

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

DISSERTATION

Untersuchung der molekularen Epidemiologie von
Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* Stämmen
an der Charité - Universitätsmedizin Berlin

-
Investigation of the molecular epidemiology of
Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains at
Charité - Universitätsmedizin Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Weber

aus Berlin

Datum der Promotion: 4. März 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	2
2	Abstract.....	4
3	Einführung.....	5
4	Methodik	10
5	Ergebnisse	15
6	Diskussion.....	21
7	Literaturverzeichnis	26
8	Eidesstattliche Versicherung.....	31
9	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.....	32
10	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	33
11	Publikation	35
12	Lebenslauf	45
13	Publikationsliste	48
14	Danksagung.....	49

1 Zusammenfassung

In Deutschland ist in den letzten Jahren eine stetige Zunahme von Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VREfm) in medizinischen Einrichtungen zu beobachten. Durch VREfm verursachte Infektionen sind aufgrund eingegrenzter Behandlungsmöglichkeiten, verlängerten Krankenhausaufenthalten und einer höheren Mortalität eine zusätzliche Belastung für Patienten, Personal und medizinische Einrichtungen. Auch auf globaler Ebene stellt die Zunahme von VREfm ein gravierendes Problem dar. Untersuchungen der molekularen Epidemiologie, z.B. mittels Ganzgenomsequenzierung, können dazu beitragen, die Ausbreitung und Persistenz von VREfm besser zu verstehen. Am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurden im Zeitraum von 2017-2019 147 VREfm-Isolate im Rahmen von verschiedenen Ausbruchsanalysen mit der Ganzgenomsequenzierung untersucht. Dabei wurde ein gehäuftes Auftreten spezifischer Ausbruchs isolate festgestellt. Infolgedessen haben wir eine retrospektive Studie für den Zeitraum von 2008-2018 durchgeführt, um die Entwicklung und das Auftreten spezifischer Stämme über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Diese Studie umfasste aus den Untersuchungsjahren 2008, 2013, 2015 und 2018 insgesamt 120 Isolate, die ohne erkennbaren epidemiologischen Zusammenhang unabhängig voneinander aufgetreten waren. Für alle Isolate wurde eine cgMLST-Analyse durchgeführt und Sequenztypen (ST) und Clustertypen (CT) bestimmt. Die Studie zeigte, dass es einen Anstieg von VREfm mit ST117 von 17% im Jahr 2008 auf 57% im Jahr 2018 gab ($p = 0,012$). Für 80% aller ST117-Isolate wurde im Jahr 2008 der Genotyp *vanA* bestimmt und im Jahr 2018 lediglich für 6%. Zudem wurde im Jahr 2018 ein gehäuftes Vorkommen des Subtyps ST117 CT71 (43%) mit dem Genotyp *vanB* im Vergleich zu den anderen CT beobachtet. Die Studie spiegelte, wie auch die Ausbruchsanalysen, ein gehäuftes Auftreten von ST117 CT71 wider. Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass es an der Charité - Universitätsmedizin Berlin einen Anstieg von VREfm ST117 gibt und dieser Anstieg besonders in den letzten Jahren von einer Verschiebung unter den ST117-Subtypen in Richtung CT71 mit dem Genotyp *vanB* begleitet wird. Es wurden weder spezifische Virulenzfaktoren noch Veränderungen bei der Zusammensetzung der betroffenen Patienten gefunden, die zur Erklärung der Zunahme von ST117-

CT71 herangezogen werden können. Aufgrund der Erkenntnis, dass es sich bei ST117-CT71 um einen endemischen Stamm handelt, sollten zukünftige VREfm-Ausbrüche mit ST117-CT71 nur unter Berücksichtigung der epidemiologischen Zusammenhänge und nicht allein auf Grundlage der Ergebnisse der Ganzgenomsequenzierung betrachtet werden.

2 Abstract

In Germany, a steady increase of vancomycin-resistant *E. faecium* (VREfm) has been observed in medical facilities in recent years. Infections caused by VREfm are a burden on patients, staff and hospitals because of the limited treatment options, prolonged hospital stays, and high mortality. The increase in VREfm is a serious problem on a global level. Research in molecular epidemiology, e.g. by whole genome sequencing, is contributing to a better understanding of the spread and persistence of VREfm. At the Institute for Hygiene and Environmental Medicine of Charité - Universitätsmedizin Berlin between 2017 and 2019, 147 VREfm isolates were studied in various outbreak analyses using whole genome sequencing. A high occurrence of specific outbreak isolates was observed. Consequently, we conducted a retrospective study for the period 2008-2018 to examine the occurrence and development of specific strains over a longer period. This study included 120 isolates from the years 2008, 2013, 2015 and 2018 which occurred independently of each other without any apparent epidemiological link. A cgMLST analysis was performed on all isolates. Sequence types (ST) and cluster types (CT) were determined. The study revealed that there was an increase in VREfm with ST117 from 17% in 2008 to 57% in 2018 ($p = 0.012$). The genotype *vanA* was found in 80% of all ST117 isolates in 2008 and in 6% in 2018. In addition, in 2018 we observed an increased occurrence of the subtype ST117 CT71 (43%) with the genotype *vanB* compared to the other CT. As in the outbreak analyses, the study reflected an increased incidence of ST117 CT71. In summary, this work has shown that there has been an increase of VREfm ST117 at Charité - Universitätsmedizin Berlin and that—particularly in recent years—this increase has been accompanied by a shift among ST117 subtypes towards CT71 with the genotype *vanB*. Neither specific virulence factors nor changes in the composition of the group of patients affected could be identified that would explain the increase of ST117 CT71. Based on the finding that ST117 CT71 is an endemic strain, future VREfm outbreaks with ST117 CT71 should only be evaluated in an epidemiological context, not merely based on the results of whole genome sequencing.

3 Einführung

Enterokokken sind Teil des menschlichen Darmmikrobioms und somit nur fakultativ pathogen. Dennoch werden sie auch mit humanen Infektionen assoziiert und können bei speziellen Patientengruppen erhebliche Folgen haben. Von klinischer Bedeutsamkeit ist die Enterokokkenspezies *Enterococcus (E.) faecium* (1-4). In den letzten Jahren ist eine Zunahme Vancomycin-resistenter *E. faecium* (VREfm)-Isolate in Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen in Deutschland zu erkennen (5). Vancomycin-Resistenz kann durch verschiedene Genotypen eines Gen-Clusters vermittelt werden, wobei es sich meistens um das *vanA*- oder *vanB*-Operon handelt. Dieses kann chromosomal kodiert werden oder extra-chromosomal auf Plasmiden vorliegen (6). Entsprechend der Zahlen des deutschen nationalen Netzwerks „Antibiotika-Resistenz-Surveillance“ (ARS) erhöhte sich der Anteil der VREfm-Isolate in Deutschland von 11% in 2014 auf 26% in 2017 (7). Die steigende Tendenz von VREfm spiegeln auch die Daten aus dem Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) wider (8). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlichte 2018 eine Liste zur Einstufung der Priorität derjenigen bakteriellen Krankheitserreger, für die dringend neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden müssen, und stufte VRE mit einer hohen Priorität ein (9). Darüber hinaus klassifizierte die CDC - Centers for Disease Control and Prevention der USA - VRE als ernsthafte Bedrohung (10). Demnach stellen VREfm ein gravierendes Problem für Patienten und das Gesundheitssystem dar, und ausführliche Analysen zum Verständnis und zur Eindämmung der Verbreitung sind unerlässlich. Ausbrüche von Erregern können schwerwiegende Folgen für die medizinische Einrichtung und den betroffenen Patienten haben. Neben der erhöhten Morbidität des Patienten kann es zu einer höheren Beanspruchung von Zeit und Ressourcen des Krankenhauses sowie zur psychischen Belastung der Patienten, Angehörigen und des Personals kommen (11-13). Der Begriff „Ausbruch“ gemäß § 6 Abs. 3 des Infektionsschutzgesetzes beschreibt das gehäufte Auftreten nosokomialer Infektionen, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird. In dieser Arbeit umfasst der Begriff „Ausbruch“ eine Erregerhäufung unabhängig von dem Auftreten nosokomialer Infektionen. Ein Ausbruch kann in diesem Kontext Isolate reiner Kolonisation und nosokomialer Infektion umfassen.

Ausbruchsanalysen können Aufschluss über die Übertragungswege, Risikofaktoren, Eigenschaften und Pathogenität des Erregers geben. Diese Erkenntnisse können als Grundlage für die Aufklärung weiterer Geschehnisse dienen und es ermöglichen, daraus abgeleitete Maßnahmen gezielter einzusetzen und die Folgen zukünftiger Ausbrüche zu mildern (13). Molekulargenetische Analysen können dazu beitragen, die Hintergründe der landesweiten Zunahme von VREfm aufzudecken. Schon seit mehreren Jahren wird die molekulare Epidemiologie als Werkzeug für Ausbruchsanalysen genutzt. Dabei ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) die klassische Typisierungsmethode und wurde lange Zeit als Goldstandard angesehen. Die PFGE zeichnet sich durch geringe Durchführungskosten und eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Jedoch ist diese Methode technisch sehr anspruchsvoll, zeitintensiv und ermöglicht keinen Vergleich der Ergebnisse auf regionaler bzw. nationaler oder internationaler Ebene (14). Die Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST), bei der sieben Genloci sequenziert werden, ermöglicht einen Austausch von Daten mithilfe von Datenbanken mit einheitlicher Nomenklatur. Allerdings ist diese Methode durch geringes Diskriminierungsvermögen für die Analyse lokaler Ausbrüche schlecht geeignet (15). Im Gegensatz dazu kann die Ganzgenomsequenzierung (*engl.* Whole Genome Sequencing (WGS)) diese Anforderungen erfüllen. Bei dieser Methode ist der Informationsgehalt deutlich größer und ermöglicht es dadurch verwandte Stämme mit einer hohen Auflösung zu vergleichen (14, 15).

Ganzgenomsequenzierung und bioinformatische Auswertung

Die Verringerung der Kosten und die Einführung von anwenderfreundlichen Sequenzierplattformen in den letzten Jahren macht die Nutzung der WGS sehr attraktiv und führte zu einer weltweiten Etablierung. Die WGS basiert auf der „Next Generation Sequencing“-Technologie, die parallele Analysen von kurzen DNA-Abschnitten, den sogenannten „short reads“, mit einem hohen Durchsatz an Daten ermöglicht. Für die Short-Read-Sequenzierung stehen verschiedene Sequenzierplattformen zur Verfügung, wobei sich in der Mikrobiologie vor allem die Sequenziersysteme der Firma Illumina etabliert haben (16). Diese Sequenziersysteme verwenden das „sequencing-by-synthesis“-Verfahren. Dabei erfolgt die Detektion der einzelnen Basen während des Einbaus in den wachsenden DNA-Strang. Nach

der Sequenzierung werden die Rohdaten im FASTQ-Format ausgegeben. Diese Dateien umfassen die Fragmentsequenzen („Reads“) und die entsprechenden Qualitätswerte. Zur Aufbereitung für weitere Analysen können diese Dateien „getrimmt“ (zurechtgeschnitten) werden, um zum Beispiel Adaptersequenzen zu entfernen oder generell Sequenzabschnitte mit niedriger Qualität auszusortieren. Anschließend werden die getrimmten Reads assembliert. Dabei werden die Reads entsprechend der Vorgehensweise des Assemblers in der korrekten Reihenfolge zu längeren Sequenzabschnitten, auch Contigs genannt, zusammengesetzt. Das Assemblieren kann dabei als „Mapping“ (Referenzgenom als Vorlage) oder „*de novo*“ (ohne Referenzgenom) erfolgen (14, 17). Für die Auswertung dieser assemblierten Dateien gibt es verschiedene Ansätze. Für Ausbruchsanalysen werden in der Routine oft Allel-basierte Vergleiche verwendet. Dabei werden auf Grundlage des Kerngenoms weitaus mehr Gene („Targets“) als bei der klassischen MLST untersucht und als „core genome“ MLST (cgMLST) bezeichnet. Diese Analyse kann z.B. mit der SeqSphere+ Software von Ridom (<https://www.ridom.de/seqsphere/>) durchgeführt werden. Mittels eines Referenzgenoms wird auf Kerngenomebene ein Schema für die Analyse eines Erregers erstellt und dieses umfasst abhängig vom Erreger eine Vielzahl an Targets, die für den Vergleich der Isolate genutzt werden. Zudem werden in der Software die Sequenztypen (ST) und die Clustertypen (CT) der einzelnen Isolate angegeben, die den öffentlichen Datenbanken mit Nomenklatur zugrunde liegen (<https://pubmlst.org/> und <https://www.cgmlst.org/>). Neben dem Allel-basierten Vergleich kann für die Analyse von Sequenzierdaten auch ein „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP)-basierter Vergleich auf Kerngenomebene durchgeführt werden. Dabei werden nicht die Allele, sondern einzelne Unterschiede in der Sequenz miteinander verglichen. Der SNP-Ansatz ist folglich sehr diskriminativ, aber erfordert hohe Rechnerleistungen und hängt sehr von der Wahl des Referenzgenoms ab (17). Des Weiteren bieten diverse bioinformatische Tools die Möglichkeit, Isolate auf Resistenzgene, Virulenzfaktoren oder Plasmide und mobile Elemente zu untersuchen. Für die Analyse von Resistenzgenen kann z.B. ResFinder (18), CARD (19) oder ARG-ANNOT (20) genutzt werden. Untersuchungen auf Virulenzfaktoren können mit VirulenceFinder (21) oder VFDB (22) erfolgen. Zudem ermöglichen es PlasmidFinder (23), Platon (24), ICEberg (25), TETyper (26) oder RFPlasmid (27) Plasmide und mobile Elemente zu identifizieren. Das Feld der Bioinformatik bietet

von der Vorbereitung der Reads über das Assemblieren, Annotieren und Alignment bis hin zur Berechnung von phylogenetischen Bäumen und Visualisierung viele Anwendungen, die je nach Fragestellung individuell vom Anwender genutzt werden können (28). Die Nutzung von verschiedenen Analyseansätzen, diversen Tools und Abfragen von Datenbanken erfordert meistens Erfahrung mit Linux bzw. Kommandozeilenbefehle und kann sehr arbeits- bzw. zeitintensiv sein. Oft stellt das in der Routine eine große Herausforderung dar und limitiert infolgedessen die Anwendbarkeit. Daher ist der Bedarf an einem automatisierten Ablauf von verschiedenen Hilfsmitteln in Form von Analyseskripten, die von Anwendern ohne bioinformatischem Hintergrund genutzt werden können und die Gesamtergebnisse in Form einer grafischen Benutzeroberfläche präsentieren, sehr groß. So eine Vorgehensweise bietet die ASA³P Analyse Pipeline (29). Diese ermöglicht es, mit dem Input der FASTQ-Dateien eine automatisierte Analyse vom Trimmen der Reads, über das Assemblieren, Annotieren und Berechnung der Phylogenie bis hin zur Pangenomanalyse und Bestimmung von Resistenzgenen und Virulenzfaktoren, durchzuführen.

