die in keinem epidemiologischen Zusammenhang mit Ausbruchsfällen stehen, kann außerdem zu veränderten Hypothesen über die Ursache eines Ausbruchs führen, so wie es in dem hier beschriebenen Ausbruch der Fall war. Letztendlich können durch fälschlich einem einzelnen Ausbruch zugeordneten Fällen Übertragungswege (z.B. aus einem zweiten, parallel auftretenden Cluster) übersehen und die Beendigung von Ausbrüchen so verzögert werden (38, 39).

Auf Basis der Forschungsfrage ergibt sich aus den Ergebnissen der beschriebenen praktischen Ausbruchsuntersuchung die Hypothese, dass von den untersuchten Typisierungsverfahren in der Praxis die NGS und PFGE dazu geeignet sind, im Falle eines fraglichen nosokomialen Ausbruchs mit *E. cloacae* ausreichend zwischen Ausbruchsstamm und ko-inzidenten *E. cloacae* unterscheiden zu können. Die Gegenhypothese, welche besagt, dass auch die AP-PCR eine für Ausbrüche mit *E. cloacae* ausreichende Diskriminierungsfähigkeit besitzt, wird durch die Ergebnisse der Ausbruchsuntersuchung widerlegt:

E. cloacae kommt als fakultativ pathogener Erreger in der physiologischen Darmflora des Menschen vor. Diese bildet sich zwar bei Neugeborenen erst im Laufe der Zeit aus, jedoch erfolgen bei der Geburt regelmäßig Übertragungen von gramnegativen Erregern von der Darmflora der Mutter auf das Kind (40). Der Nachweis von *E. cloacae* bei einem Neugeborenen bedeutete in der Praxis also nicht zwangsläufig eine Besiedelung mit dem Ausbruchsstamm. Nur ein sehr kleiner Teil der mit dem Ausbruchsstamm besiedelten Patienten entwickelte Symptome, was bei Ausbrüchen mit *E. cloacae* häufig der Fall ist (17, 32). Daher wurde ein mikrobiologisches Screening auf der NICU eingeführt und schrittweise auf andere potentiell betroffene Stationen ausgedehnt, um alle dem Ausbruch zugehörigen Fälle zu identifizieren. In der Resistenztestung zeigten einige dem Ausbruchsstamm zugehörige Erreger eine Antibiotikaresistenz, andere waren sensibel. Auch das wird bei Ausbrüchen mit *E. cloacae* immer wieder beschrieben (17, 39). Durch das wechselnde Resistenzmuster war eine phänotypische Eingrenzung der mit dem Ausbruchsstamm kolonisierten Fälle erschwert und eine Vor-Auswahl für die Genotypisierung nicht möglich. Die zunächst durchgeführte

mikrobiologische Primärdiagnostik lieferte somit einen sehr großen Patientenpool an vorläufigen Fällen, deren Isolate mittels genotypisierender Methoden auf eine Zugehörigkeit zum Ausbruchsstamm getestet werden mussten.

Allerdings verminderte sich im Verlauf der Fallsuche der Anteil derer, welche tatsächlich mit dem Ausbruchsstamm besiedelt waren, da dies mit Ausweitung des Screenings auf periphere Stationen bei gleichbleibender Besiedelung von Patienten mit anderen *E. cloacae* immer unwahrscheinlicher wurde. Die Prävalenz des Ausbruchsstammes in der zu testenden Population verringerte sich und der positiv prädiktive Wert¹ des genutzten Verfahrens erniedrigte sich. Bei der im Gegensatz zu anderen Genotypisierungsverfahren weniger spezifischen Methode AP-PCR (41) nahm die Anzahl der falsch positiv auf Klonalität getesteten Fälle zu. Aufgrund dessen wurde das Screening weiter ausgeweitet und die Prävalenz des Ausbruchsstammes wurde immer geringer. Es kam zu einer Überschätzung der tatsächlichen Ausbruchgröße. Der fehlende epidemiologische Zusammenhang zwischen den in der AP-PCR bestätigten Fällen führte zur Infragestellung der verwendeten Methode. Daraufhin wurde am RKI unter Verwendung eines modifizierten Protokolls eine erneute PFGE durchgeführt. Hier zeigte sich für 10 Fälle, deren Isolate in der AP-PCR positiv auf Klonalität mit dem Ausbruchsstamm getestet wurden, ein abweichendes Ergebnis. Die MLST- und NGS-basierte SNP-Phylogenie bestätigte die falsch-positiven Testergebnisse.

