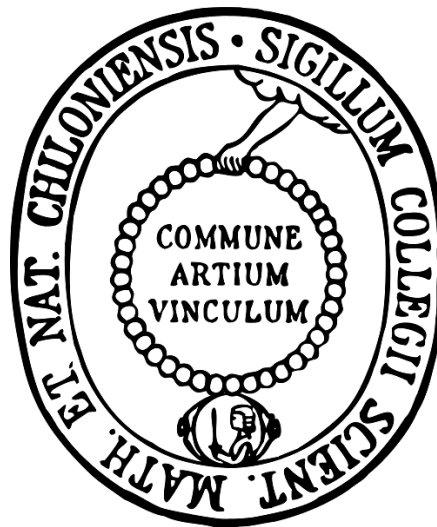


Detektion bakterieller Multiresistenzen: Etablierung molekularer Testsysteme für patientennahe Screening-Verfahren



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christian Kautz

Kiel 2017

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Kunze
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Stephan Johannes Ott
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2017
Zum Druck genehmigt:	30.06.2017
	Prof. Dr. Natascha Oppelt (Dekanin)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Kurzfassung	V
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund und Historie von Antibiotikaresistenzen.....	1
1.2 Bedeutung für die Klinik und das Gesundheitssystem	4
1.2.1 Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	7
1.2.2 Vancomycin-resistente <i>Enterococcus spp.</i> (VRE).....	8
1.2.3 Multiresistente gramnegative Stäbchen (MRGN).....	9
1.3 Aktuelle Herausforderungen durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen	12
1.4 Antibiotikaresistenzen vor dem Hintergrund internationaler Reisen und Migration	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 Materialien	19
2.1 Geräte	19
2.2 Chemikalien	20
2.3 Reagenzien und Kits	20
2.4 Puffer und Lösungen	21
2.5 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.6 Software	22
2.7 Referenzstämme und Klinische Isolate.....	22
3 Methoden	26
3.1 Klinische Proben und Ethik.....	26
3.1.1 Screening-Abstriche in der Kohorte stationäre Patienten.....	26
3.1.2 Screening-Abstriche und Stuhlproben in der Kohorte Flüchtlinge	28
3.1.3 Stuhlproben von Probanden der Focus Kohorte	29
3.2 DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen zur Herstellung von Referenz-DNA .	29
3.3 Etablierung einer geeigneten Probenahme und Probenvorbereitung.....	30
3.3.1 Vergleich verschiedener DNA Extraktionsmethoden	30
3.3.2 PCR-Inhibition durch Bestandteile des Probenahmesystems	34
3.3.3 Anpassungen für den Einsatz auf TaqMan® Array Cards.....	36

3.4	Aufarbeitung von Klinischen Proben für die molekularbiologische Untersuchung mittels Real-Time PCR	38
3.4.1	Screening-Abstriche	38
3.4.2	Stuhlproben	38
3.5	Mikrobiologische Untersuchung von Klinischen Proben.....	39
3.5.1	Kulturbasiertes Screening auf Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	39
3.5.2	Kulturbasiertes Screening auf Vancomycin-resistente <i>Enterococcus spp.</i> (VRE)	40
3.5.3	Kulturbasiertes Screening auf multiresistente gramnegative Stäbchen (MRGN).....	40
3.6	TaqMan® Real-Time PCR.....	42
3.6.1	Primer- und Sonden-Design	42
3.6.2	Reaktionsansätze und Temperaturprofile für Einzelreaktionen auf Mikrotiterplatten	47
3.6.3	Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen.....	49
3.6.4	Evaluierung an klinischen Proben von stationären Patienten.....	52
3.7	TaqMan® Array Cards.....	55
3.7.1	Aufbau und Funktion von TaqMan® Array Cards	55
3.7.2	Reaktionsansätze und Temperaturprofile für die Verwendung von TaqMan® Array Cards	57
3.7.3	Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards	58
3.7.4	Anwendung für das Screening auf multiresistente Erreger in der Kohorte Flüchtlinge.....	60
3.8	Endpunkt PCR zur Verifizierung der Real-Time PCR	61
3.9	Schmelzkurvenanalyse.....	63
3.10	16S rRNA-Gen-Sequenzierung zur Mikrobiom-Analyse	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Etablierung der Probenahme und Probenvorbereitung	65
4.1.1	Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienz unter Berücksichtigung des Arbeits- und Zeitaufwandes	66
4.1.2	PCR-Inhibition durch Bestandteile des Probenahmesystems	68
4.1.3	Anpassungen für die Verwendung mit TaqMan® Array Cards.....	70
4.2	TaqMan® Real-Time PCR.....	72
4.2.1	Etablierung der TaqMan® Real-Time PCR in Einzelreaktionen.....	72
4.2.2	Evaluierung an klinischen Proben von stationären Patienten.....	79
4.2.3	Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards	84
4.3	Untersuchung zum Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen in der Kohorte Flüchtlinge	86
4.3.1	Resistenzgene und Pathogene in Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte	87
4.3.2	Resistenzgene und Pathogene in Abstrich-Proben des inguinalen Hautareals und der nasalen Schleimhäute	93
4.3.3	Kulturbasierte Detektion resistenter Pathogene.....	95
5	Diskussion	96