Zielsetzung dieser Arbeit

Am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin nutzen wir die Ganzgenomsequenzierung, um Erregerhäufungen auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Im Zusammenhang mit der Zunahme von VREfm an der Charité - Universitätsmedizin Berlin wollen wir genauere Informationen über das Auftreten und die Verbreitung von VREfm erhalten, um weitere Maßnahmen und Strategien zur Prävention und Infektionskontrolle entwickeln zu können. Im Zeitraum von 2017-2019 wurden mehrere Ausbrüche mit VREfm mittels Ganzgenomsequenzierung untersucht. Dabei wurde mit der Zeit auffällig, dass ein bestimmter Sequenztyp vermehrt auftrat und dieser Sequenztyp in wenige verschiedene Clustertypen differenziert werden konnte. Besonders häufig traten ST117 und CT71 in Erscheinung. Da das Institut für Hygiene und Umweltmedizin eine umfangreiche Keimstammsammlung besitzt, die VREfm-Isolate ab dem Jahr 2008 umfasst, wollten wir retrospektiv einige VREfm-Isolate aus dieser Sammlung mittels Ganzgenomsequenzierung untersuchen. Dabei stellte sich die Frage, ob

VREfm-Isolate mit ST117 CT71 nur im Zusammenhang mit den untersuchten Ausbrüchen auftauchten oder, ob dieser Typ schon länger vorkommt und nur in den letzten Jahren durch die Nutzung der neuen Technologie sichtbar wurde. Eine Analyse der Entwicklung und Dynamik der VREfm über einen Zeitraum von zehn Jahren sollte dazu beitragen, die Zunahme und Ausbreitung von VREfm besser zu verstehen, um daraus evtl. Präventivmaßnahmen ableiten zu können. Infolgedessen wurde in dieser Arbeit die molekulare Epidemiologie von Nicht-Ausbruchsisolaten in Form einer retrospektiven Studie von 2008-2018 untersucht, und diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen der vorangegangenen Ausbruchsanalysen verglichen.

4 Methodik

Für die Untersuchung der Isolate der retrospektiven Studie wurden die gleichen molekularbiologischen und bioinformatischen Methoden wie für die Ausbruchs-isolate von 2017-2019 genutzt. Die mikrobiologische Untersuchung der Isolate der retrospektiven Studie erfolgte in dem entsprechenden Jahr und weicht zwischen den Jahren ab. Die Durchführung der Methoden mit den Abweichungen in den jeweiligen Jahren werden im Methodenteil zusammengefasst beschrieben. Darüber hinaus wird das Konzept der Studie (Design, Ein- und Ausschlusskriterien sowie die statistische Analyse) erläutert.

Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Für die mikrobiologische Untersuchung auf VRE wurden im Jahr 2008 die entsprechenden Patiententupfer auf BBL-Enterococcosel-Agarplatten (Becton Dickinson, Artikelnr. 292234) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Bei positivem Wachstum dieser Screeningplatten wurde ein Agardiffusionstest mit 30 µg Vancomycin-Testplättchen (Becton Dickinson, Artikelnr. 254858) und 30 µg Teicoplanin-Testplättchen (Becton Dickinson, Artikelnr. 291311) auf Müller-Hinton-Agarplatten (bioMérieux, Artikelnr. 43309) durchgeführt. Zur Speziesbestimmung wurde eine „Bunte Reihe“ mit verschiedenen Substanzen (L-Arabinose, Sorbitol, Pyruvat, Raffinose, α -Methyl-D-Gluco-Pyranosidase und 6,5% ige NaCl-Lösung) oder API STREP (bioMérieux, Artikelnr. 20600) verwendet. Für die Identifizierung und Resistenztestung ab 2013 wurden chromID VRE Agarplatten (bioMérieux, Artikelnr. 43002) mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37 °C und MAST-DISCS Agardiffusionsplättchen mit 5 µg Vancomycin (Mast Group Ltd., Artikelnr. 112028) und 30 µg Teicoplanin (Mast Group Ltd., Artikelnr. 112022) genutzt. Darüber hinaus wurde das Vitek2 System mit den Vitek Karten GP (bioMérieux, Artikelnr. 21342) und AST-P592 (bioMérieux, Artikelnr. 22287) oder MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) zur Speziesbestimmung genutzt.

Für die Next-Generation-Sequenzierung wurden alle VRE_{fm}-Isolate auf Blutagarplatten (bioMérieux, Artikelnr. 413162) zunächst über Nacht bei 37 °C inkubiert,

und anschließend wurde die DNA mittels des UltraClean Microbial DNA Kit (Qiagen, Artikelnr. 12224-250) isoliert. Für die DNA-Isolierung wurden nur Reinkulturen mit mehreren Einzelkolonien verwendet. Zur Überprüfung der Qualität der DNA wurden die Absorptionsverhältnisse A260/A280 und A260/A230, die bei $\geq 1,8$ bzw. $\geq 2,0$ liegen mussten, mit einem Biophotometer bestimmt. Die Library Präparation für die Sequenzierung erfolgte mit dem Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, Artikelnr. FC-131-1024). Zur Kontrolle der Library wurden die PCR-Fragmente mit dem BioAnalyzer unter Verwendung des High Sensitivity Chips (Agilent Technologies, Artikelnr. 5067-4626) untersucht, um eine erfolgreiche Fragmentierung und eine Verteilung der Fragmentgrößen im Bereich von 500-700 bp sicherzustellen. Für die Aufreinigung und Größenselektion der PCR-Fragmente wurden paramagnetische Beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, Artikelnr. A63881) genutzt und so eingesetzt, dass Fragmente mit einer ungefähren Länge kleiner 400 bp entfernt wurden. Fragmente größer als 700 bp wurden nicht selektiert. Alle VREfm-Isolate wurden mit dem Illumina MiSeq System unter Verwendung der V2 Reagenzien mit 500 Zyklen (Illumina, Artikelnr. MS-102-2003) sequenziert.

Bioinformatische Auswertung und Datenanalyse

Für die Analyse und Auswertung wurde die SeqSphere+ Software Version 4.1.9 von Ridom benutzt. Diese Software ermöglicht durch eine feste Auswahl von Analyseparametern eine schnelle und stabile Analyse auf Grundlage des Kerngenoms durchzuführen. Als Input wurden die fastq-Dateien verwendet und mit dem Velvet-Assembler *de novo* assembliert. Für den Allel-basierten Vergleich wurde das publizierte cgMLST-Schema für *E. faecium* mit Standardeinstellungen genutzt (Schwellenwert für die Alleldistanz von Isolaten innerhalb eines Clusters: ≤ 20 ; *E. faecium* Referenzgenom NC_017022.1 GenBank accession number: GCA_000250945.1) (30). Für alle VREfm-Isolate wurden ST und CT extrahiert sowie eine Distanzmatrix für den paarweisen Vergleich basierend auf 1423 Targets (cgMLST) berechnet. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Minimum Spanning Tree und der Neighbor Joining Tree jeweils mit der Einstellung „Pairwise ignore missing values“ benutzt. Für die Sequenzierung wurde pro Probe eine durchschnittliche Coverage von 100 x angestrebt. Proben, die eine durchschnittliche

Coverage < 40 x aufwiesen oder nicht mindestens 95% der cgMLST-Targets erzielten, wurden erneut sequenziert.

Die Isolate der Studie wurden darüber hinaus mittels der ASA³P Analyse Pipeline untersucht. Dabei erfolgte die Assemblierung mittels SPAdes, und auf Kerngenomebene wurde ein SNP-Vergleich unter Verwendung des *E. faecium* Referenzgenoms NC_017022.1 durchgeführt. Die Resistenzgene wurden mittels CARD (19) und ResFinder (<http://www.genomicepidemiology.org>) untersucht, für die Detektion von Virulenzfaktoren wurde die Datenbank VFDB (22) und VirulenceFinder (<http://www.genomicepidemiology.org>) verwendet. Außerdem wurde mittels Roary eine Pangenomanalyse (31) durchgeführt.

Studiendesign

Die vorliegende Studie umfasst VREfm-Isolate von Patienten, die im Rahmen der aktiven Routineüberwachung und Infektionspräventionskontrolle im Zeitraum von 2008 bis 2018 an der Charité - Universitätsmedizin Berlin asserviert wurden. Dabei wurden die Standorte Campus Benjamin Franklin, Campus Charité Mitte und Campus Virchow-Klinikum eingeschlossen. Zunächst wurden nur Isolate aus den Jahren 2008, 2013 und 2018 für die Untersuchung ausgewählt. Aufgrund der dabei erzielten Ergebnisse (starker Anstieg von CT71 in 2018, siehe Ergebnisse Seite 17) wurden nachträglich auch Isolate aus dem Jahr 2015 mit in die Studie eingeschlossen, um die Veränderungen zeitlich enger einzugrenzen. Für jedes Untersuchungsjahr wurden die Isolate nach dem gleichen Schema ausgewählt. Dafür wurden jeweils die ersten 7-8 Nicht-Ausbruchs isolate aus jedem Quartal des jeweiligen Jahres entsprechend des Abnahmedatums und der Station ermittelt, um insgesamt 30 Isolate pro Jahr als Probenpool zu erfassen. Es wurden demzufolge die ersten 7 auftretenden Isolate im ersten Quartal beginnend am 01. Januar, die ersten 8 auftretenden Isolate im zweiten Quartal beginnend am 01. April, die ersten 7 auftretenden Isolate im dritten Quartal beginnend am 01. Juli und die ersten 8 auftretenden Isolate im vierten Quartal beginnend am 01. Oktober ausgewählt. Als Nicht-Ausbruchs isolate wurden Isolate bezeichnet, für welche weder räumlich noch zeitlich ein epidemiologischer Zusammenhang zu erkennen war. Bei diesen insgesamt 120 VREfm-Isolaten wurden Alter, Geschlecht, Liegezeit, Liegezeit der

Patienten bei Probenentnahme, die Probenentnahmestelle sowie die Art der Station aus dem Laborinformationssystem erfasst. Anhand der Probenentnahmestelle wurde definiert, ob die mikrobiologische Untersuchung aus klinisch-diagnostischem oder infektionspräventivem (Screeninguntersuchungen auf VRE) Anlass durchgeführt worden war. Da die Isolate im Rahmen der Routineüberwachung und Infektionspräventionskontrolle entnommen wurden, lagen keine Informationen vor, ob die klinischen Kulturen von Patienten mit Infektionen oder mit Verdacht auf Infektionen gesammelt wurden. In dieser Studie wurden alle positiven VRE-Nachweise eingeschlossen, unabhängig davon, um welches Material es sich handelte (Screening oder klinisch-diagnostisch). Rektal-, Nasen- und Rachenabstriche wurden als Screening-Material klassifiziert. Alle anderen, wie z.B. Blutkulturen, Wundabstriche, Urinproben oder Stuhlproben, wurden als klinisch-diagnostisches Material eingeordnet. Die verschiedenen Stationen wurden in 4 Bereiche zusammengefasst: Intensivstation, Hämatologie/Onkologie, Chirurgie und „andere“. Letzteres umfasst Normalstationen wie zum Beispiel Nephrologie, Kardiologie und Gastroenterologie. Jedes Isolat wurde nur einem Bereich bzw. einer Stationsart zugeordnet.

Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Bei der Durchführung der bereits beschriebenen Methode zur Auswahl der Isolate wurde im ersten Schritt nur das Abnahmedatum und im zweiten Schritt die Station und der Patient berücksichtigt. Weitere Auswahlkriterien wie z.B. Probenentnahmestelle oder Patienteninformationen wie Alter, Geschlecht, Art der Station und Liegezeit wurden an dieser Stelle nicht berücksichtigt. Isolate wurden aus der Studie ausgeschlossen, wenn es von dem Patienten bereits ein Isolat im Probenpool gab oder die Station in einem Quartal mehrfach vorkam (um epidemiologische Zusammenhänge, z.B. einen Ausbruch, auszuschließen).

Statistische Analysen

Fokus der Untersuchung war das Auftreten und die Verteilung der Sequenz- und Clustertypen der 120 VRE_{fm}-Stämme. Für die deskriptive Statistik wurden Anzahl und Prozent oder Median und Interquartilabstand (IQR) berechnet. Unterschiede

wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test untersucht. Um die Risikofaktoren für das Auftreten spezifischer Sequenz- und Clustertypen abzuschätzen, wurde das logistische Regressionsmodell für eine multivariate Analyse mit den potentiellen Störfaktoren Alter, Geschlecht, Kalenderjahr, Art der Station, Liegezeit bei Probenentnahme und Probenentnahme-Stelle genutzt. Parameter wurden in das Modell eingeschlossen, wenn eine Signifikanz von $p \leq 0.05$ vorlag. Die Berechnung der Signifikanztests erfolgte two-tailed, und $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS (IBM SPSS-Statistik, Somers, USA) und SAS (SASInstitut, Cary, USA) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Ausbruchsanalysen von VREfm-Häufungen 2017-2019

Im Zeitraum von 2017-2019 wurden insgesamt 12 Ausbruchsanalysen mittels Ganzgenomsequenzierung durchgeführt. Bei diesen Ausbrüchen traten die Isolate der einzelnen Untersuchungen zeitlich und räumlich gehäuft auf und zeigten damit einen epidemiologischen Zusammenhang. Insgesamt wurden 147 Ausbruchsisolate mit einer durchschnittlichen Coverage von 45-119 x sequenziert und für diese wurden Sequenz- und Clustertypen bestimmt. Dabei wurden verschiedene ST (u.a. ST203, ST78, ST80 und ST117) und CT (u.a. CT929, CT894, CT71, CT36, CT1612) ermittelt, wobei der ST117 und CT71 besonders häufig auftraten. Für die jeweilige Ausbruchsanalyse wurde die Anzahl der Gesamtisolate, Anzahl der Isolate mit ST117 und Anzahl der Isolate mit ST117 CT71 erfasst (Tabelle 01). Die Erregerhäufungen betrafen alle 3 Standorte der Charité sowie ein externes Haus, das vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin beraten wird. Bei den jeweiligen Stationen handelte es sich um Fachrichtungen der Intensivmedizin, Anästhesiologie, allgemeinen Chirurgie sowie Hämatologie und Onkologie. Insgesamt wurde für die Hälfte (74/147; 50,3%) aller Ausbruchsisolate ST117 bestimmt. Für die weitere Differenzierung der ST117-Isolate wurden 47,3% (n=35) dem Subtyp CT71 zugeordnet. Für alle CT71-Isolate wurde der Genotyp *vanB* bestimmt. Neben CT71 wurden mehrere Isolate mit CT36 (n=10), CT929 (n=7) und CT1612 (n=6) erfasst (andere CT n≤2). Eine Analyse der Verwandtschaftsbeziehung im paarweisen Vergleich aller ST117-Isolate mittels Minimum Spanning Tree zeigte, dass Isolate verschiedener Ausbruchsanalysen, die räumlich und zeitlich voneinander verschieden waren, dem gleichen Cluster zugeordnet wurden und insgesamt 7 verschiedene ST117-Cluster bildeten (Abbildung 01). Lediglich Cluster ST117-CT117 umfasste Isolate einer einzigen Ausbruchsuntersuchung. Das größte Cluster bildete ST117-CT71 und umfasste Isolate aus 11 Ausbruchsanalysen (4 verschiedene Standorte und 9 verschiedene Stationen). Basierend auf der Distanzmatrix der Isolate zueinander, unter Verwendung von 1423 cgMLST-Targets, belaufen sich die Allelunterschiede im Cluster ST117-CT71 der einzelnen Isolate auf ≤ 5 .