Im Falle des beschriebenen Ausbruchs wurden nicht dem Ausbruch zugehörige Neugeborene und Kinder unnötigerweise isoliert. Da dies die oben beschriebenen erheblichen Auswirkungen auf das Wohl der Allgemeinheit und die betroffenen Individuen hat, ist die AP-PCR als genotypisierendes Bestätigungsverfahren im Rahmen von Ausbrüchen mit *E. cloacae* in der Praxis nicht geeignet.

Dagegen führten die PFGE und NGS zu einer klaren Diskriminierung zwischen dem Ausbruch zugehörigen und ko-inzidenten Fällen und die tatsächliche Fallzahl wurde deutlich reduziert. Mit Hilfe beider Typisierungsverfahren konnte der Ausbruch auf die NICU eingegrenzt werden. Zwischen alle Fälle konnte ein enger epidemiologischer Zusammenhang gefunden. Zwar wurde der Ausbruchsstamm auch bei einem Kind auf einer der peripheren Kinderstationen eindeutig nachgewiesen und durch alle drei genotypisierenden Verfahren bestätigt. Es zeigte sich allerdings, dass dieses Kind

¹ $PPV = \frac{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz}}{\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \times (1 - \text{Prävalenz})}$

bereits im Juli 2015 auf der NICU stationär behandelt wurde und eine Übertragung des Ausbruchsstammes sehr wahrscheinlich während dieses Voraufenthalts erfolgte.

In der Literatur ist die Diskriminierungsfähigkeit von Testverfahren zur Genotypisierung in der Praxis nur wenig beschrieben, insbesondere praktische Anwendungsbeispiele im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen mit einem Vergleich verschiedener Verfahren fehlen. Jedoch zeigte die PFGE in der Literatur zu Ausbrüchen mit gramnegativen Bakterien eine sehr hohe Diskriminierungsfähigkeit. Durch PFGE konnte in einer Publikation von Oteo et al. (42) in einem *E. cloacae* Ausbruch auf einer NICU bei einem Cluster von 14 vorläufigen Fällen zwei verschiedene Ausbruchsstämme identifizieren und in einer Publikation von Manzur et al. (43) wurden durch PFGE ebenfalls zwei Ausbruchsstämme in einem Cluster von 14 vorläufigen Fällen auf einer Erwachsenen Intensivstation identifiziert.

NGS ist ebenfalls ein hoch-diskriminierendes Verfahren. In einer Publikation von Stoesser et al. (39) wurden Isolate eines Clusters von 16 *E. cloacae* Fällen auf einer NICU mittels NGS auf Klonalität getestet mit der Hypothese, dass es sich um einen einzelnen Ausbruch handle. Allerdings enthüllte die NGS zwei voneinander unabhängige Ausbrüche. Dabei wurde der eine Stamm von außen eingetragen und der Andere auf einen kontaminierten Seifenspender innerhalb der Klinik zurückgeführt. Dabei zeigte eine Untersuchung zu einem Ausbruch mit *Klebsiella pneumoniae* auf einer Intensivstation auch die Überlegenheit von NGS der PFGE in Hinblick auf die Diskriminierungsfähigkeit (38).

Die wesentliche Limitation der durchgeführten Analyse ist, dass für die genotypisierende Testung nicht alle Ausbruchs isolate zur Verfügung standen. In der Praxis werden Isolate aus der Routinediagnostik nur eine begrenzte Zeit aufbewahrt. Als die Vermutung eines klonalen Geschehens aufkam, wurden zwar alle noch verfügbaren Isolate für weitere Untersuchungen asserviert. Allerdings war für insgesamt 13 vorläufige Fälle kein Untersuchungsmaterial mehr vorhanden. Bei sieben dieser Fälle wurde aufgrund eines epidemiologischen Zusammenhanges mit (durch PFGE und NGS) bestätigten Fällen trotzdem von einer Zugehörigkeit zum Ausbruchsgeschehen ausgegangen. Die anderen sieben Fälle wurden als sporadisch eingestuft. Für fünf weitere, in der AP-PCR (fraglich) bestätigte Fälle war nicht ausreichend Material

vorhanden, um eine erneute PFGE sowie eine NGS durchzuführen. Bis auf ein Kind von der NICU wurden diese Fälle als nicht dem Ausbruch zugehörig eingestuft.

