

4 Ergebnisse

4.1 **Probanden und Proben**

Bei insgesamt 69 Probanden wurde in jedem der sechs Monate mindestens ein Enterokokken-Isolat nachgewiesen. Von diesen 69 Probanden lagen 1429 eingefrorene Isolate vor. 635 dieser Proben waren in der kurzen biochemischen Reihe als *E. faecalis* identifiziert worden, diese wurden nicht weiter untersucht. 794 dieser Proben waren in der kurzen biochemischen Reihe als *E. faecium* oder nicht weiter klassifizierte *Enterococcus* (weder *E. faecalis* noch *E. faecium*) identifiziert worden, diese Proben wurden weiter untersucht. Die Probanden waren zwischen 8 und 60 Jahre alt, der Mittelwert lag bei 38,5 Jahren, der Median bei 36,5 Jahren. 41 Probanden waren Frauen, 28 waren Männer. 38 waren Mitarbeiter des Institutes, acht waren Angehörige von Mitarbeitern, 22 waren Probanden ohne Labor- oder Krankenhauskontakt und ein Proband von der Krankenpflegeschule. Unter den Probanden waren 13 Gruppen von Personen, die im gleichen Haushalt wohnen, davon 12 Gruppen mit jeweils zwei Personen und eine Gruppe mit drei Personen.

4.2 **Prävalenzuntersuchung der Resistenzgene**

4.2.1 Spezies- und Resistenzgennachweis

Von den 794 Isolaten (69 Probanden) wurden mit der ddl-PCR 379 Isolate (59 Probanden) als *E. faecium* identifiziert. Zusätzlich wurden 75 Isolate (15 Probanden) als *E. faecalis* identifiziert (Tabelle 11).

Mit der Multiplex-Untersuchung wurde bei 109 Isolaten (23 Probanden) das Resistenzgen vanA nachgewiesen. Das vanB-Gen wurde nicht nachgewiesen. Bei 38 Isolaten (22 Probanden) wurde, das vanC1-Gen und bei 119 Isolaten (65 Probanden) wurde das vanC 2/3-Gen identifiziert. 14 Isolate waren nicht beurteilbar. (Tabelle 11).

Tabelle 11: Spezies- und Resistenzgenuntersuchungen mit ddl- und Multiplex-PCR

Multiplex-PCR	ddl-PCR			Gesamt
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Kein Nachweis	
VanA-Gen	109	0	0	109
VanB-Gen	0	0	0	0
VanC1-Gen	0	0	38	38
VanC2/3-Gen	0	0	119	119
Kein Nachweis	268	74	172	512
Nicht auswertbar	2	1	11	14
Gesamt	379	75	340	794

4.2.2 Resistenzgenachweise und Vancomycinkonzentration im Nährmedium

Vergeicht man die Konzentration des Vancomycins in den Nährmedien, von denen die Isolate isoliert wurden, mit den Ergebnissen der Resistenzgenterung (Multiplex-PCR), zeigt sich folgendes: 1.) der Nachweis von vanA-Gen tragenden Isolaten erfolgte vor allem von Nährmedien mit einer Vancomycin-Konzentration von 16µg/ml; 2.) der Nachweis von vanC1- und vanC2/3-Gen tragenden Isolaten hingegen erfolgte von Nährmedien ohne Vancomycin-Zusatz bzw. mit einer Vancomycin-Konzentration von 4µg/ml (Tabelle 12).

Tabelle 12: Resistenzgene und Vancomycin-Konzentration des Nährmediums

Vancomycin Konzentration	Multiplex-PCR					Nicht auswertbar	Gesamt
	vanA-Gen	vanB-Gen	vanC1- Gen	vanC2/3- Gen	Kein Nachweis		
0 µg/ml	1	0	18	69	439	11	538
4 µg/ml	16	0	12	50	45	0	123
16 µg/ml	92	0	8	0	30	3	133
Gesamt	109	0	38	119	514	14	794

4.2.3 Vergleich kurze biochemische Reihe und PCR

Beim Vergleich der Speziesbestimmung mittels ddl- und Multiplex-PCR (Tabelle 6) und mittels kurzer biochemischer Reihe ergaben sich folgende Resultate (Tabelle 13):

Unter den Isolaten, die in der kurzen biochemischen Reihe als *E. faecium* identifiziert (582) worden waren, wurden mit der genotypischen Untersuchung nur 343 (59%) als *E. faecium* bestätigt. Die anderen wurden als *E. gallinarum* (28), *E. casseliflavus*/*E. flavescens* (101), *E.*

faecalis (35) und andere Enterokokken (75) identifiziert. Unter den primär nicht klassifizierten Enterokokken (212) wurden mit der genotypischen Bestimmung 36 *E. faecium*, 40 *E. faecalis*, 10 *E. gallinarum* und 18 *E. casseliflavus*/*E. flavescens* sowie 108 andere Enterokokken-Spezies identifiziert.