Tabelle 01. VREfm-Ausbruchsanalysen im Zeitraum von 2017-2019 nummeriert aufgelistet nach Anzahl Gesamtisolate, Anzahl ST117-Isolate und ST117-CT71-Isolate (Krankenhaus und Stationen pseudonymisiert)

Ausbruchsanalysen	Gesamtisolate (n)	ST117-Isolate (n)	ST117-CT71-Isolate (n)
Nr. 1 (2017-07, Standort 2, Station A)	28	3	2
Nr. 2 (2017-10, Standort 3, Station B)	24	16	10
Nr. 3 (2018-04, Standort 3, Station C)	2	2	2
Nr. 4 (2018-04, Standort 4, Station D)	38	24	9
Nr. 5 (2018-05, Standort 3, Station E)	8	5	3
Nr. 6 (2018-07, Standort 3, Station C)	10	9	1
Nr. 7 (2019-06, Standort 1, Station F)	5	3	2
Nr. 8 (2019-06, Standort 2, Station A)	3	2	2
Nr. 9 (2019-06, Standort 3, Station G)	10	8	4
Nr. 10 (2019-09, Standort 4, Station J)	10	1	0
Nr. 11 (2019-10, Standort 3, Station H)	6	0	0
Nr. 12 (2019-11, Standort 1, Station I)	3	1	0
Gesamt	147	74	35

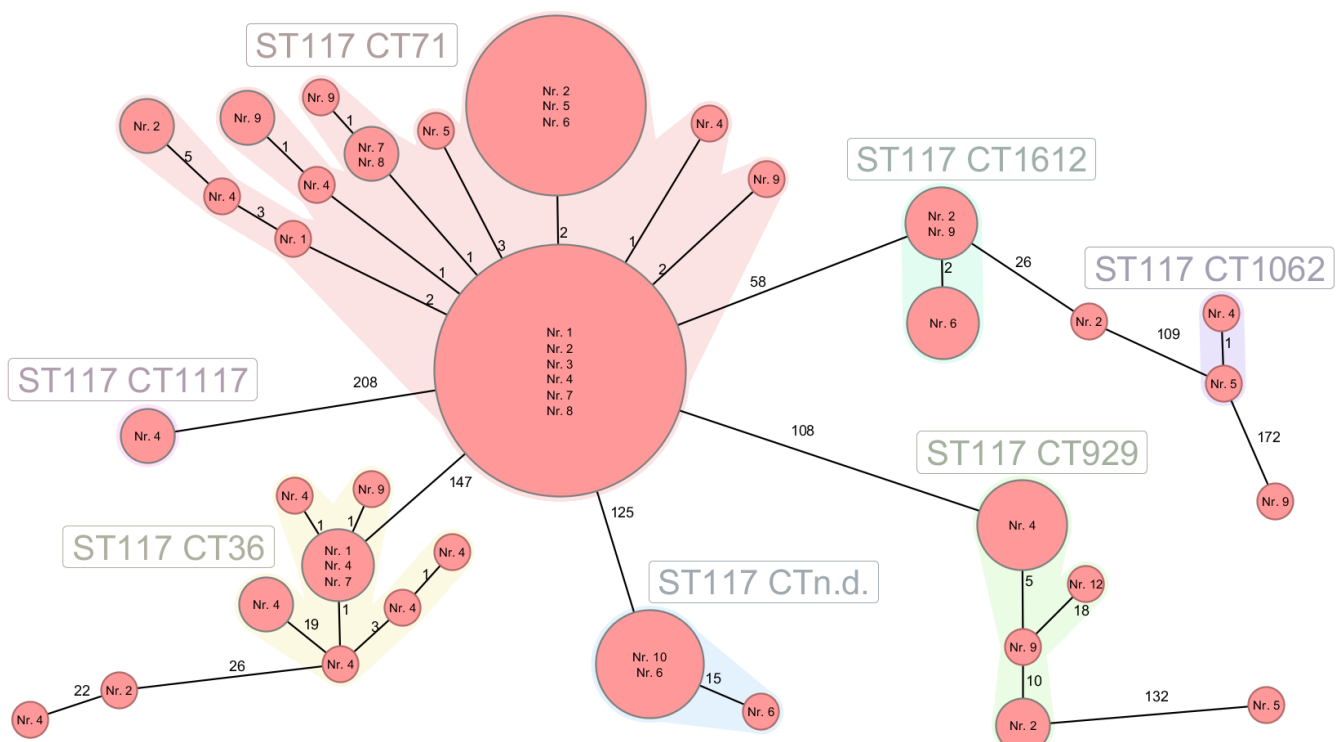


Abbildung 01. Minimum Spanning Tree der ST117-Isolate aller Ausbruchsanalysen (n=74) benannt mit der jeweiligen Ausbruchsanalysennummer, erstellt mit SeqSphere+ (Schwellenwert für Cluster Alleldistanz ≤ 20). Kreise symbolisieren VREfm-Isolate und Größe korreliert mit der Isolatanzahl, bei denen kein Allelunterschied vorliegt. Zahl auf den Verbindungslinien der Kreise beschreibt die Anzahl der Allelunterschiede zwischen den Isolaten, Clusterisolate sind farblich unterlegt, Clusterbezeichnung nach ST und CT (n.d.: nicht definiert).

Retrospektive Studie 2008-2018

In der Studie wurden mittels Ganzgenomsequenzierung für 120 VRE_{fm}-Isolate (Nicht-Ausbruchs isolate) im Zeitraum von 2008-2018 Sequenz- und Clustertypen bestimmt und nach Jahr gruppiert. Es konnte ebenfalls eine Vielzahl verschiedener ST (u.a. ST117, ST203, ST80, ST78, ST192 und ST17) ermittelt werden, wobei der ST117 mit 35,8% insgesamt den größten Anteil der Isolate ausmachte. Dieser Anteil stieg im Zeitraum von 2008 bis 2018 stetig an. Im Jahr 2008 betrug der Anteil der ST117-Isolate 16,7%, im Jahr 2013 30%, im Jahr 2015 40% und im Jahr 2018 56,7% ($p=0,012$). Auf cgMLST-Ebene wurden die ST117-Stämme in Clustertypen differenziert. Im Jahr 2008 repräsentierte CT190 mit 10% den größten Anteil der ST117-Isolate. Im Jahr 2013 war CT24 mit 16,6% der häufigste Typ. Im Jahr 2015 machte CT36 33,3% aller ST117-Isolate aus und 2018 dominierte CT71 mit 43,3%. Einige CT (CT24, CT36 und CT153) traten in mehreren Jahren auf, aber obwohl CT71 nur im Jahr 2018 erfasst wurde, repräsentierte er dort den größten Anteil aller ST117-Isolate. Für 74% aller ST117-Isolate wurde der *vanB* Genotyp identifiziert. Isolate mit *vanA*-Genotyp traten vorrangig in den Jahren 2008 und 2015 auf. Alle CT71-Isolate waren *vanB* positiv. Die Patientencharakteristika der verschiedenen VRE_{fm}-Isolate zeigten, gruppiert nach den Untersuchungsjahren (2008, 2013, 2015 und 2018), keine Unterschiede in Bezug auf Alter, Geschlecht, Liegezeit und Art der Station. Die Dauer der Liegezeit bei Probenentnahme der jeweiligen Patienten hatte in den Jahren von 2008 bis 2018 abgenommen, und im Hinblick auf die Probenentnahmestelle gab es eine Verschiebung von vorrangig klinischen Entnahmeorten in 2008 zu vorrangig Screening-Material in den Jahren 2013, 2015 und 2018. Die Risikofaktorenanalyse lieferte keine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten von ST117-Isolaten. Mittels der Resistenz- und Virulenzfaktorenanalyse wurde ein Set von Faktoren für CT71-Isolate bestimmt (Resistenzgene: Trimethoprim (*dfpG*), Ciprofloxacin (*gyrA*, *parC*), Ampicillin (*pbp5*) und Aminoglykoside (*aac(6)-II*) sowie Makrolide, Lincosamide und Streptogramin B (*msrC*, *erm(B)*, *efmA*); Virulenzfaktoren: Enterokokken-Oberflächenprotein (*esp*), Kollagen-bindende Protein A (*ecbA*), Kollagen-Adhäsionsprotein (*acm*), Zellwand-assoziiertes Protein (*sgrA*) und Glykosid-Hydrolase (*hylEfm*)). Diese Faktoren wurden auch in anderen ST117-Isolaten gefunden. Die Pangenomanalyse wurde mit allen ST117-Isolaten ($n=43$) durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Genen der CT71-Isolate und der

Nicht-CT71-Isolate zu ermitteln. Dabei kam heraus, dass die Isolate ein Kerngenom mit 2166 Genen bildeten und dieses Kerngenom 42% des Pangenoms ausmachte (5252 Gene). Die Pangenom-Matrix (An- und Abwesenheit von Genen) ergab, dass die Verteilung der Gene unter den Isolaten relativ ähnlich war. In Hinblick auf das akzessorische Genprofil der CT71-Isolate konnte eine Diversität zu den anderen CT-Isolaten beobachtet werden. Allerdings konnte keine spezifische Gruppe von Genen ermittelt werden, die charakteristisch für alle CT71-Isolate war. Insgesamt wurden in der Studie 13 CT71-*vanB*-Isolate erfasst. Für diese CT71 gab es keinen Hinweis auf einen epidemiologischen Zusammenhang. Im Maximum Spanning Tree, basierend auf 1423 Kerngenomgenen (cgMLST-Targets), bildeten diese 13 Isolate ein Cluster und unterschieden sich im paarweisen Vergleich in 1-4 Allelen (Abbildung 02) und damit deutlich unter dem in SeqSphere veranschlagten Schwellenwert für die Alleldistanz zur Clusterbildung von ≤ 20 .

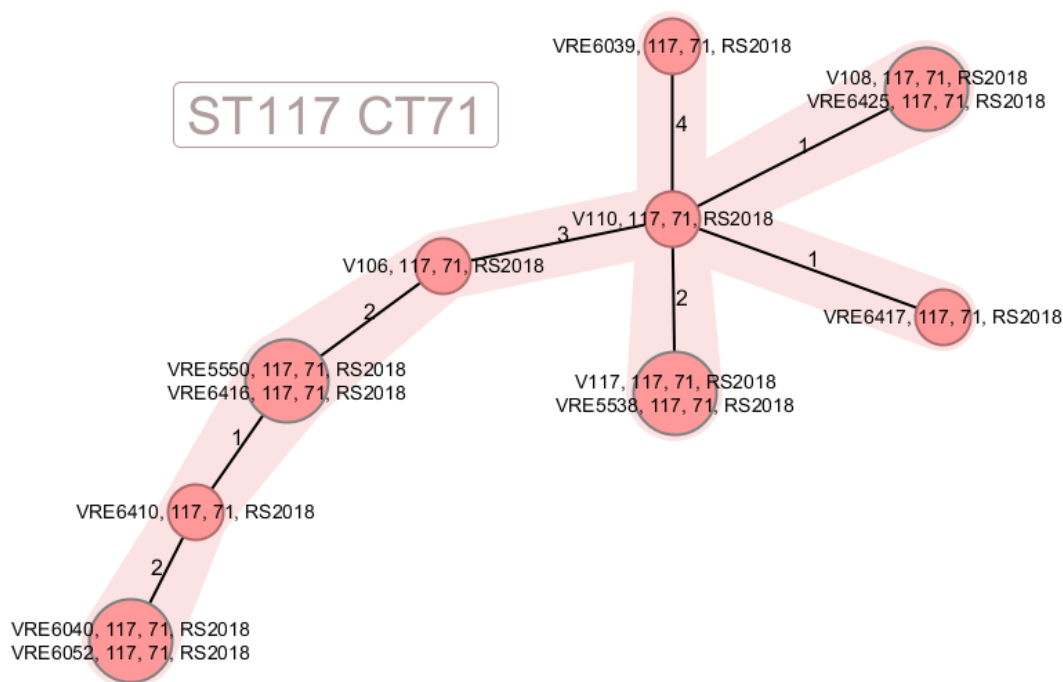


Abbildung 02. Minimum Spanning Tree der 13 ST117-CT71-Isolate der retrospektiven Studie benannt mit Probennummer, ST, CT und Studie, erstellt mit SeqSphere+ (Schwellenwert für Cluster Alleldistanz ≤ 20). Kreise symbolisieren VREfm-Isolate. Mehrere Isolate in einem Kreis zeigen keine Allelunterschiede. Zahl auf den Verbindungslinien der Kreise beschreibt die Anzahl der Allelunterschiede zwischen den Isolaten, Cluster farblich unterlegt.