Diese Ausbruchsuntersuchung hat gezeigt, dass die AP-PCR in der Praxis bei Ausbrüchen mit *E. cloacae* aufgrund geringer Spezifität nicht ausreichend zwischen dem Ausbruch zugehörigen und ko-inzidenten Fällen unterscheiden kann. Allerdings wird diese (ebenso wie andere wenig spezifische Verfahren) in der Praxis in Ausbruchssituationen vor Ort noch immer angewendet, da sie relativ einfach durchzuführen, kostengünstig und vor allem schnell verfügbar ist. Durch die besonderen Eigenschaften des Erregers ist jedoch ein hoch spezifisches Verfahren zur Genotypisierung notwendig, um die nötige Diskriminierungsfähigkeit zur genauen Eingrenzung des Ausbruches gewährleisten zu können. Dies kann im besten Fall die NGS sein, in der Praxis hat sich allerdings gezeigt, dass gerade bei größeren nosokomialen Ausbrüchen dieses Verfahren lokal aufgrund von hohen Kosten und knappen Kapazitäten in der Breite nicht anwendbar ist. In diesem Rahmen ist das Aufbauen regionaler Kompetenznetze zur zeitnahen, hochqualitativen Durchführung von PFGE und gegebenenfalls auch NGS in Ausbruchssituationen mit *E. cloacae* essentiell, um diese frühzeitig einzuzämmen und Nachteile für die betroffenen Patienten zu vermeiden. Somit sollte auch nach Bestätigung von Ausbruchsfällen durch genotypisierende Maßnahmen immer eine epidemiologische Einordnung aller bestätigten Fälle erfolgen. Lässt sich dort kein Zusammenhang zwischen einzelnen Fällen herstellen, sollte eine Nachtestung der betreffenden Isolate in Erwägung gezogen werden, um eine Überschätzung von Ausbrüchen mit den oben genannten Risiken zu vermeiden.

Literaturverzeichnis

1. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(5):892-916.
2. Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S. Overestimation of an Outbreak of *Enterobacter cloacae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Germany, 2015. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(6):631-7.
3. Ausbruchmanagement und strukturiertes Vorgehen bei gehäuftem Auftreten nosokomialer Infektionen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*. 2002;45:180-6.
4. Wichelhaus TA, Schäfer V, Volker B. Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemotherapie Journal*. 2000;9(2):93-8.
5. McClelland M, Welsh J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR methods and applications*. 1994;4(1):S59-65.
6. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(4):20380.
7. Nutman A, Marchaim D. How to: molecular investigation of a hospital outbreak. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;25(6):688-95.
8. PulseNet: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2016 [Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html>].
9. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.
10. Illumina: Illumina; 2019 [Available from: <https://www.illumina.com/>].
11. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*. 2012;7(7):887-902.
12. Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TFH. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage ed. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag 2012.
13. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen - Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsblatt*. 2012;10(55): 1311-54.
14. Guerin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated beta-Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7753-61.
15. Pfeiffer Y. ESBL und AmpC: Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien. Berlin: Robert Koch-Institut; 2007.
16. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VL, Gibelli MA, van der Heijden I, Rossi F, Duboc G, Levin AS, Costa SF. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. *J Hosp Infect*. 2008;70(1):7-14.
17. Pestourie N, Garnier F, Barraud O, Bedu A, Ploy MC, Mounier M. Outbreak of AmpC beta-lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. *Am J Infect Control*. 2014;42(4):456-8.