Tabelle 13: Vergleich der Speziesbestimmung mit ddl- und Multiplex-PCR und mit kurzer biochemischen Reihe

kurze biochemische Reihe	ddl- PCR		Multiplex-PCR			Gesamt
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i>	Andere Enterokokken	
<i>E. faecium</i>	343	35	28	101	75	582
Andere Enterokokken	36	40	10	18	108	212
Gesamt	379	75	38	119	183	794

4.2.4 Spezies- und Resistenzgenachweis pro Proband

Ein vanA-Gen tragende *E. faecium* wurde bei insgesamt 23 (33%) der 69 Probanden im Untersuchungs-Zeitraum nachgewiesen. Pro Monat wurden im Mittel bei 5,3 (7%) Probanden vanA-Gen tragendem *E. faecium* nachgewiesen.

Zur Analyse der Besiedlung der Probanden mit den einzelnen Enterokokken-Spezies wurden die Ergebnisse der ddl-PCR und Multiplex-PCR sowie die Ergebnisse der *E. faecalis* Identifikation aus der Inzidenzuntersuchung zusammen gewertet.

Dabei zeigte sich, dass bei allen der 69 Probanden im Untersuchungs-Zeitraum *E. faecalis* nachgewiesen werden konnte, bei 86% *E. faecium*, bei 32% *E. gallinarum*, bei 94% *E. casseliflavus*/*E. flavescens* und bei 75% andere Enterokokken (Tabelle 14)

Tabelle 14: Nachweis der Enterokokken Spezies bei Probanden im Untersuchungszeitraum

	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> *	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i>	Andere Enterokokken	Gesamt
Probanden (N)	59	69	22	65	51	69
%	86%	100%	32%	94%	75%	
CI 95%	75-92	93-100	21-44	85-98	62-83	

*Für die *E. faecalis* Daten, wurden die *E. faecalis* aus der Inzidenzuntersuchung zu den mit ddl gefundenen *E. faecalis* addiert.

4.2.5 Vergleich phänotypischer und genotypischer Resistenzergebnisse bei *E. faecium*

Bei 109 *E. faecium* (23 Probanden) war durch den Nachweis von vanA-Gen (Multiplex-PCR) die genotypische Resistenz nachgewiesen worden. Dieses Ergebnis wurde mit denen der phänotypischen Resistenzbestimmung (Disk-Diffusionstest, E-Test und MHK-Bestimmung) verglichen (Tabelle 15). Im Diskdiffusionstest und im E-Test waren fünf, in der MHK drei dieser vanA-Gen tragenden *E. faecium* als Vancomycin sensibel eingestuft worden. Bei diesen fünf Isolaten (5 Probanden) führten wir die phänotypische Untersuchungen erneut durch und fanden bei allen in diesem Untersuchungsgang mit den drei Methoden auch phänotypisch eine Resistenz.

Phänotypisch waren zwei weitere Isolate (2 Probanden) als Vancomycin resistent eingestuft worden. Diese Isolate konnten genotypisch nicht als *E. faecium* bestätigt werden. Ein Isolat wurde durch Nachweis des C1-Gens als *E. gallinarum* identifiziert, die in der Regel nur intermediär resistent sind. Das zweite Isolate konnte mit den durchgeführten genetischen Untersuchungen nicht klassifiziert werden. Es trug keines der untersuchten Resistenzgene.