Vergleich der ST117-CT71-Isolate

In dieser Arbeit wurden insgesamt 267 VREfm-Isolate sequenziert; 120 Nicht-Ausbruchs isolate im Zeitraum von 2008-2018 im Rahmen der retrospektiven Studie und 147 Ausbruchs isolate im Zusammenhang von Häufungen im Zeitraum von 2017-2019. Für 117 Isolate wurde ST117 bestimmt (43,8%). Zudem wurden 41% der ST117-Isolate (48/117) in den Subtyp CT71 differenziert, davon 35 Isolate der Ausbruchs analysen 2017-2019 und 13 Nicht-Ausbruchs isolate aus der retrospektiven Studie. Alle CT71-Isolate traten nach 2017 auf und waren alle *vanB* positiv. Unabhängig von epidemiologischen Zusammenhängen bildeten alle CT71-Isolate im Maximum Spanning Tree ein Cluster mit einer Alleldistanz von jeweils ≤ 4 (paarweiser Vergleich zwischen den einzelnen Isolaten). Der Neighbor Joining Tree aller CT71-Isolate (n=48), der der Kombination der Distanzmatrix mit einem Sequenzevolutionsmodell zugrunde liegt, zeigt, dass die CT71-Isolate zwei große Äste mit jeweiligen weiteren Abzweigungen bilden (Abbildung 03). Es ist ersichtlich, dass sich einige Isolate der verschiedenen Ausbruchs analysen zusammen gruppieren und keine Targetunterschiede zeigen und andere Isolate davon verschieden sind. So sind z.B. zwei Isolate der Ausbruchs analyse Nr. 2 in keinem Target verschieden, aber die anderen Isolate von Nr. 2 einem anderen Ast im Baum zuzuordnen und einige davon ebenfalls in keinem Target verschieden. Darüber hinaus sind die Isolate der retrospektiven Studie aus dem Jahr 2018 im Baum über beide Äste und deren Abzweigungen verteilt. Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Isolate maximal in 12-13 Targets und liegen damit deutlich unter dem Schwellenwert von 20 Targets Unterschied für die Clusterbildung auf Basis von 1423 Targets.

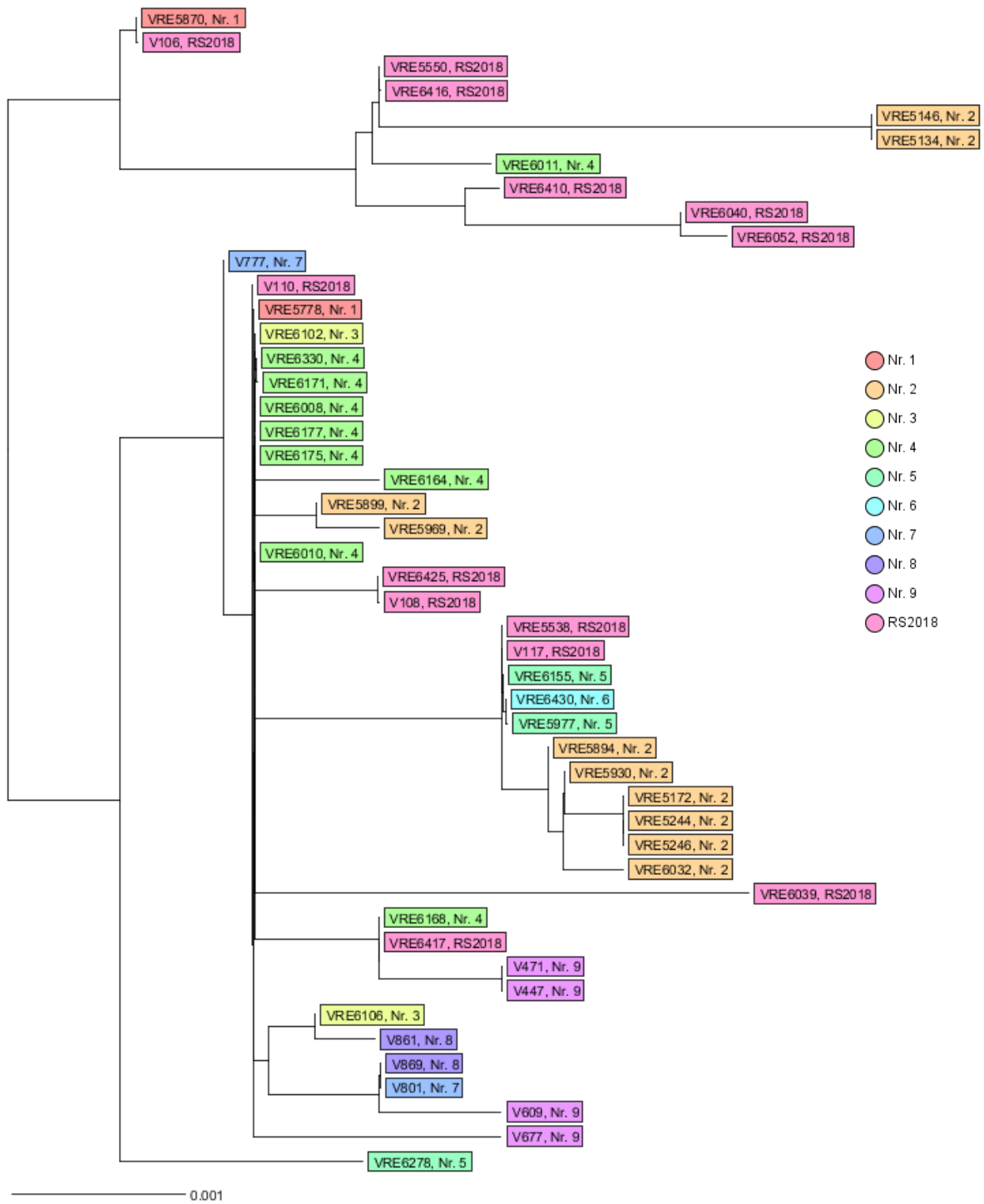


Abbildung 03. Neighbor Joining Tree mit 48 CT71-Isolaten, gefärbt und benannt nach Ausbruchsanalyse- und retrospektive Studie (RS) aus dem Untersuchungsjahr 2018, erstellt mit SeqSphere+ (Maßstabslänge 0,001 entspricht 1,4 cgMLST-Targets Unterschied, *E.faecium* Schema 1423 Targets).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es seit 2008 eine stetige Zunahme von VREfm-ST117-Isolaten an der Charité - Universitätsmedizin Berlin gibt. ST117 umfasste 44% aller untersuchten Isolate und war in Ausbruchsanalysen der häufigste Sequenztyp. Deutschlandweit wurden in den letzten Jahren VREfm-Ausbrüche im Zusammenhang mit dem Auftreten von ST117 beschrieben (32, 33). Vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken wurden bereits in den Jahren 1998 und 1999 ST117-Isolate von verschiedenen Einsendern aus Deutschland mittels MLST erfasst. In den darauffolgenden Jahren wurde vereinzelt das Vorkommen von ST117 erwähnt, aber über eine Auffälligkeit im Verhältnis zu den anderen Sequenztypen, wie z.B. das dominante Vorkommen von ST203 in den Jahren 2003 und 2004, wurde zunächst nicht berichtet (34, 35). Im Report aller Einsendungen aus den Jahren 2011 und 2012 wurde der ST177 neben ST203 und ST192 zu den häufigsten Typen gezählt (36). In den weiteren Jahren kam es zu einem Anstieg des ST117 und im Jahr 2018 berichtete das NRZ, dass der ST117 58% aller Einsendungen deutschlandweit ausmachte (37-39). Das Vorkommen von ST117 wurde auch in anderen europäischen Ländern, z.B. in Italien, Dänemark, Norwegen und den Niederlanden geschildert (40-43). Berichten zufolge ist der ST117 in der Schweiz und in Spanien endemisch geworden (44, 45). Der Sequenztyp 117 wird der Krankenhaus-assoziierten VREfm-Klade A1 zugeordnet. Diese Klade A1 umfasst epidemische Krankenhausstämme, die häufig in Zusammenhang mit humanen Infektionen stehen und u.a. eine höhere Mutationsrate als andere VREfm-Isolate aufzeigen (46, 47). Möglicherweise entwickelte sich diese Linie vor mehreren Jahren aus der VREfm-Population aufgrund von Nischen, die durch den menschlichen Einfluss begünstigt wurden. Die aktuelle Studienlage zeigt, dass neben ST117 die häufigsten ST in Deutschland ST80, ST203, ST78 und ST192 sind. Laut einer großen Studie im Zeitraum von 1986-2012 und in 27 Ländern sind ST17, ST18 und ST78 weltweit die häufigsten VREfm-Linien, die in Zusammenhang mit Ausbrüchen stehen (48).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass in den Jahren von 2017 bis 2019 ein spezifischer VREfm-ST117-Stamm, ST117-CT71-*vanB*, vermehrt vorgekommen ist. Unsere Daten zeigen, dass es sich nicht um ein lokales Geschehen in einem Haus der Charité - Universitätsmedizin Berlin handelt, sondern eher um ein regionales Geschehen, da alle 3 Standorte betroffen sind und diese geografisch entfernt von einander liegen. Dabei lassen sich keine epidemiologischen Zusammenhänge, wie z.B. bei klassischen Ausbrüchen, zwischen den entsprechenden Isolaten erkennen. Trotz intensiver Analyse der Genome der CT71-Isolate im Vergleich zu den anderen ST117-Isolaten konnten keine charakteristischen Merkmale (Patientencharakteristika, Resistenzgene oder Virulenzfaktoren) ermittelt werden, die die Dominanz dieses Subtyps erklären. Die Pangenomanalyse aller ST117-Isolate, um Unterschiede zwischen den Genen der CT71-Isolate und Nicht-CT71-Isolate zu untersuchen, lieferte ebenfalls keine Erklärung für das dominante Auftreten von CT71. Auch in anderen Regionen von Deutschland wurde das gehäufte Auftreten von CT71 (*vanB*) beschrieben, vor allem im Rahmen von Ausbrüchen (32, 33, 49). Das NRZ berichtete, dass von den deutschlandweit eingesendeten Isolaten aus Blutkulturen in den Jahren 2015 und 2016 CT36 (15%), CT71 (13%) und CT469 die häufigsten Clustertypen waren. Im Jahr 2018 stieg der Anteil von CT71 von allen eingesendeten Blutkulturisolaten auf 39%. Diese Isolate stammten aus verschiedenen Bundesländern, sowohl in Nord- als auch Süddeutschland (39). Daraus lässt sich schließen, dass das Auftreten des CT71 keine lokale Häufung an der Charité bzw. regionale Häufung in Berlin beschreibt, sondern ein überregionales Geschehen. In einer großen Studie zur Bewertung der Prävalenz von VREfm bei Aufnahme der Patienten im Krankenhaus mittels Rektalabstrich oder Stuhlprobe wurde gezeigt, dass die Prävalenz von 0,8% im Jahr 2014 auf 2,6% im Jahr 2018 stetig angestiegen ist. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass von den untersuchten VREfm-Isolaten von 6 geografisch getrennten Studienorten der ST117-CT71-*vanB* der häufigste Typ bei Aufnahme ins Krankenhaus war (50). Möglicherweise ist also die deutschlandweite Zunahme von VREfm in medizinischen Einrichtungen in den letzten Jahren durch den erhöhten Eintrag von spezifischen VREfm-Stämmen ins Krankenhaus geprägt. Mit steigender Zahl an kolonisierten Patienten im Krankenhaus geht ein erhöhtes Transmissionsrisiko einher. Eine erhöhte Prävalenz in einer vulnerablen Patientengruppe könnte vermehrt zu Infektionen führen und sollte mit

Maßnahmen zur Infektionskontrolle vermieden werden (50, 51). Andere Studien haben ebenfalls CT71-Isolate in Bezug auf Virulenzfaktoren untersucht, die einen Vorteil im Vergleich zu anderen Isolaten darstellen könnten. Neben den bekannten Faktoren für virulente Enterokokken Stämme wie z.B. das Enterokokken-Oberflächenprotein (*esp*) und Kollagen-bindende Protein A (*ecbA*), die auch in Nicht-CT71-Isolaten detektiert wurden, gab es keine Auffälligkeiten (52, 53). Nichtsdestotrotz könnte das Zusammenspiel eines Sets von Faktoren einen Vorteil für ST117-CT71-*vanB*-Klone darstellen (33, 49). ST117-CT71 ist mittlerweile bundesweit verbreitet und andere CT sind eher lokal bzw. regional vertreten, z.B. CT36, CT469 und CT929 (33, 38, 39, 49, 50). In verschiedenen Krankenhäusern in Bayern wurde neben ST117-CT71-*vanB* auch ein endemisches Auftreten von Klonen der Linie ST80-CT1065-*vanB* und ST78-CT894*-*vanA* in Zusammenhang mit nosokomialen Ausbrüchen geschildert (CT894*-Cluster: Gruppe von CT894, CT2055, CT2480 und CT2477) (49). Weiterhin sollte beobachtet werden, welche Linien sich neben ST117-CT71-*vanB* in Deutschland abbilden.

Die Ergebnisse der retrospektiven Studie verdeutlichen, dass Isolate mit ST117-CT71 nicht nur im Zusammenhang mit den untersuchten Ausbrüchen auftraten. Der ST117 kam bereits im Jahr 2008 vor und stieg im Zeitraum von 2008 bis 2018 an. VREfm mit ST117-CT71 wurden erst im Zeitraum von 2017-2019 erfasst. Dabei handelte es sich sowohl um Ausbruchs isolate als auch um Nicht-Ausbruchs isolate. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Stamm ST117-CT71 endemisch ist.