18. Hermes J, Jansen A, Geipel U, Herrmann M, von Muller L, Haber M, Jung W, Thome-Granz S, Eckmanns T. [Multi-dose packaging of drugs as the causative vehicle for multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*: new results from a case-control study]. *Gesundheitswesen*. 2011;73(11):778-83.
 19. van den Berg RW, Claahsen HL, Niessen M, Muytjens HL, Liem K, Voss A. *Enterobacter cloacae* outbreak in the NICU related to disinfected thermometers. *J Hosp Infect*. 2000;45(1):29-34.
 20. Harbarth S, Sudre P, Dharan S, Cadenas M, Pittet D. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20(9):598-603.
 21. Dame C, Christoph J, T. E, Gärtner B, Geffers C, Gille C, Haertel C, Haller S, Hartel C, Kraus-Haas M, Marschal M, Müller A, von Muller L. Risikocharakterisierung intensivmedizinisch behandelter Früh- und Neugeborener und Daten zur Ist-Situation in deutschen neonatologischen Intensivpflegestationen 2013 - Praktische Umsetzung sowie krankenhaushygienische und infektionspräventive Konsequenzen des mikrobiellen Kolonisationsscreenings bei intensivmedizinisch behandelten Früh- und Neugeborenen - Ergänzende Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, Berlin zur Implementierung der Empfehlungen zur Prävention nosokomialer Infektionen bei neonatologischen Intensivpflegepatienten mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 g aus dem Jahr 2007 und 2012. *Epidemiologisches Bulletin*. 2013;42.
 22. Parm U, Metsvaht T, Sepp E, Ilmoja ML, Pisarev H, Pauskar M, Lutsar I. Risk factors associated with gut and nasopharyngeal colonization by common Gram-negative species and yeasts in neonatal intensive care units patients. *Early human development*. 2011;87(6):391-9.
 23. KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System. Modul NEO-KISS Referenzdaten. Berechnungszeitraum: Januar 2017 bis Dezember 2018.
- . Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Surveillance und nosokomiale infektionen.; 2019 09/07/2019.
24. Gastmeier P, Loui A, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Zuschneid I, Sohr D, Behnke M, Obladen M, Vonberg RP, Ruden H. Outbreaks in neonatal intensive care units - they are not like others. *Am J Infect Control*. 2007;35(3):172-6.
 25. Haller S, Eckmanns T, Benzler J, Tolksdorf K, Claus H, Gilsdorf A, Sin MA. Results from the first 12 months of the national surveillance of healthcare associated outbreaks in Germany, 2011/2012. *PloS one*. 2014;9(5):e98100.
 26. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut Ergänzende Empfehlung (2011) zur „Prävention nosokomialer Infektionen bei neonatologischen Intensivpflegepatienten mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 g“ (2007). *Epidemiologisches Bulletin*. 2012(2).
 27. Silbert S, Boyken L, Hollis RJ, Pfaller MA. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2003;47(4):619-21.
 28. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(15):2114-20.
 29. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PloS one*. 2013;8(6):e66358.

30. Becker L, Fuchs S, Pfeifer Y, Semmler T, Eckmanns T, Korr G. Whole genome sequence analysis of CTX-M-15 producing klebsiella isolates allowed dissecting a polyclonal outbreak scenario. *Frontiers in microbiology*. 2018(9):322.
31. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(9):1312-3.
32. Talon D, Menget P, Thouverez M, Thiriez G, Gbaguidi Haore H, Fromentin C, Muller A, Bertrand X. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect*. 2004;57(2):119-25.
33. Haller S, Cassini PDA, Suetens C, Zingg W, Sin MA, Velasco E, Weiss B, Ducomble T, Sixtensson M, Eckmanns T, Harder T. Neurological sequelae of healthcare-associated sepsis in very-low-birthweight infants: Umbrella review and evidence-based outcome tree. *Eurosurveillance*. 2016;21(8):1-10.
34. Roth JA, Hornung-Winter C, Radicke I, Hug BL, Biedert M, Abshagen C, Battegay M, Widmer AF. Direct Costs of a Contact Isolation Day: A Prospective Cost Analysis at a Swiss University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39(1):101-3.
35. Neugeborenenstation nach Darmkeimausbruch wieder geöffnet: Deutscher Ärzteverlag GmbH; 2018 [Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/97665/Neugeborenenstation-nach-Darmkeimausbruch-wieder-geoeffnet>].
36. Klinikum Herford: Sieben Säuglinge mit Keimen belastet: Zeitungsverlag Neue Westfälische GmbH & Co. KG; 2016 [Available from: https://www.nw.de/lokal/kreis_herford/herford/20752325_Klinikum-Herford-Sieben-Saeuglinge-mit-Keimen-belastet.html].
37. Flacking R, Lehtonen L, Thomson G, Axelin A, Ahlqvist S, Moran VH, Ewald U, Dykes F. Closeness and separation in neonatal intensive care. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2012;101(10):1032-7.
38. Chen C, Zhang Y, Yu S-L, Zhou Y, Yang S-Y, Jin J-L, Chen S, Cui P, Wu J, Jiang N, Zhang W-H. Tracking Carbapenem-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in an Intensive Care Unit by Whole Genome Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:281-.
39. Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(4):1008-15.
40. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992) Supplement*. 2003;91(441):48-55.
41. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, Markers obotESGoE. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*. 2013;18(4):20380.
42. Oteo J, Cercenado E, Vindel A, Bautista V, Fernandez-Romero S, Saez D, Padilla B, Zamora E, Campos J. Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 4):571-5.
43. Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, Sora M, Gudiol F, Ariza J. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2365-9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Gyde Steffen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Abschätzung eines Ausbruchs durch Enterobacter cloacae auf einer neonatologischen Intensivstation in Deutschland, 2015 / Estimation of an outbreak of Enterobacter cloacae in a neonatal intensive care unit in Germany, 2015**