Tabelle 15: Phänotypische Resistenz bei vanA-Gen tragenden *E. faecium* (n=109)

Methode der phänotypischen Resistenzbestimmung	Ergebnis phänotypische Resistenzbestimmung		
	sensibel	intermediär	resistent
E-Test	5	0	104
Diskdiffusion	5	0	104
MHK	3	0	106

4.2.6 Assoziation von Exposition und Besiedlung

Es wurde verglichen, ob das Alter, das Arbeiten im Hygieneinstitut oder das Geschlecht die Besiedlung mit einer Spezies, bzw. mit einem Resistenzgen beeinflussen. Von den 69 Probanden wurde bei 10 kein *E. faecium* nachgewiesen. Die Probanden mit Nachweis von *E. faecium* waren in Bezug auf die untersuchten Charakteristika nicht unterschiedlich (Tabelle 16). Ebenso fand sich kein Unterschied zwischen den 23 Probanden mit Nachweis von vanA-Gen tragenden *E. faecium* und den Probanden ohne diesen Nachweis (Tabelle 17). Auch bei den Probanden mit bzw ohne Nachweis von *E. gallinarum* sowie *E. casseliflavus*/*E. flavescens* konnte kein Unterschied festgestellt werden (Tabelle 18 und Tabelle 19).

Tabelle 16: Vergleich der Probanden mit oder ohne Nachweis von *E. faecium* in Bezug auf Alter, Geschlecht und Bezug zum Institut

	Probanden mit <i>E. faecium</i> (n=59)	Probanden ohne <i>E. faecium</i> (n=10)	OR	CI 95%
Alter in Jahren	39 ±12	38±12		
Geschlecht (weiblich)	34	7	0,9	0,8-1,2
Institutsangehörig	30	8	0,8	0,7-1,2

Tabelle 17: Vergleich der Probanden mit oder ohne Nachweis von *E. faecium* mit vanA-Gen in Bezug auf Alter, Geschlecht und Bezug zum Institut

	Probanden mit vanA-Gen (n=23)	Probanden ohne vanA-Gen (n=46)	OR	CI 95%
Alter in Jahren	38±12	39±12		
Geschlecht (weiblich)	11	30	0,6	0,3-1,2
Institutsangehörig	10	13	0,6	0,3-1,2

Tabelle 18: Vergleich der Probanden mit oder ohne Nachweis von vanC1-Gen (*E. gallinarum*) in Bezug auf Alter, Geschlecht und Bezug zum Institut

	Probanden mit vanC1-Gen (n=21)	Probanden ohne vanC1-Gen (n=48)	OR	CI 95%
Alter in Jahren	40±14	38±11		
Geschlecht (weiblich)	13	28	1,1	0,5-2,3
Institutsangehörig	10	28	0,7	0,4-1,5

Tabelle 19: Vergleich der Probanden mit oder ohne Nachweis von vanC2/3-Gen (*E. casseliflavus*/*E. flavescens*) in Bezug auf Alter, Geschlecht und Bezug zum Institut

	Probanden mit vanC2/3-Gen (n=41)	Probanden ohne vanC2/3-Gen (n=28)	OR	CI 95%
Alter in Jahren	38 ±12	40±12		
Geschlecht (weiblich)	23	18	0,9	0,6-1,3
Institutsangehörig	22	16	0,9	0,6-1,4

4.3 Persistenz der *E. faecium* Stämme

4.3.1 Fingerprintuntersuchungen

Für die Fingerprintuntersuchung wurden die Isolate ausgewählt, die in der genotypischen Speziesdiagnostik *E. faecium* waren. Insgesamt wurden 379 Isolaten von 59 Probanden als *E. faecium* nachgewiesen. Diese Isolate wurden mit M13 und AP4+ERIC1 typisiert. 354 davon konnten ausgewertet werden. Zur Einteilung der Stämme wurden, wie oben beschrieben, die Bandenmuster per Auge und mit dem GelCompar-Programm verglichen und ausgewertet. In Abbildung 8 ist beispielhaft ein Dendrogramm der Isolate eines Probanden dargestellt.

Abbildung 8: Dendrogramm der Isolate eines Probanden, Vergleich der Ergebnisse von M13 und ERIC1+AP4



Beispiel eines Dendrogramms: Jeweils wurden die fünf Isolate des Probanden mit M13 und ERIC1-AP4 verglichen. Mit M13 ergibt sich ein Cluster aus vier Isolaten mit 90% Korrelation und ein Isolat mit weniger als 80% Korrelation zu anderen Isolaten. Mit Eric1+AP4 ergibt sich ein Cluster mit 3 Isolaten mit 90% Korrelation und zwei einzelne Isolate, die weniger als 80% Korrelation aufweisen. Nach der Zuordnungsregel zu einem Stamm: mindestens 90% Korrelation in einem und mindestens 80% Korrelation in der anderen Typisierung, werden die Isolate 3 Stämmen zugeordnet. Ein Stamm mit 3 Isolaten und jeweils ein Stamm mit einem Isoalt.