Limitationen

In dieser Arbeit wurde für eine Vielzahl von VREfm-Isolaten eine ausführliche Charakterisierung zur Untersuchung der molekularen Epidemiologie von VREfm an der Charité - Universitätsmedizin durchgeführt, allerdings ist die retrospektive Studie durch die geringe Anzahl an VREfm-Isolaten limitiert. 30 Isolate aus jedem Untersuchungsjahr repräsentieren nur einen kleinen Teil aller Isolate und können somit das Bild und die statistischen Analysen verzerren. Darüber hinaus fehlen für diese Isolate ausführliche Patienteninformationen, z.B. zum Krankheitsbild, Komorbiditäten, Medikamenteneinnahme bzw. Antibiotikatherapie und Aufnahmen in anderen medizinischen Einrichtungen. Daten zu Ausbruchsanalysen von VREfm-Häufungen

mittels Ganzgenomsequenzierung aus den Jahren 2008-2016 liegen nicht vor. Eine weitere Limitation stellen die verwendeten Datenbanken dar. Für die Analyse der Resistenzgene und Virulenzfaktoren können nur bereits bekannte Informationen erfasst werden. Faktoren, die bis jetzt noch nicht beschrieben und daher nicht in der Datenbank vorhanden sind, bleiben unerkannt und können nicht ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde für die cgMLST-Analyse das publizierte Schema für *E. faecium* in der SeqSphere+ Software mit dem empfohlenen Schwellenwert der Alleldistanz von ≤ 20 Unterschied zur Clusterbestimmung genutzt (30). Da die ST177-Isolate genetisch sehr ähnlich sind, sollte der Schwellenwert je nach Ausbruchsuntersuchung möglicherweise angepasst werden. Falgenhauer und Kollegen nutzen für die cgMLST-Analyse ebenfalls das publizierte Schema, aber einen Schwellenwert für die Alleldistanz von ≤ 10 . Unsere Ergebnisse weichen in Bezug auf das CT71-Cluster unter Verwendung einer Alleldistanz von ≤ 10 nicht ab. In Bezug auf die ST117-Isolate der Ausbruchsanalysen (Abbildung 01) würden bei dem kleineren Schwellenwert insgesamt 3 Isolate aus dem entsprechenden Cluster fallen. Darüber hinaus können mit dem cgMLST-Schema für *E. faecium* auch verschiedene CT ein Cluster bilden, wie eine Studie bereits gezeigt hat (49). CT894*-Cluster umfasste 4 verschiedene CT, die innerhalb der definierten Grenze von ≤ 20 Unterschiede in den Allelen liegen. Daher sollte für die Clusteranalyse nicht nur die Nomenklatur als Grundlage zur Bewertung genutzt werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit sind zukünftige VREfm-Häufungen mit ST117-CT71-*vanB* an der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter genauer Berücksichtigung der epidemiologischen Zusammenhänge zu bewerten. Da der Stamm endemisch ist, können Patienten in einem Geschehen zufälligerweise ST117-CT71-Träger sein, aber es könnten auch Transmissionsereignisse vorliegen und müssen daher genau beurteilt werden. Eine Ausbruchsbewertung darf nicht alleine auf Grundlage der WGS-Ergebnisse erfolgen. Mit dieser Arbeit wurde bestätigt, dass die molekularbiologische Analyse von Erregerhäufungen bzw. Ausbrüchen sehr wertvoll für die Einschätzung und die sich daraus ergebenden Maßnahmen ist. Durch die hohe Diskriminierung der Ganzgenomsequenzierung können Häufungen näher beleuchtet werden. In einigen Fällen können monoklonale Ausbrüche in polyklonale

Geschehnisse gegliedert werden, und folglich zielführendere Maßnahmen für einzelne Patienten ermöglichen und negative Folgen von Ausbrüchen für Patienten, das Personal und die medizinische Einrichtungen abschwächen (54). Auch wenn es schon einige Studien zur Beschreibung der molekularen Epidemiologie von VREfm gibt, ist die stetige Zunahme von VREfm und das gehäufte Auftreten verschiedener Linien, z.B. ST117-CT71-*vanB* noch nicht aufgeklärt und muss weiterhin beobachtet und untersucht werden. Zukünftige Studien sollten vermehrt Plasmide und mobile Elemente untersuchen, da diese für das Auftreten und der Persistenz von Antibiotikaresistenzen relevant sein können. Dafür sollte das Potential bioinformatischer Tools und Datenbanken ausgeschöpft werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut (KRINKO). Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. 2018;61:1310-61.
2. DiazGranados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(3):327-33.
3. Gastmeier P, Schroder C, Behnke M, Meyer E, Geffers C. Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(6):1660-4.
4. Kramer TS, Remschmidt C, Werner S, Behnke M, Schwab F, Werner G, Gastmeier P, Leistner R. The importance of adjusting for enterococcus species when assessing the burden of vancomycin resistance: a cohort study including over 1000 cases of enterococcal bloodstream infections. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2018;7:133.
5. Remschmidt C, Schroder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2018;7:54.
6. Faron M, Ledebner N, Buchan B. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) in the Health Care Setting. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54:JCM.00211-16.
7. Markwart R, Willrich N, Haller S, Noll I, Koppe U, Werner G, Eckmanns T, Reuss A. The rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Germany: data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS). *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019;8:147.
8. Maechler F, Geffers C, Schwab F, Peña Diaz LA, Behnke M, Gastmeier P. Entwicklung der Resistenzsituation in Deutschland. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2017;112(3):186-91.
9. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(3):318-27.
10. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019. 2019:Available at <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf> [Accessed 23.11.20].
11. Albrich WC, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *The Lancet Infectious diseases*. 2008;8(5):289-301.
12. Maragakis LL, Perencevich EN, Cosgrove SE. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(5):751-63.
13. Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nietzsche-Tiemann F, Zuschneid I, Groneberg K, Rüdén H. Der Beitrag von Ausbruchsanalysen zur

- Prävention nosokomialer Infektionen. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 2004;47(4):334-8.
14. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4):20380.
 15. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews Microbiology.* 2013;11(10):728-36.
 16. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics.* 2016;17(6):333-51.
 17. Nadon C, Van Walle I, Gerner-Smidt P, Campos J, Chinen I, Concepcion-Acevedo J, Gilpin B, Smith AM, Man Kam K, Perez E, Trees E, Kubota K, Takkinen J, Nielsen EM, Carleton H. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill.* 2017;22(23).
 18. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;67(11):2640-4.
 19. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FS, Wright GD, McArthur AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research.* 2017;45(D1):D566-d73.
 20. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J-M. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(1):212-20.
 21. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology.* 2014;52(5):1501-10.
 22. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic acids research.* 2016;44(D1):D694-7.
 23. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(7):3895-903.
 24. Schwengers O, Barth P, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, Goesmann A. Platon: identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microbial genomics.* 2020;6(10).
 25. Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, Tai C, Deng Z, Ou H-Y. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic acids research.* 2018;47(D1):D660-D5.
 26. Sheppard AE, Stoesser N, German-Mesner I, Vegesana K, Sarah Walker A, Crook DW, Mathers AJ. TETyper: a bioinformatic pipeline for classifying variation and genetic contexts of transposable elements from short-read whole-genome sequencing data. *Microbial genomics.* 2018;4(12).

27. van Bloois LvdG, Wagenaar JA, Zomer AL. RFPlasmid: Predicting plasmid sequences from short read assembly data using machine learning. *bioRxiv*. 2020:2020.07.31.230631.
28. Carriço JA, Rossi M, Moran-Gilad J, Van Domselaar G, Ramirez M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(4):342-9.
29. Schwengers O, Hoek A, Fritzenwanker M, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, Goesmann A. ASA3P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher-level analysis of closely related bacterial isolates. *PLoS computational biology*. 2020;16(3):e1007134.
30. de Been M, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, van Schaik W, Brouwer E, Rogers M, Kraat Y, Bonten M, Corander J, Westh H, Harmsen D, Willems RJ. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High-Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(12):3788-97.
31. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(22):3691-3.
32. Liese J, Schule L, Oberhettinger P, Tschorner L, Nguyen T, Dorfel D, Vogel W, Marschal M, Autenrieth I, Willmann M, Peter S. Expansion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Academic Tertiary Hospital in Southwest Germany: a Large-Scale Whole-Genome-Based Outbreak Investigation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(5).
33. Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Steul K, Scherer M, Rhine-Main Vsg, Heudorf U, Chakraborty T. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST117/CT71/vanB -clone in the Rhine-Main metropolitan area of Germany. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019;8:128.
34. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, Fahr AM, Eigner U, Witte W. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2005;24(12):815-25.
35. Klare I, Werner G, Witte W, Fahr AM, Vonberg RP. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007 - Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. 2008;Epidemiologisches Bulletin(23):179-92.
36. Klare I, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011-2012. 2013;Epidemiologisches Bulletin (33):303-12.
37. Klare I, Werner G. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) in Deutschland - Update 2013/2014. 2015;Epidemiologisches Bulletin(40):429-38.
38. Klare I, Bender JK, Koppe U, Abu Sin M, Eckmanns T, Werner G. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland - Update 2015/2016. 2017;Epidemiologisches Bulletin(46):519-27.
39. Klare I, Bender JK, Marktwart R, Reuss A, Abu Sin M, Eckmanns T, Werner G. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-

- resistenten Enterokokken in Deutschland - Update 2017/2018. 2019;Epidemiologisches Bulletin(35):365-72.
40. Fioriti S, Simoni S, Caucci S, Morroni G, Ponzio E, Coccitto SN, Brescini L, Cirioni O, Menzo S, Biavasco F. Trend of clinical vancomycin-resistant enterococci isolated in a regional Italian hospital from 2001 to 2018. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020:1-7.
41. Pinholt M, Bayliss SC, Gumpert H, Worning P, Jensen VVS, Pedersen M, Feil EJ, Westh H. WGS of 1058 *Enterococcus faecium* from Copenhagen, Denmark, reveals rapid clonal expansion of vancomycin-resistant clone ST80 combined with widespread dissemination of a vanA-containing plasmid and acquisition of a heterogeneous accessory genome. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019;74(7):1776-85.
42. Hegstad K, Longva JA, Hide R, Aasnaes B, Lunde TM, Simonsen GS. Cluster of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* ST117 in Norwegian hospitals. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2014;46(10):712-5.
43. Zhou X, Chlebowicz MA, Bathoorn E, Rosema S, Couto N, Lokate M, Arends JP, Friedrich AW, Rossen JWA. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(12):3259-67.
44. Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Rodriguez MC, Rodriguez-Banos M, Lanza VF, Derdoy L, Cardenas Zurita G, Loza E, Canton R, Baquero F, Coque TM. Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995-2015) in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(1):48-55.
45. Abdelbary MHH, Senn L, Greub G, Chaillou G, Moulin E, Blanc DS. Whole-genome sequencing revealed independent emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing sequential outbreaks over 3 years in a tertiary care hospital. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2019;38(6):1163-70.
46. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, Corander J, Cheng L, Saif S, Young S, Zeng Q, Wortman J, Birren B, Willems RJ, Earl AM, Gilmore MS. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio*. 2013;4(4).
47. Raven KE, Reuter S, Reynolds R, Brodrick HJ, Russell JE, Török ME, Parkhill J, Peacock SJ. A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. *Genome research*. 2016;26(10):1388-96.
48. Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, Sánchez-Valenzuela A, Sundsfjord A, Hegstad K, Werner G, Sadowy E, Hammerum AM, Garcia-Migura L, Willems RJ, Baquero F, Coque TM. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(12):3351-66.
49. Eisenberger D, Tuschak C, Werner M, Bogdan C, Bollinger T, Hossain H, Friedrich P, Hussein Z, Pöhlmann C, Würstl B, Nickel S, Lehner-Reindl V, Höller C, Liebl B, Valenza G. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(6):1398-404.

50. Xanthopoulou K, Peter S, Tobys D, Behnke M, Dinkelacker AG, Eisenbeis S, Falgenhauer J, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Gölz H, Häcker G, Higgins PG, Imirzalioglu C, Käding N, Kern WV, Kramme E, Kola A, Mischnik A, Rieg S, Rohde AM, Rupp J, Tacconelli E, Vehreschild M, Walker SV, Gastmeier P, Seifert H. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonizing patients on hospital admission in Germany: prevalence and molecular epidemiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(10):2743-51.
51. Vehreschild M, Haverkamp M, Biehl LM, Lemmen S, Fatkenheuer G. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection*. 2019;47(1):7-11.
52. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(6):533-40.
53. Soheili S, Ghafourian S, Sekawi Z, Neela V, Sadeghifard N, Ramli R, Hamat RA. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:623174.
54. Leistner R. Ausbrüche infektiöser Erkrankungen im Krankenhaus – ein Ratgeber. *Krankenhaushygiene up2date*. 2018;13(02):203-21.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna Weber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der molekularen Epidemiologie von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* Stämmen an der Charité - Universitätsmedizin Berlin [Investigation of the molecular epidemiology of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains at Charité - Universitätsmedizin Berlin] 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.

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

9 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Anna Weber hatte folgenden Anteil an der nachfolgenden Publikation:

Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2020;9(1):109.

Beitrag im Einzelnen:

- Mitwirken bei der Entwicklung und Planung der Durchführung
- Generierung der experimentellen Daten
- Durchführung der Genomsequenzierung aller Isolate
- Erfassen von Daten aus dem Laborinformationssystem
- Bioinformatische Datenanalyse und Auswertung
- Literaturrecherche, Verfassen des ersten Entwurfs des Manuskripts der Publikation + Einreichen des Manuskripts beim Journal
- Ergebnisauswertung und Erstellen von Abbildungen und Tabellen:
 - o Abbildung 1 (Frequency of different STs)
 - o Abbildung 2 (Increase in ST117 strains in 2008, 2013, 2015 and 2018; Pie chart + bar chart)
 - o Tabelle 1 (Patient characteristics among non-ST117 and ST117 carriers per year)
 - o Tabelle S2 (Resistance genes and virulence factors of 43 ST117 strains)
 - o Abbildung S1 (Proportion of vanA and vanB genotype of ST117 strains from 2008 to 2018)

(Die Abbildungen S2 und S3 sind in Zusammenarbeit mit Dr. med. Friederike Maechler entstanden. Die statistische Analyse und Tabelle S1 wurde von Dr. rer. medic. Frank Schwab erstellt.)

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PUBLIC, ENVIRONMENTAL and OCCUPATIONAL HEALTH"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 285 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Lancet Global Health	6,109	15.873	0.034250
2	MMWR-MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT	26,534	14.874	0.098040
3	Lancet Public Health	799	11.600	0.003770
4	Annual Review of Public Health	6,769	10.776	0.011700
5	Analytic Methods in Accident Research	669	9.333	0.002420
6	ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES	42,165	8.049	0.039510
7	INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY	23,097	7.339	0.050810
8	BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION	15,736	6.818	0.018090
9	EUROPEAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY	7,785	6.529	0.016950
10	EPIDEMIOLOGIC REVIEWS	3,477	6.455	0.003470
11	JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART B-CRITICAL REVIEWS	1,753	6.436	0.001470
12	TOBACCO CONTROL	8,343	6.221	0.019190
13	AMERICAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH	39,861	5.381	0.065480
14	Journal of Occupational Health Psychology	4,093	5.128	0.005410
15	CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION	19,542	5.057	0.031380
16	ENVIRONMENTAL RESEARCH	16,339	5.026	0.025480
17	PALLIATIVE MEDICINE	5,682	4.956	0.009860
18	Travel Medicine and Infectious Disease	1,576	4.868	0.004660
19	EPIDEMIOLOGY	13,114	4.719	0.019010
20	INDOOR AIR	4,851	4.710	0.005620

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	JOURNAL OF CLINICAL EPIDEMIOLOGY	27,514	4.650	0.029080
22	AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY	37,816	4.473	0.039390
23	Environmental Health	5,272	4.430	0.010550
24	Evolution Medicine and Public Health	373	4.400	0.001570
25	INTERNATIONAL JOURNAL OF HYGIENE AND ENVIRONMENTAL HEALTH	4,852	4.379	0.007830
26	JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE	2,229	4.155	0.003410
27	JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH	15,535	3.957	0.029260
28	JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY AND COMMUNITY HEALTH	14,305	3.872	0.017690
29	MEDICAL CARE	20,250	3.795	0.021130
30	NICOTINE & TOBACCO RESEARCH	9,737	3.786	0.023650
31	Current Pollution Reports	281	3.762	0.000670
32	AIDS PATIENT CARE AND STDS	3,526	3.742	0.006900
33	JOURNAL OF HOSPITAL INFECTION	7,963	3.704	0.010250
34	OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE	8,820	3.556	0.009890
35	DRUG SAFETY	5,301	3.526	0.006980
36	SCANDINAVIAN JOURNAL OF WORK ENVIRONMENT & HEALTH	5,026	3.491	0.005010
37	PREVENTIVE MEDICINE	16,004	3.449	0.029820
38	LGBT Health	764	3.307	0.003720
39	ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY AND HEALTH	3,494	3.252	0.003310
40	Antimicrobial Resistance and Infection Control	1,294	3.224	0.004910
41	HEALTH & PLACE	6,327	3.202	0.009880
42	Clinical Epidemiology	2,684	3.178	0.010800

11 Publikation

Die Publikation ist auf den folgenden Seiten (Seite 35-43) abgebildet:

Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2020;9(1):109.