5.1	Erforderliche Voraussetzungen zur Detektion von Antibiotikaresistenzgenen im klinischen Umfeld	96
5.1.1	Auswahl geeigneter Probenahmeorte.....	96
5.1.2	Vom Abstrich zur PCR-kompatiblen Untersuchungslösung	98
5.1.3	Konzeptionierung und Kompatibilität des Probenahmesystems.....	99
5.2	Entwurf eines molekularbiologischen Tests zur kulturunabhängigen Detektion von Antibiotikaresistenzgenen	101
5.2.1	Der molekularbiologische Nachweis von MRSA	102
5.2.2	Der molekularbiologische Nachweis von VRE	103
5.2.3	Der molekularbiologische Nachweis von MRGN.....	104
5.2.4	Makrolid-Resistenzgene in klinisch relevanten Streptokokken.....	105
5.2.5	Integrierte Qualitätskontrollen.....	106
5.2.6	Limitierungen molekularbiologischer Methoden	106
5.3	Technische Leistungsfähigkeit des Systems	107
5.3.1	Auswahl der Methodik	107
5.3.2	Ergebnisse der Spezifitätstestung	108
5.3.3	PCR-Parameter und Sensitivitätstestung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen.....	109
5.3.4	PCR-Parameter und Sensitivitätstestung der Real-Time PCR nach Integration auf TaqMan® Array Cards	110
5.4	Klinische Leistungsfähigkeit und Aussagekraft des etablierten Systems ...	111
5.4.1	Aussagekraft des MRSA-Nachweises	111
5.4.2	Aussagekraft des VRE-Nachweises	112
5.4.3	Aussagekraft des Nachweises von ESBL- oder Carbapenemase-produzierenden Erregern.....	113
5.4.4	PCR-Inhibition beeinflusst die MRE-Detektion nur geringfügig	114
5.4.5	Potentieller Zeitgewinn gegenüber kulturbasierten Methoden.....	115
5.4.6	Limitierungen der Evaluierung der klinischen Leistungsfähigkeit	116
5.4.7	Aussagekraft als Gesamtsystem	116
5.4.8	Potentielle Einsatzmöglichkeiten	117
5.5	Resistenzgene und Pathogene in der Kohorte Flüchtlinge und in einer Stichprobe der nicht hospitalisierten deutschen Bevölkerung	120
5.5.1	Erhöhte Prävalenzen von Antibiotikaresistenzgenen in der Kohorte Flüchtlinge.....	120
5.5.2	Resistenzgene und Pathogene spiegeln die physiologische Standortflora des inguinalen Hautareals und der nasalen Schleimhäute wider.....	122
5.5.3	Resistenzgene treten unabhängig von Pathogenen auf.....	124
5.6	Einsatzfähigkeit des Detektionssystems in großen Probenzahlen	125
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	126
6	Zusammenfassung.....	128
7	Literaturverzeichnis	132
8	Anhang.....	153
9	Curriculum vitae	155