4.3.2 Vergleich des Bandenmusters des Referenzstammes

Dasselbe Isolat wurde als Referenz bei jeder PCR mitgeführt und die Bandenmuster wurden miteinander verglichen. Beim Vergleich dieses Referenzisolates in den verschiedenen Gelen war die Ähnlichkeit, um es als einen Stamm zu zählen, gegeben. Siehe Abbildung 9. Die Reproduzierbarkeit der Methode war damit belegt.

Abbildung 9: Dendrogramm des Referenzstammes von verschiedenen Gelen und PCR-Läufen



Beispiel des Referenz-Isolates, das an verschiedenen Tagen in verschiedenen Gelen mit M13 und mit Eric+AP4 untersucht wurde. Mit den Kriterien 90% Gleichheit in einer Untersuchung und mindestens 80% Gleichheit in der andern wäre dieses Isolat auch als Stamm gewertet worden.

4.3.3 Stämme pro Proband, Spezies und Resistenzgene der Stämme

Insgesamt wurden 207 genetisch verschiedene Stämme identifiziert. Pro Proband wurden ein bis 22 Stämme (Mittel 3,8) gefunden, pro Stamm zwischen einem und neun Isolaten. Unter den 109 *E. faecium* (von 23 Probanden) mit vanA-Gen wurden 49 Stämme identifiziert. Pro Proband wurden zwischen einem und 13 Stämmen (Mittel 1,8) mit vanA-Gen gefunden. Bei acht dieser identifizierten Stämme lag das vanA-Gen nicht immer vor.

4.3.4 Persistenz von Stämmen

Unter den 59 Probanden wiesen 42 Probanden in mehr als einem Monat *E. faecium* auf (Tabelle 20). Bei neun dieser Probanden wurden genetisch identische Stämme in verschiedenen Monaten gefunden. Bei einem Probanden konnten zwei Stämme über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden, so dass insgesamt bei 10 Stämmen eine Persistenz nachgewiesen werden konnte (Tabelle 21).

Die Resistenzgene von diesen zehn Stämmen wurden verglichen. Dabei waren sechs Stämme ohne Resistenzgenachweis und drei Stämme hatten das Resistenzgen vanA. Ein weiterer Stamm

war zunächst vanA-Gen negativ, drei Monate später wurde dieser Stamm jedoch mit einem vanA-Gen isoliert (Tabelle 21).

Tabelle 20: Nachweis von *E. faecium* in mehreren Monaten

Nachweis von *E. faecium*

Zahl der Monate	1	2	3	4	5	6
Zahl der Probanden (n=59)	17	14	14	4	6	4

Tabelle 21: Darstellung der Stämme, die in mehreren Monaten nachgewiesen wurden, mit dem Ergebnis der Resistenzgenbestimmung

Proband	Stamm	Resistenzgen-Nachweis	Untersuchungsmonate mit Stammnachweis						Monatsspanne	
			1	2	3	4	5	6		
1	A	0		X	X				1	
2	B	0				X	X		1	
3	C	0	X	X					1	
4	D	0	X		X				2	
5	E	0	X					X	5	
6	F	vanA-Gen				X		X	2	
7	G	vanA-Gen	X			X	X		4	
8	H	0*/ vanA-Gen [§]		X*				X [§]	3	
9	I	0			X	X			1	
9	J	vanA-Gen	X					X	X	5

4.3.5 Vergleich der Bandenmuster zwischen Probanden

Drei Stämme wurden identifiziert, die bei jeweils zwei Probanden gefunden wurden. Dabei war ein Stamm ein *E. faecium* ohne Resistenzgennachweis, dieser wurde bei zwei Probanden aus derselben Familie identifiziert. Die anderen beiden Stämme waren *E. faecium* mit vanA-Gen Nachweis. Diese beiden Stämme wurden jeweils einmal bei einem Institutsmitarbeiter und bei einem Angehörigen eines anderen Institutsmitarbeiters gefunden, eine Verbindung zwischen diesen Personen ist unwahrscheinlich.

Tabelle 22 Stämme, die bei mehreren Probanden nachgewiesen werden konnte

Proband	Stamm	Resistenzgen-Nachweis	Verbindung
10	K	0	Familie
11	K	0	Familie
12	L	van-A-Gen	Unbekannt
13	L	van-A-Gen	Unbekannt
14	M	van-A-Gen	Unbekannt
15	M	van-A-Gen	Unbekannt