RESEARCH

Open Access

Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018



Anna Weber^{*} , Friederike Maechler, Frank Schwab, Petra Gastmeier and Axel Kola

Abstract

Background: In addition to an overall rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm), an increase in certain strain types marked by sequence type (ST) and cluster type (CT) has been reported in Germany over the past few years. Outbreak analyses at Charité - Universitätsmedizin Berlin revealed the frequent occurrence of VREfm ST117 CT71 isolates in 2017 and 2018. To investigate whether ST117 CT71 have emerged in recent years or whether these strains have been circulating for a longer time, we retrospectively analyzed non-outbreak strains that occurred between 2008 and 2018 to identify frequent STs and CTs.

Methods: In total, 120 VREfm isolates obtained from clinical and surveillance cultures from the years 2008, 2013, 2015, and 2018 were analyzed. Thirty isolates per year comprising the first 7–8 non-outbreak isolates of each quarter of the respective year were sequenced using whole genome sequencing. MLST and cgMLST were determined as well as resistance genes and virulence factors. Risk factors for VREfm ST117 were analyzed in a multivariable analysis with patient characteristics as possible confounders.

Results: The percentage of VREfm of type ST117 increased from 17% in 2008 to 57% in 2018 ($p = 0.012$). In 2008, *vanA* genotype accounted for 80% of all ST117 isolates compared to 6% in 2018. *VanB* CT71 first appeared in 2018 and predominated over all other ST117 at 43% ($p < 0.0001$).

The set of resistance genes (*msrC*, *efmA*, *erm(B)*, *dfpG*, *aac(6)-II*, *gyrA*, *parC* and *pbp5*) and virulence factors (*acm*, *esp*, *hylEfm*, *ecbA* and *sgrA*) in CT71 was also found in other ST117 non-CT71 strains, mainly in CT36. The study population did not differ among the different calendar years analyzed in terms of age, gender, length of stay, or ward type (each $p > 0.2$).

Conclusion: This study revealed an increase in ST117 strains from 2008 to 2018, accompanied by a shift toward CT71 strains with the *vanB* genotype in 2018. We did not detect resistance or virulence traits in CT71 that could confer survival advantage compared to other CTs among ST117 strains. To date, it is not clear why ST117 and in particular strain type ST117 CT71 predominates over other strains.

Keywords: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, Whole genome sequencing, ST117, CT71, Virulence factors, Resistance genes

* Correspondence: anna.weber@charite.de

Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Charité –
Universitätsmedizin Berlin, Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin, Germany



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

In recent years, Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have been on the rise among hospitalized patients in Germany [1]. Infections with VRE may result in an increased length of stay, higher mortality, and greater costs of hospitalization [2]. Risk factors for colonization or infection by VRE include long periods of hospitalization, increased antibiotic consumption, co-morbidities, immunosuppression, and exposure to patients colonized or infected with VRE [3]. Patients colonized with VRE and the patient environment may represent reservoirs for transmission because of the tenacity of VRE and its long survival time on dry surfaces [3, 4]. Vancomycin resistance is mediated through different genotypes of a gene cluster, *vanA* to *vanN*, which are located on plasmids or in the chromosome [5, 6]. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) is able to acquire plasmids and insertion elements rapidly. Consequently a variety of resistance and virulence genotypes have emerged [7].

In recent years, the German National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci has reported the frequent occurrence of VREfm strains of sequence type ST117 as determined by multi-locus sequence typing (MLST). Of their collection of 91 isolates from blood samples in 2016, more than half were ST117 [8]. Further analysis of ST was based on core genome multi-locus sequence typing (cgMLST), which identified frequent sub-clusters CT71 and CT36 [8].

Unpublished outbreak analyses at Charité - Universitätsmedizin Berlin (Charité) also revealed the frequent occurrence of VREfm ST117 CT71 isolates in 2017 and 2018. In order to understand the local epidemiology and strain characteristics, we investigated whether ST117 (and more specifically ST117 CT71) has only emerged in recent years or whether these strains have instead been circulating for a longer time and have been identified more often through the broad use of molecular typing methods.

Thus, we retrospectively analyzed trends in ST and CT types among non-outbreak strains in the past decade.

Methods

Study population

We retrospectively analyzed VREfm cultures, clinical and surveillance, routinely collected at Charité at five-year intervals in 2008, 2013, and 2018. The first 7–8 consecutive non-outbreak isolates per quarter from all Charité wards were included, comprising VRE positive clinical or screening cultures from individual patients. Because a recent publication suggested an increase in CT71 in Germany between 2015 and 2016 [8], isolates collected in 2015 were included according to the

protocol mentioned above, resulting in 30 isolates per year and a total number of 120 isolates. The Charité is a 3000 bed, acute care facility and has three hospital sites located in three different districts of the city. The isolates in this study were obtained from all three sites. Charité screening protocols did not change over the study period and required surveillance cultures from previously known VRE carriers, all patients admitted to hematology/oncology wards, and patients that shared a room with a VRE carrier.

We retrieved epidemiological data from the patient data management system and included patient age and sex, date of sampling, ward, length of stay (LOS) at the time of specimen collection, and specimen collection site.

In our analysis, we included both clinical and screening cultures. Due to Data Protection Regulations, we lack the necessary data to diagnose associated infections. VREfm samples comprised rectal swabs ($n = 76$, 63%), blood cultures ($n = 7$, 6%), urine samples ($n = 15$, 13%), wound swabs ($n = 5$, 4%), stool samples ($n = 9$, 8%), nasal- and throat swabs ($n = 2$, 2%), and other clinical cultures ($n = 5$, 4%). Rectal swabs, throat swabs, and nasal swabs were considered screening specimens, all others were considered clinical specimens. Wards were divided into four categories: intensive care unit (ICU), hematology/oncology, surgery, and others. The latter category included standard care wards such as nephrology, cardiology and gastroenterology. Multiple assignment of one sample to different categories of ward type was not allowed.

Determination of VRE was performed using chromID® VRE agar plates (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and disc diffusion method with 5 µg vancomycin and 30 µg teicoplanin from MASTDISCS® (Mast Group Ltd., Bottle, United Kingdom) as recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). In addition, we tested for the presence of *van* genes (*vanA*, *vanB* and *vanC*) using multiplex PCR according to the study of Patel et al. [9]. Since 2017, we have mainly been using the Amplex assay eazyplex® VRE (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) for the detection of *vanA* and *vanB*. Vitek®2 System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) or MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) were used for identification and antimicrobial susceptibility testing since 2013. Moreover, we performed an alcohol tolerance assay as described in Pidot et al. [10] for a specific set of strains collected in this study against two different concentrations of isopropanol (23 and 60%).

Whole genome sequencing and bioinformatic analyses

VREfm isolates were stored as cryocultures, subcultured on blood agar and incubated overnight at 37 °C. DNA extraction was performed using the UltraClean

Microbial DNA isolation kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). The quantity and purity of the DNA was measured by QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega GmbH, Mannheim, Germany) and Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Short read sequencing libraries were generated from genomic DNA using the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina Inc., San Diego, USA) and were sequenced on the MiSeq system (Illumina Inc., San Diego, USA) with 250-cycle paired-end chemistry according to the manufacturer's instructions. Isolates were sequenced to reach 100-fold coverage. After sequencing quality-trimming, de novo assembly with the Velvet assembler and gene-by-gene comparison approach using the SeqSphere+ software version 4.1.9 (Ridom GmbH, Muenster, Germany) were performed. For the gene-by-gene comparison, the *E. faecium* cgMLST task template with default parameters (suggested threshold: ≤ 20 alleles difference) and *E. faecium* reference genome NC_017022.1 (GenBank accession number: GCA_000250945.1) was used to extract MLST and cgMLST data as described previously [11]. The quality of the samples and sequencing runs was checked using FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>), and Illumina Analysis Viewer (http://emea.support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav/downloads.html). The ResFinder and VirulenceFinder web server (<http://www.genomicepidemiology.org>) was used to identify resistance genes and virulence factors, using ResFinder3.2 with the setting searching for acquired antimicrobial resistance genes as well as chromosomal mutations associated with antibiotic resistance, and VirulenceFinder2.0 (respectively threshold of 90% minimum sequence identity and 60% minimum length identity cut-off).

In parallel, the recently published ASA³P analysis pipeline was used [12]. Briefly, raw sequencing reads were quality clipped with Trimmomatic [13] and de novo assembled with SPAdes [14]. Contigs were rearranged using MeDuSa [15] and annotated with Prokka [16]. The ST clade was determined using BLAST+ and the PubMLST.org database. Antibiotic resistance genes and virulence factors were analyzed with the use of CARD database [17] and VFDB [18]. Additionally, a phylogenetic approximately maximum-likelihood tree via FastTreeMP [19] was created. The visualization of the phylogenetic tree was performed using Microreact [20]. The Prokka-annotated coding sequences of each genome were also used as input for Roary v3.12.0 with default settings to perform a pangenome analysis [21]. The results were visualized using the roary_plots python script. The "Core" pangenome contains all genes common to every isolate while the "Accessory" pangenome contains all genes found in at least one isolate.

Statistical analysis

Either number and percent or median and interquartile range were calculated for descriptive analysis. Differences were tested using the Chi-square test or Wilcoxon rank-sum test. To analyze risk factors for the occurrence of ST117, we used a logistic regression model for multivariable analysis with patient age and sex, calendar year, type of ward, length of stay (LOS) at the time of specimen collection, and specimen collection site as possible confounders. Parameters with a significance of $p \leq 0.05$ were entered into the model. All tests of significance were two-tailed, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS (IBM SPSS statistics, Somers, USA) and SAS (SAS Institute, Cary, USA).

Ethics

The bacterial isolates were collected in the course of routine active surveillance and infection prevention control according to guidelines of National Healthcare Authorities. Personal data were anonymized and handled in compliance with the General Data Protection Regulation and medical-ethical guidelines of Charité - Universitätsmedizin Berlin for anonymized use of patient materials. Therefore, ethical approval by an institutional board was not necessary.

Results

Patient characteristics

All VREfm isolates from the years 2008, 2013, 2015 and 2018 were analyzed and came to a total of 120 cases. We investigated patient and isolate details, including age, sex, LOS, LOS at the time of specimen collection, type of ward, and site of specimen collection. In single quarters of each year, a variety of different wards were represented. The VREfm cases did not differ among calendar years with regard to age (in total median across all calendar years 66 years, IQR 53–75, $p = 0.839$), gender (in total male 52% and female 48%, $p = 0.223$), LOS (in total median 33 days, IQR 14–64%, $p = 0.209$), or the above mentioned ward type. Between 2008 and 2018, there was no difference in intensive care unit, hematology/oncology, surgery, or others ($p = 0.945$, $p = 0.825$, $p = 0.867$ and $p = 0.729$). In contrast, LOS at the time of specimen collection and site of specimen collection differed in various calendar years. In 2008, most of the samples were obtained as clinical cultures ($n = 25$, 83.3%), while in 2013 ($n = 4$, 13.3%), 2015 ($n = 6$, 20%), and 2018 ($n = 7$, 23.3%) screening cultures were more frequent. Urine accounted for the majority of clinical cultures. The LOS at the time of specimen collection decreased from 2008 (18.5 days; IQR 4–40) to 2018 (1.5 days; IQR 0–21) and is consequently of significance, $p = 0.011$.

Characteristics of VREfm isolates

All 120 VREfm isolates were sequenced, with an average coverage ranging from 41- to 121-fold. The percentage of good targets based on the core genome ranged from 95.2 to 99.8% with an average of 99.0%. STs as well as CTs were determined for all strains. Regarding classification into ST, each consecutive year saw a higher percentage of isolates that were ST117, rising from 16.7% in 2008 to 56.7% in 2018 ($p = 0.012$). In total, 43 (35.8%) of the 120 *E. faecium* isolates were classified as ST117. In addition to ST117 strains, we detected strains assigned to ST203 (11.7%), ST80 (7.5%), ST78 (9.2%), ST192 (8.3%), ST17 (6.7%), and others (each $\leq 5\%$) (Fig. 1). While ST117, ST203 and ST80 were identified in all years, the number of isolates belonging to ST203 and ST80 increased until 2015 but decreased subsequently from 2015 to 2018. Beside the increase in ST117, we also observed a rise in isolates assigned to ST78 between 2015 and 2018 as well as a higher diversity of STs in 2008 than in 2018 (Fig. 1).

When classifying the strains with a higher resolution into cgMLST, there was a clear shift of dominant CTs from CT164 in 2008 to CT71 in 2018. We did not find any CT71 isolates in 2008, 2013, or 2015 although there was a variety of other CTs such as CT24, CT36 and CT190 (Fig. 2). In contrast, 43% of isolates from 2018 were CT71 strains (13/30, $p < 0.0001$). Of all 120 isolates of the years studied, CT71 (11%) was the most common CT, followed by CT36 and CT162 (both 8%), and CT164 and CT894 (both 6%).

Risk factors for the frequent occurrence of ST117 strains

Table 1 shows patient characteristics for ST117 and non-ST117 carriers in each year. Non-ST117 comprised all strains other than ST117, including those which could not be assigned to a known ST. Regarding ward type, 54% of all CT71 strains were collected in ICUs, which comprised five different ICUs located in different buildings across the city. Most samples were obtained from rectal swabs ($n = 76$, 63%), urine samples ($n = 14$,

12%) and stool samples ($n = 9$, 7.5%). Regarding the rectal swabs, there is a great increase from 2008 ($n = 4$) to 2013 ($n = 26$), whereas the number remained approximately constant in the following years (2015 $n = 24$ and 2018 $n = 22$). Urine samples accounted for 12% of the total number of samples, including 6 samples (20%) in 2008, 1 sample (3%) in 2013, 3 samples (10%) in 2015, and 4 samples (13%) in 2018. Stool samples only occurred in 2008 ($n = 9$) and no samples in 2013, 2015 or 2018. Most CT71 strains ($n = 9$; 70%) were obtained from rectal swabs.