10	Erklärung nach § 8 Absatz 1 der Promotionsordnung.....	157
11	Danksagung.....	158

Kurzfassung

Die weltweit zunehmende Verbreitung multiresistenter Erreger (MRE) wird von der Weltgesundheitsorganisation WHO als eine der größten Gefahren des 21. Jahrhunderts für die menschliche Gesundheit erachtet. Klinisch relevante Problemkeime, wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistente Enterokokken und multiresistente gramnegative Bakterien, die β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum produzieren und/oder Carbapenem-resistent sind, verursachen immer häufiger nosokomiale Infektionen. Diese sind schwer zu behandeln und gehen mit einer höheren Morbidität und Mortalität einher. Die Situation gewinnt an Brisanz, seitdem gewaltsame Konflikte im Mittleren Osten Millionen von Menschen dazu zwangen, aus ihrer Heimat zu fliehen, um Schutz in Teilen Europas zu suchen. Aktuell sieht sich besonders Deutschland mit einem stark gestiegenen Zustrom von Flüchtlingen konfrontiert, die aus oder durch Länder flohen, in denen MRE, zumindest in Gesundheitseinrichtungen, endemisch vorkommen und die möglicherweise bei Krankenhausaufnahme ein erhöhtes MRE-Risiko besitzen. Da besiedelte oder infizierte Patienten ein Reservoir und Vehikel für die Verbreitung von MRE im Krankenhaus darstellen, ist es essentiell, asymptomatische MRE-Träger frühzeitig durch ein aktives Screening zu identifizieren und gegebenenfalls gezielte Hygienemaßnahmen zur Vermeidung einer nosokomialen Transmission zu ergreifen. Derzeitige MRE-Screening-Methoden weisen im Wesentlichen zwei Limitierungen auf: 1) kulturbasierte Routinemethoden weisen lange Testzeiten zwischen 18 und 72 Stunden auf und 2) neuere molekularbiologische Tests detektieren lediglich einzelne Problemkeime und umfassen nur wenige Resistenzgenfamilien.

Ziel dieser Arbeit war es, ein TaqMan[®] Real-Time PCR System zu entwickeln, das es ermöglicht, 42 Resistenzdeterminanten parallel in verschiedenen klinisch relevanten MRE zu detektieren. Die technische Leistungsfähigkeit des vorgestellten Systems wurde anhand von extrahierter genomischer DNA von 72 Referenzstämmen mit definiertem Resistenzgenotyp untersucht. Um die klinische Leistungsfähigkeit zu evaluieren, wurden 73 Proben von stationären Patienten mit erhöhtem MRE-Risiko gesammelt und vergleichend zum kulturbasierten Routinescreening mittels chromogener Selektivmedien untersucht. Im Anschluss wurde das etablierte System auf das Format spezieller hochdurchsatzgeeigneter mikrofluidischer PCR Karten übertragen und in einer deskriptiven Studie eingesetzt, die unter Verwendung molekularbiologischer und kulturbasierter Methoden die Art und Häufigkeit von Resistenzgenen in einer Kohorte von Flüchtlingen (n = 506) und in einer Kontrollkohorte des deutschen FoCus-Netzwerks (n = 100) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Primer- und SONDENSSETS unter den gewählten universellen Amplifikationsbedingungen hohe analytische Spezifitäten aufweisen. Anhand von DNA-Verdünnungsreihen konnten hohe PCR-Effizienzen zwischen 65,5 % und 114,0 % und Nachweisgrenzen in einem Bereich von 1 bis 29 Genomäquivalente pro Reaktionsvolumen ermittelt werden. Der molekularbiologische Nachweis aller MRE direkt aus Screening-Proben ergab eine Sensitivität und

Spezifität von 68 % und 88 % sowie positiv- und negativ-prädikative Werte von 41 % und 96 %.

Zusammenfassend stellt die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte TaqMan® Real-Time PCR ein leistungsfähiges und schnelles Testsystem zum direkten Nachweis von MRE dar, das es ermöglicht, MRE-tragende Patienten frühzeitig zu identifizieren oder präventive Isolationsmaßnahmen zeitnah zu beenden. Darüber hinaus konnten unter Verwendung einer mikrofluiden TaqMan® Array Card Plattform erstmals molekularbiologische Daten erhoben werden, die zeigen, dass Resistenzdeterminanten, die häufig eine Multiresistenz in gramnegativen Erregern vermitteln, mit stark erhöhten Prävalenzen in der Kohorte Flüchtlinge vorkommen. Antibiotikaresistenzgene sollten daher, vor dem Hintergrund des horizontalen Gentransfers, stärker in Gesundheitseinrichtungen berücksichtigt und potentielle Risiken für Betroffene erforscht werden.