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift der Doktorandin

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Gyde Steffen hat folgenden Anteil an der Publikation:

Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S.

Overestimation of an Outbreak of *Enterobacter cloacae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Germany, 2015.

The Pediatric Infectious Disease Journal, 2019 June ;38(6):631-637

doi: 10.1097/INF.0000000000002264

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der Ausbruchsuntersuchung: Sammlung aller notwendigen Daten und Informationen, Beratung des betroffenen Krankenhauses zu Fallsuche und Maßnahmen zur Ausbruchsbekämpfung, Koordination der Genotypisierung von Isolaten an unterschiedlichen Standorten, Koordination von und Teilnahme an interdisziplinärem Austausch zu Problemen in Fallsuche, Maßnahmen zur Ausbruchsbekämpfung und Problemen bei Anwendung der unterschiedlichen Genotypisierungs-Verfahren

Auswertung der Daten: Erstellung von linelist und epidemischen Kurven, deskriptive Auswertung der erhobenen epidemiologischen Daten, Generierung und Prüfung von epidemiologischem Zusammenhang zwischen den Fällen, Generierung und Prüfung von Hypothesen zu Quelle und Übertragung des Ausbruchserregers, Idee und Konzeption des Artikels, Interpretation der Ergebnisse sowie die Verfassung des Artikels in Zusammenarbeit mit den Koautoren, Erstellung der Abbildung 1 und Tabelle 1 aus eigenen Auswertungen, Überarbeitung des Manuskriptes, Kommunikation mit Journal

Unterschrift, Datum und Stempel
des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2017/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Pediatrics.pdf , erstellt am 16.04.2020

Fachgebiet: Pediatrics

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
Selected Categories: **"PEDIATRICS"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 124 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JAMA Pediatrics	5,870	10.769	0.033730
2	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY	19,482	6.250	0.019260
3	PEDIATRICS	77,301	5.515	0.118620
4	PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,341	4.137	0.006970
5	JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH	14,174	4.098	0.026400
6	Pediatric Obesity	1,632	3.980	0.007020
7	Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition	3,893	3.953	0.009610
8	JOURNAL OF PEDIATRICS	31,289	3.667	0.047810
9	EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY	4,492	3.553	0.007980
10	Seminars in Fetal & Neonatal Medicine	2,246	3.435	0.005380
11	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	11,671	3.289	0.013680
12	ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD	16,281	3.258	0.015810
13	Maternal and Child Nutrition	2,405	3.233	0.006190
14	PEDIATRIC DIABETES	3,033	3.161	0.007530
15	PEDIATRIC PULMONOLOGY	6,730	3.157	0.009940
16	PEDIATRIC RESEARCH	13,691	3.123	0.015050
17	Pediatric Critical Care Medicine	5,763	3.092	0.011600
18	CLINICS IN PERINATOLOGY	2,377	2.915	0.004200
19	JOURNAL OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHOPHARMACOLOGY	2,677	2.901	0.004860
20	SEMINARS IN PERINATOLOGY	3,088	2.885	0.005580
21	PEDIATRIC CLINICS OF NORTH AMERICA	3,177	2.808	0.004830
22	Academic Pediatrics	2,106	2.806	0.008100
23	JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION	11,417	2.752	0.018600
24	Neonatology	2,432	2.688	0.006290
25	CURRENT OPINION IN PEDIATRICS	3,264	2.673	0.006780
26	PEDIATRIC BLOOD & CANCER	9,907	2.646	0.023240
27	PEDIATRIC NEPHROLOGY	8,625	2.627	0.011860