Multivariable risk factor analysis for ST117

The multivariable analysis supported a strong association of ST117 with the calendar year (Additional file 1: Table S1). Samples from 2018 were more than 9 times more likely to be type ST117 than in 2008 (OR 9.4, 95%CI 2.3–37.7, $p = 0.002$). A similar association was found for urine as specimen collection site and ST117 strains (OR 10.6, 95%CI 1.4–82.5, $p = 0.024$). CT71 was not an independent risk factor for ST117. Because CT71 did not appear until 2018, the calendar year could not be estimated in the model.

Antimicrobial resistance, virulence factors and pangenome analysis of ST117 strains

Resistance genes and virulence factors for all 43 ST117 strains were identified using ResFinder, VirulenceFinder, VFDB, and CARD, all of which indicated various resistance genes and virulence factors (Additional file 2: Table S2). Resistance genes for macrolides, lincosamides, and streptogramin B (*msrC*, *erm(B)* and *efmA*) as well as for trimethoprim (*dfrF* and *dfrG*) and aminoglycosides (*aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia* and *aac(6')-II*) were detected in all ST117 strains. Moreover, genes for ciprofloxacin resistance (*gyrA*, *parC*) and ampicillin resistance (*pbp5*) were identified in all ST117 strains, which are intrinsic genes and expected to be present in all isolates. While almost all non-CT71 strains had several genes conferring resistance to aminoglycosides, we

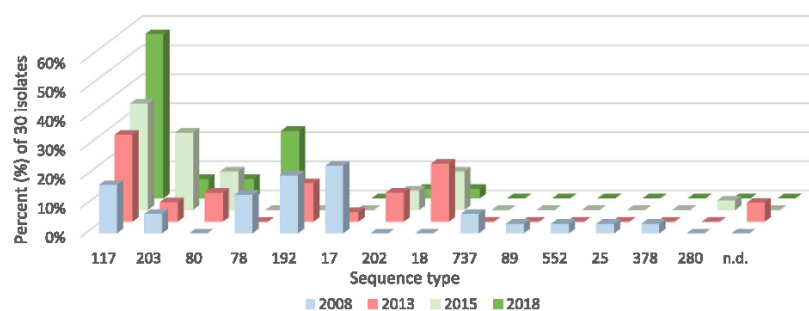
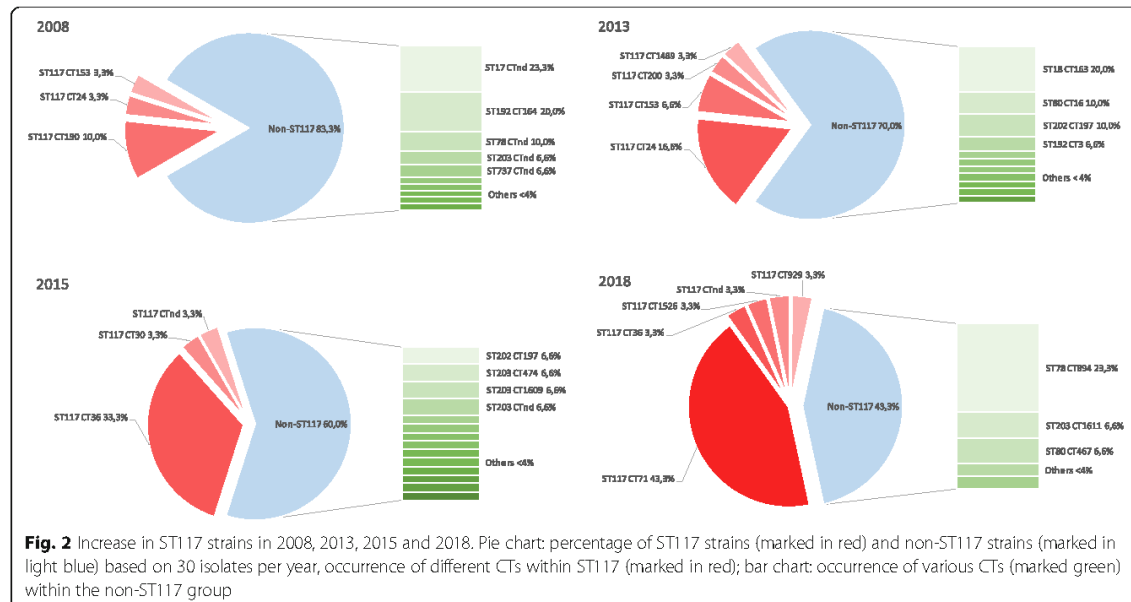


Fig. 1 Frequency of different STs in percent for the period 2008 to 2018 with 30 isolates per year (n.d. denotes ST not defined, comprises different strains)



found only one such gene (*aac(6′)-Ii*) in CT71 strains, which is also an intrinsic gene. Some non-CT71 isolates featured resistances to chloramphenicol (*cat*) and tetracycline (*tet(M)*) which were absent in CT71 strains. Among all ST117 strains, 74% (32/43 isolates) displayed the *vanB* genotype and the *vanA* in 26%

(11/43 isolates). There was a shift from *vanA* to *vanB* between 2008 and 2018, with 80% (4/5 isolates) and 67% (6/9 isolates) *vanA* in 2008 and 2013, to 100% (11/11 isolates) and 94% (16/17 isolates) *vanB* in 2015 and 2018, respectively (Additional file 3: Figure S1). All CT71 strains harbored *vanB*.

Table 1 Patient characteristics among non-ST117 and ST117 carriers per year (2008–2018); patient characteristics of CT71 strains in 2018 (IQR: interquartile range; LOS: length of stay)

Year	2008		2013		2015		2018		
Total number of isolates	N = 30		N = 30		N = 30		N = 30		
Strain type	Non-ST117	ST117	Non-ST117	ST117	Non-ST117	ST117	Non-ST117	ST117	CT71
No. (%)	25 (83)	5 (17)	21 (70)	9 (30)	18 (60)	12 (40)	13 (43)	17 (57)	13 (43)
Age in years, Median (IQR)	62 (46–72)	69 (56–76)	68 (57–76)	68 (53–71)	72.5 (54–74)	64 (47–72)	60 (54–66)	69 (52–77)	69 (52–75)
Sex, No. (%)									
Male	15 (60)	3 (60)	9 (43)	5 (56)	6 (33)	6 (50)	6 (46)	13 (77)	10 (77)
Female	10 (40)	2 (40)	12 (57)	4 (44)	12 (67)	6 (50)	7 (54)	4 (23)	3 (23)
LOS in days, Median (IQR)	53 (26–76)	23 (4–74)	32 (15–60)	47 (26–59)	31 (16–52)	34 (15–48)	14 (5–66)	16 (8–55)	40 (16–60)
LOS specimen collection in days, Median (IQR)	19 (6–37)	4 (4–42)	11 (2–24)	19 (11–26)	4.5 (1–12)	5 (1–18.5)	1 (0–42)	2 (0–12)	5 (1–21)
Type ward, No. (%)									
Intensive care unit	10 (40)	2 (40)	9 (43)	5 (56)	10 (56)	3 (25)	4 (30)	8 (47)	7 (54)
Hematology/oncology	9 (36)	1 (20)	8 (38)	3 (33)	4 (22)	7 (59)	5 (40)	3 (18)	3 (23)
Surgery	3 (12)	1 (20)	1 (5)	1 (11)	1 (5)	1 (8)	4 (30)	0 (0)	0 (0)
others	3 (12)	1 (20)	3 (14)	0 (0)	3 (17)	1 (8)	0 (0)	6 (35)	3 (23)
Site of specimen collection, No. (%)									
Screening cultures	4 (16)	1 (20)	19 (90)	7 (78)	13 (72)	11 (92)	12 (92)	11 (65)	9 (69)
Clinical cultures	21 (84)	4 (80)	2 (10)	2 (22)	5 (28)	1 (8)	1 (8)	6 (35)	4 (31)

All ST117 strains carried the virulence factor *acm*, which encourages cell wall-anchored collagen adhesion and has characteristics typical of a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) and *sgrA* to stimulate surface adhesion. Moreover, nearly all ST117 strains were characterized by the presence of *ecbA* (98%, 42/43 isolates), the *E. faecium* collagen binding protein A, as well as the enterococcal surface protein *esp* (95%, 41/43 isolates) to promote biofilm formation. The presence of a putative glycoside hydrolase *hylEfm* was detected in more than half of the ST117 strains (78%, 33/43 isolates). Occasionally, the virulence factor *scm* (14%, 6/43 isolates), the second collagen adhesin of *E. faecium*, occurred. All CT71 strains presented the same set of virulence factors: *acm*, *esp*, *hylEfm*, *ecbA*, and *sgrA* (30%, 13/43 isolates). This set of virulence factors was also detected in another 15 non-CT71 strains, a total of 28 isolates out of 43 (65%). These 15 strains belonged mainly to CT36 (21%, 9/43 isolates). The virulence factors of non-ST117 strains showed no striking difference from ST117 strains.

Regarding the alcohol tolerance assay, we tested five CT71 strains and one VREfm ATCC strain (ATCC 700221). At an isopropanol concentration of 23 and 60%, we could not detect any growth in any of the strains.

The phylogenetic tree with all ST117 strains revealed that the CT71 strains were phylogenetically separated from non-CT71 strains (Additional file 4: Figure S2). Additionally, a pangenome analysis was conducted with all ST117 strains to study the differences in gene content between CT71 strains and non-CT71 strains ($n = 43$). The isolates shared a core genome of 2166 genes ($42 \leq$ strains ≤ 43), a soft-core genome of 130 genes ($40 \leq$ strains < 42), a shell genome of 1338 genes ($6 \leq$ strains < 40) and 1618 cloud genes (strains < 6). In summary, the core genome comprises 42% of the pangenome (5252 genes). The pangenome matrix (presence and absence of genes) revealed that the distribution of genes among strains was relatively similar. With regard to the accessory genome profile of the CT71 strains compared to the other CT strains, there seemed to be a set of genes more frequently present in CT71 strains than in the other strains (Additional file 5: Figure S3). Additionally, the hierarchical clustering based on presence and absence of genes clustered CT71 isolates distinctly from non-CT71 strains. The frequency chart shows that many genes were present in all genomes and that many genes were present only in single genomes, but we could not detect peaks for a set of isolates indicative of CT71 strains ($n = 13$) (Additional file 5: Figure S3).

Discussion

This retrospective analysis revealed that the percentage of VREfm ST117 strains at Charité more than tripled

between 2008 and 2018. When CT71 first appeared in 2018, it comprised more than 40% of all ST117 strains. In comparison, VREfm prevalence at Charité rose from 1.2% in 2016 to 1.4% in 2018. Thus, an overall increase of VRE may not be the only explanation for the rise of ST117/CT71.

Previous publications have also reported a dramatic increase of ST117. Liese et al. reported the frequent occurrence of ST117, ST80, ST17, and ST192 strains in outbreak analyses from a German university hospital between 2010 and 2016, with ST117 strains appearing frequently only at the end of 2015 and 2016 [22]. The German National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci reported the same STs as Liese et al. as well as an increase in ST117 in Germany in recent years [8]. An occurrence of ST117 strains was also observed in other European countries such as Denmark [23], Switzerland [24], Norway [25], the Netherlands [26, 27], and Spain [28].

In this study, different CTs of ST117 strains were identified; in 2018, however, CT71 clearly predominated. The analysis was comprised of non-outbreak isolates only, which were collected in different wards. Recent publications indicate the spread of CT71 throughout Germany in hospitals in different geographical regions without any presumed patient transfer [8, 29]. The recent predominance of ST117 CT71 both in outbreak and non-outbreak strains leads to a question: What could be facilitating the spread of this particular clonal lineage? Compared to other CTs among ST117 strains, we did not detect resistance or virulence traits in CT71 that could confer survival advantage. The detected resistance genes (*msrC*, *efmA*, *erm(B)*, *dfrG*, and *aac(6')-II*) and virulence factors (*acm*, *esp*, *hylEfm*, *ecbA* and *sgrA*) of CT71 strains have already been reported in connection with high risk *Enterococcus* strains [23, 24, 30, 31]. The same set of virulence factors as in CT71 strains was also found in 15 other ST117 non-CT71 strains, mainly CT36, a CT frequently identified in 2015 (33%). So perhaps it is not a single trait that is responsible for the dominance and spread of specific strain types, but a combination of particular virulence factors.

Lee et al. has also reported the detection of the virulence factors *acm* and *sgrA* in connection with the predominance of an outbreak strain type ST173 [32]. Surprisingly, they identified fewer virulence factors in that outbreak strain than in the other strains. Falgenhauer et al. detected *acm*, *hylEfm*, and *esp* as well as the *efaAfm* gene in CT71 strains, the latter of which contributes to cell wall adherence [29]. CT71 strains were phylogenetically separated from non-CT71 strains, but the pangenome analysis did not reveal any explanation for the dominance of CT71 strains. Future research should address in-depth analysis of CT71-enriched pangenome genes, but is beyond the scope of this work.

The analysis of patient characteristics did not provide an explanation for the predominance of either ST117 or CT71 strains. Only the year of specimen collection and urine as the site of specimen collection increased the chance of finding ST117.

Even though urine as sample collection site is generally regarded as a clinical culture, the sampling site itself without any further clinical information did not necessarily prove that the patients had a urinary tract infection.

In contrast to most previous publications, we aimed to investigate isolates outside of reported outbreaks. Even though certain clones predominated in different years, continuous outbreak scenarios seem unlikely because the strains were found in three geographically distinct hospital buildings without an apparent epidemiological link between the patients. There may be ongoing inter-hospital spread, which would corroborate recent findings of Falgenhauer et al., who also detected near-identical isolates (≤ 10 cgMLST alleles) of ST117 CT71 *vanB* clones in different hospitals across the Rhine-Main area of Germany [29]. Raven et al. also discussed the complexity of VREfm transmission chains, including both within and inter-hospital spread [33]. Inter-hospital spread would either require the direct movement of patients between the different hospitals or unrecognized vectors linking the strains.

Horizontal gene transfer may facilitate the spread of VREfm through the exchange of mobile genetic elements such as transposons or plasmids, or a crossover between chromosomal and plasmid DNA through insertion elements [34]. Zhou et al. have demonstrated that the detection of horizontal gene transfer is important in order to understand the complex transmission routes and outbreaks of VREfm [26]. Pinholt et al. have reported a clonal expansion based on a *vanA*-plasmid that was transferred via horizontal gene transfer to already existing hospital-adapted vancomycin-susceptible *E. faecium* and, thus, generated new VREfm [23]. The exchange of genomic material between VRE and VSE may be responsible for the dissemination of *vanB* resistance in Germany [35].