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
28	ACTA PAEDIATRICA	12,820	2.580	0.015740
29	Pediatric Rheumatology	953	2.543	0.003060
30	Childhood Obesity	970	2.532	0.004900
31	PAEDIATRIC AND PERINATAL EPIDEMIOLOGY	3,000	2.508	0.006010
32	Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society	725	2.456	0.004030
33	PEDIATRIC NEUROLOGY	5,337	2.398	0.009540
34	PEDIATRIC ANESTHESIA	4,953	2.389	0.006170
35	EUROPEAN JOURNAL OF PAEDIATRIC NEUROLOGY	2,560	2.362	0.005950
36	Paediatric Respiratory Reviews	1,577	2.354	0.002770
37	Paediatrics & Child Health	1,358	2.348	0.002670
38	Frontiers in Pediatrics	1,010	2.335	0.003710
	BIRTH-ISSUES IN PERINATAL			
39	CARE	2,250	2.329	0.002010
40	PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL	11,929	2.305	0.021510
	International Breastfeeding			
41	Journal	691	2.300	0.001090
42	EUROPEAN JOURNAL OF PEDIATRICS	7,383	2.242	0.010140
43	JOURNAL OF DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL PEDIATRICS	3,818	2.199	0.004930
44	Journal of Perinatology	5,951	2.183	0.010280
45	Journal of Neurosurgery-Pediatrics	3,600	2.162	0.009170
46	JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY	16,748	2.128	0.018490
47	Hormone Research in Paediatrics	1,627	2.103	0.004990
48	BMC Pediatrics	4,750	2.042	0.014910
49	Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health	938	2.033	0.002180
50	EARLY HUMAN DEVELOPMENT	5,841	2.025	0.008640
51	PEDIATRIC DRUGS	1,064	2.000	0.001880
52	Breastfeeding Medicine	1,353	1.951	0.003290
53	Journal of Pediatric Urology	2,551	1.935	0.006680
54	Seminars in Pediatric Neurology	1,045	1.878	0.001430
55	JOURNAL OF PEDIATRIC ORTHOPAEDICS	6,783	1.853	0.007670
56	JOURNAL OF HUMAN LACTATION	1,814	1.836	0.003080

Selected JCR Year: 2017; Selected Categories: "PEDIATRICS"

Publikation

Steffen G, Pietsch M, Kaase M, Gatermann S, Werner G, Fuchs S, Pfeifer Y, Schmitt W, Adam H, Eckmanns T, Haller S. Overestimation of an Outbreak of *Enterobacter cloacae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Germany, 2015. *Pediatr Infect Dis J*, 2019 June; 38(6):631-637 doi: 10.1097/INF.0000000000000000

<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002264>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. Rasmus Leistner für die Betreuung dieser Promotionsarbeit. Zudem danke ich Herrn Dr. med. Sebastian Haller für die Unterstützung in diesem Projekt und während meiner gesamten PAE-Zeit.

Ich danke dem Personal des Krankenhauses, in dem der beschriebene Ausbruch stattfand sowie den Mitarbeitenden des zuständigen Gesundheitsamtes für die Unterstützung der Ausbruchsuntersuchung.

Außerdem gilt mein Dank den Koautoren der entstandenen Publikation, insbesondere Frau Dr. Yvonne Pfeifer und Herrn Dr. Michael Pietsch aus dem Robert Koch-Institut, für die erfolgreiche und produktive Zusammenarbeit.