Besides the ST117 strain type there are also reports of other emerging dominant strains like ST796 [36] and ST203 [37]. Maybe there is an underlying selection leading to convergent evolution in different STs and CTs in different regions. Pidot et al. reported *E. faecium* strains with increased tolerance to handwash alcohols [10], whereas we could not detect a higher alcohol tolerance of CT71 strains.

Markwart et al. indicate specialist care hospitals and prevention and rehabilitation care centres as risk factors for a higher VRE proportion as well as patients older than 40 years [38]. These findings may be related to a

larger number of patients with co-morbidities and older patients who are more frequently hospitalized and exposed to antibiotics during their lives. Regarding this study, non-ST117 and ST117 strains were mainly obtained from older patients (median > 60 years). Colonization pressure is an important factor in the spread of VRE by colonized patients [39], so it can be assumed that a higher colonization pressure of CT71 strains also leads to an increased spread of CT71 strains. Furthermore, the colonization period could be a crucial factor as VRE may colonize the gastrointestinal tract for several months [39]. Risk factors for a prolonged carriage of VRE are surgical interventions, antibiotic use during the hospitalization, dialysis and discharge to other health facility [40]. Perhaps the CT71 strains favor a longer colonization, due to a still unknown fact, and thus contribute to the spread. In general, we could not identify any specific risk factors for the acquisition of CT71 strains in this study.

The general increase of VREfm in Germany was accompanied by an increase in *vanB*-type strains [8] and by a shift from *vanA* to *vanB* genotype, which has been reported since 2015/2016 [22, 35]. We saw the same effect in our study, with an increase in *vanB* CT36 in 2015 and *vanB* CT71 in 2018.

Limitations of the study are the relatively small number of samples and the lack of information on patient factors both outside and inside of the hospital, such as comorbidities, antibiotic therapy, and admission to other health care institutions. In addition, the change in the numbers of active surveillance cultures for VRE and the days of LOS at specimen collection between 2008 and 2018 may have resulted in a systematic selection bias. The numbers of clinical and screening samples varied between the study years. Clinical cultures dominated in 2008, including isolates from patients with suspected or existing infection, and may therefore have more pathogenic properties. In 2013, 2015 and 2018 most samples were obtained from screening cultures. In general, there has been an increase in screening cultures throughout Germany. According to the German national nosocomial infection surveillance system (Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System, KISS, <https://www.nrz-hygiene.de/surveillance/kiss/>) the percentage of ICUs with active surveillance screening for VRE increased from 50% in 2013 to 86% in 2018. Surveillance cultures and early screening (decreased LOS at specimen collection) as opposed to clinical cultures and screening later during the patients' stay on the ward may reveal different strains.

A further limitation could be the databases that were used. Although we used two databases for the detection of virulence factors, there may be virulence factors that have not yet been reported. For example, higher colonization densities could be the result of additional

genes encoding metabolic pathways in ST117 CT71 which are usually not listed in virulence databases.

Conclusion

In conclusion, this retrospective analysis reports frequencies of specific VREfm strains in a German university hospital over time. An increase in ST117 strains from 2008 to 2018 was accompanied by a shift to *vanB* CT71 strains in 2018. We found neither specific virulence factors nor alterations in the patient mix to explain the increase of ST117 CT71. To date, it is not clear why ST117, and strain type ST117 CT71 in particular, predominates over other strains. In addition to epidemiological data, further studies to understand the complex spread of VREfm strain types need to take into account horizontal gene transfer in VREfm as well as potentially unrecognized vectors such as VSEfm or other bacterial lineages, and interactions with the intestinal microbiome.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00754-1>.

Additional file 1: Table S1. Multivariable model with uni- and multivariable estimates (LOS: length of stay; ICU: intensive care unit; IQR: interquartile range; 95%CI: 95% confidence interval).

Additional file 2: Table S2. Resistance genes and virulence factors of 43 ST117 strains. Resistance genes: *msrC*: Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B resistance; *efmA*, *erm(B)*: Macrolide resistance; *dfrr*, *dfrrG*: Trimethoprim resistance; *aac(6)-aph(2'')*, *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia*, *aac(6)-II*: Aminoglycoside resistance; *cat*: Chloramphenicol resistance; *tetM*: Tetracycline resistance; *gyrA*, *parC*: Ciprofloxacin resistance; *pbp5*: Ampicillin resistance. Virulence factors: *acm*: Cell wall-anchored collagen adhesin; *esp*: Enterococcal surface protein; *hylEfm*: Putative glycoside hydrolase; *ecbA*: *E. faecium* collagen binding protein A; *sgrA*: surface adhesion; *scm*: second collagen adhesin of *E. faecium*.

Additional file 3: Figure S1. Proportion of *vanA* and *vanB* genotype of ST117 strains from 2008 to 2018.

Additional file 4: Figure S2. Phylogenetic approximately maximum-likelihood tree with all ST117 strains ($n = 43$) created via FastTreeMP and visualized with Microreact, coloured by CT71 ($n = 13$).

Additional file 5: Figure S3. Results of pangenome analysis of all ST117 strains ($n = 43$) using *roary*_plots python script.

Abbreviations

cgMLST: Core genome multi locus sequence typing; Charité: Charité - Universitätsmedizin Berlin; CT: Cluster type; ICU: Intensive care unit; MLST: Multi locus sequence typing; ST: Sequence type; VRE: Vancomycin-resistant *Enterococcus*; VREfm: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

Acknowledgments

The authors would like to thank Oliver Schwengers for his support in using ASA³P.

Authors' contributions

AK and PG were responsible for the concept of the study. FM and AW wrote the manuscript. AW carried out the generation of the experimental data and the whole genome sequencing. FM and AW were responsible for bioinformatic data analysis. FS was involved in analyzing the results. All authors contributed substantially to the work and approved the final version of the manuscript.

Funding

This research did not receive grants from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed in the course of this study have been included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

The bacterial isolates were collected in the course of routine active surveillance and infection prevention control according to guidelines of National Healthcare Authorities. Personal data were anonymized and handled in compliance with the General Data Protection Regulation and medical-ethical guidelines of Charité - Universitätsmedizin Berlin for anonymized use of patient materials. Therefore, ethical approval by an institutional board was not necessary.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 7 November 2019 Accepted: 10 June 2020

Published online: 16 July 2020

References

1. Remschmidt C, Schroder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:54.
2. Chiang HY, Perencevich EN, Nair R, Nelson RE, Samore M, Khader K, et al. Incidence and outcomes associated with infections caused by Vancomycin-resistant enterococci in the United States: systematic literature review and meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(2):203-15.
3. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):266-78.
4. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6(1):130.
5. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. 2006;42(Suppl 1):S25-34.
6. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(4):19046.
7. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front Microbiol*. 2016;7:788.
8. Klare I, Bender JK, Werner G, Koppe U, Sin MA, Eckmanns T. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland. *Infektionsepidemiologie*. Robert Koch-Institut; 2017.
9. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR 3rd. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):703-7.
10. Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, Monk IR, Guerillot R, Carter GP, et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med*. 2018;10(452):eaar6115.
11. de Been M, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, van Schaik W, et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3788-3797.
12. Schwengers O, Hoek A, Fritzenwanker M, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, et al. ASA3P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher-level analysis of closely related bacterial isolates. *PLoS computational biology*. 2020;16(3):e1007134.
13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(15):2114-2120.
14. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-77.

15. Bosi E, Donati B, Galardini M, Brunetti S, Sagot MF, Lio P, et al. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2015;31(15):2443–51.
16. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2014;30(14):2068–9.
17. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D566–d73.
18. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D694–7.
19. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010;5(3):e9490.
20. Argimon S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial genomics.* 2016;2(11):e000093.
21. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2015;31(22):3691–3.
22. Liese J, Schule L, Oberhettinger P, Tschornher L, Nguyen T, Dorfel D, et al. Expansion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Academic Tertiary Hospital in Southwest Germany: a Large-Scale Whole-Genome-Based Outbreak Investigation. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2019;63(5):e01978–18.
23. Pinholt M, Bayliss SC, Gumpert H, Worning P, Jensen VVS, Pedersen M, et al. WGS of 1058 *Enterococcus faecium* from Copenhagen, Denmark, reveals rapid clonal expansion of vancomycin-resistant clone ST80 combined with widespread dissemination of a vanA-containing plasmid and acquisition of a heterogeneous accessory genome. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1776–85.
24. Abdelbary MHH, Senn L, Greub G, Chaillou G, Moulin E, Blanc DS. Whole-genome sequencing revealed independent emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing sequential outbreaks over 3 years in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(6):1163–70.
25. Hegstad K, Longva JA, Hide R, Aasnaes B, Lunde TM, Simonsen GS. Cluster of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* ST117 in Norwegian hospitals. *Scand J Infect Dis.* 2014;46(10):712–5.
26. Zhou X, Chlebowicz MA, Bathoom E, Rosema S, Couto N, Lokate M, et al. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3259–67.
27. Frakking FNI, Brill WS, Sinnige JC, Klooster JEV, de Jong BAW, van Hannen EJ, et al. Recommendations for the successful control of a large outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a non-endemic hospital setting. *J Hosp Infect.* 2018;100(4):e216–e25.
28. Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Rodríguez MC, Rodríguez-Banos M, Lanza VF, Derdoy L, et al. Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995–2015) in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):48–55.
29. Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Steul K, Scherer M, Heudorf U, et al. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST117/CT71/vanB -clone in the Rhine-Main metropolitan area of Germany. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:128.
30. Soheili S, Ghafourian S, Sekawi Z, Neela V, Sadeghifard N, Ramlil R, et al. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Scientific World J.* 2014;2014:623174.
31. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):533–40.
32. Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. Molecular characterization and evolution of the first outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Western Australia. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(6):814–9.
33. Raven KE, Gouliouris T, Brodrick H, Coll F, Brown NM, Reynolds R, et al. Complex routes of nosocomial Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmission revealed by genome sequencing. *Clin Infect Dis.* 2017;64(7):886–93.
34. Dubin K, Pamer EG. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. *Microbiol Spectrum.* 2014;5(6):10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016.
35. Bender JK, Kalmbach A, Fleige C, Klare I, Fuchs S, Werner G. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep.* 2016;6:21847.
36. Mahony AA, Buultjens AH, Ballard SA, Grabsch EA, Xie S, Seemann T, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* sequence type 796 - rapid international dissemination of a new epidemic clone. *Antimicrobial Resistance Infect Control.* 2018;7:44.
37. Johnson PD, Ballard SA, Grabsch EA, Stinear TP, Seemann T, Young HL, et al. A sustained hospital outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia due to emergence of vanB *E. faecium* sequence type 203. *J Infect Dis.* 2010;202(8):1278–86.
38. Markwart R, Willrich N, Haller S, Noll I, Koppe U, Werner G, et al. The rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Germany: data from the German antimicrobial resistance surveillance (ARS). *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:147.
39. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2018;61(10):1310–61.
40. Sohn KM, Peck KR, Joo EJ, Ha YE, Kang CI, Chung DR, et al. Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. *Int J Infect Dis.* 2013;17(4):e240–6.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more blomedcentral.com/submissions



12 Lebenslauf

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

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

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

13 Publikationsliste

Denkel LA, Maechler F, Schwab F, Kola A, **Weber A**, Gastmeier P, Pfäfflin F, Weber S, Werner G, Pfeifer Y, Pietsch M, Leistner R. Infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacterales after rectal colonization with ESBL-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;26(8):1046-51.

Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2020;9(1):109.

Xanthopoulou K, Peter S, Tobys D, Behnke M, Dinkelacker AG, Eisenbeis S, Falgenhauer J, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Gölz H, Häcker G, Higgins PG, Imirzalioglu C, Käding N, Kern WV, Kramme E, Kola A, Mischnik A, Rieg S, Rohde AM, Rupp J, Tacconelli E, Vehreschild M, Walker SV, Gastmeier P, Seifert H. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonizing patients on hospital admission in Germany: prevalence and molecular epidemiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020;75(10):2743-51.

Other members of the DZIF-R-Net Study Group:

B. Bader, Tübingen; Federico Foschi, Tübingen; Meyke Gillis, Cologne; Catriona Hennelly, Freiburg; Susanne Herold, Giessen; Nadine Hoffmann, Tübingen; Florian Hölzl, Tübingen; Azita Lengler, Giessen; Dana Lenke, Lübeck; Luis Alberto Peña Diaz, Berlin; Gabriele Peyerl-Hoffmann, Freiburg; Georg Pilarski, Berlin; Susanna Proske, Cologne; Judith Schmiedel, Giessen; Heike Spitznagel, Freiburg; Yvonne Stelzer, Cologne; Norbert Thoma, Berlin; Janina Trauth, Giessen; Martina Vavra, Freiburg; **Anna Weber**, Berlin; Julia Wille, Cologne.

Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen und Workshops

Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Zunahme von Vancomycin-resistenten *E. faecium* ST117 CT71 an der Charité. 23. Berliner Workshop "Neue Innovationen für die Infektionsprävention: Sind sie auch wirklich hilfreich?", Berlin (Deutschland), 25.-26. Januar 2019 (Vortrag)

Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) strain type ST117 CT71 at Charité between 2008 and 2018. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam (Niederlande), 13.-16. April 2019 (Poster)

14 Danksagung

Zuallererst danke ich Frau Prof. Dr. med. Gastmeier, die mir als Direktorin des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin die Durchführung dieser Studie sowie die Teilnahme an Weiterbildungen und den Austausch mit anderen Arbeitsgruppen ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Axel Kola, meinem Erstbetreuer, der mich in meinem Vorhaben von Beginn an unterstützt und mich den ganzen Weg über begleitet hat. Ohne seine Ideengebung, fachliche Kompetenz und sein Vertrauen hätte ich dieses Vorhaben nicht so umfassend abschließen können.

Genauso möchte ich meiner Zweitbetreuerin, Dr. med. Friederike Maechler, für die kontinuierliche Unterstützung, den menschlichen Austausch und die vor allem inspirierende Zusammenarbeit danken. Sie hat den Grundstein der bioinformatischen Auswertung von Sequenzierdaten am Institut für Hygiene und Umweltmedizin gelegt, ihr Wissen und ihre Erfahrungen mit mir geteilt und mit großem Engagement zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Insbesondere danke ich dem gesamten Laborteam für die herzliche Aufnahme, die praktische Einarbeitung, das Teilen langjähriger Erfahrungen und die moralische Unterstützung während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit: Gabriele Rose, Melanie Bienek, Sabrina Bolle, Andrea Wittchen, Petra Bähn, Petra Falkenberg, Astrid Jacobs, Andrea Eckerlin, Heike Sedlmair und Angelika Nickelmann.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. rer. medic. Frank Schwab für die Durchführung der statistischen Analyse bedanken.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie für die Unterstützung, den Rückhalt und die Motivation.