Abstract

Multidrug-resistant organisms (MDRO) represent a substantial worldwide threat for human health, especially in hospitalized patients. Most clinically relevant are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and a variety of multidrug-resistant gram-negative bacteria resistant to extended-spectrum β -lactams and/or carbapenems. Infections caused by MDRO are difficult to treat and are associated with increased morbidity and mortality rates. At the same time, violent crisis in the Middle East have forced millions of people to flee their countries seeking refuge in parts of central Europe. Consequently, Germany faces large influxes of migrants who fled from and via countries known to be MDRO endemic potentially posing an unknown risk especially at hospital admission. Since infected or colonized patients may serve as a reservoir and vehicle for the spread of MDROs in hospitals, a rapid identification of these pathogens is crucial for the initiation of appropriate infection control measures. Current screening methods however suffer two major limitations: 1) culture based methods have routinely long turnaround times and 2) existing molecular tests detect only one MDRO at a time and focus on very few resistance gene groups.

In order to overcome current methodological limitations, a fast TaqMan[®] Real-Time PCR approach was developed to simultaneously detect 42 resistance determinants in clinically relevant MDROs. Technical and clinical performance was evaluated by using DNA extracts of 72 reference strains known to harbour target resistance genes and 73 clinical screening specimens from hospitalized patients with high risk of MDRO colonization. Results of the TaqMan[®] Real-Time PCR System were compared to those of a routine culture-based screening with chromogenic selective media. The established system was utilized to conduct a descriptive study investigating the presence of antibiotic resistance genes in 506 refugees mainly originating from Syria, Iraq and Afghanistan and 100 German controls (FoCus Cohort) employing these culture-independent and culture-based methods.

Utilizing reference strains, all targeted resistance genes were correctly detected and no false positive results were observed suggesting a good sensitivity and specificity of each individual assay. Dilution experiments revealed PCR efficiencies between 65,5 % and 114,0 % which enables high analytical sensitivities with detection limits between 1 and 29 genome equivalents per reaction. For the overall detection of MDROs directly from screening specimens, the molecular test showed 68 % sensitivity and 88 % specificity and had positive and negative predictive values of 41 % and 96 %, respectively.

In conclusion, the presented approach turned out to be an appropriate screening test to rapidly identify MDRO carriers or to discontinue pre-emptive isolation upon negative test results during hospital admission. Furthermore, the application of the microfluidic TaqMan[®] Real-Time PCR approach enabled for the first time to systematically assess antibiotic resistance genes and MDROs in a cohort of refugees, who show a substantially increased prevalence for resistance genes mostly occurring in multidrug-resistant gram-negative bacteria when compared to a cohort of German controls. Antibiotic resistance genes may thus require both more attention in health care facilities and further research on potential risks for affected people.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Einführung neuer Antibiotika und die Entdeckung von resistenten Pathogenen im Verlauf der Zeit.....	3
Abbildung 2	Resistenzraten nehmen speziesübergreifend zu.....	5
Abbildung 3	Resistenzraten in Deutschland und den Niederlanden.....	13
Abbildung 4	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Probenmatrix.....	35
Abbildung 5	Temperaturprofil I für die Real-Time PCR in Einzelreaktionen.....	49
Abbildung 6	Die Mikrofluidik-Architektur der TaqMan® Array Card.....	55
Abbildung 7	Temperaturprofil II für die Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards.....	58
Abbildung 8	Vergleich von vier Extraktionsmethoden bei sinkender Ausgangskeimzahl.....	67
Abbildung 9	Inhibition des exoIPC Assays durch Bestandteile der Probenmatrix	68
Abbildung 10	Inhibition des exoIPC Assays durch diverse Transportmedien.....	70
Abbildung 11	Sequenzunterschiede im bla IMP Ziel-Gen verhindern die Hybridisierung von IMP-1 und IMP-2 Taqman® Sonden.....	74
Abbildung 12	Bestätigung der IMP-Genotypen verschiedener Referenzstämme mittels Endpunkt PCR.....	75
Abbildung 13	Bestätigung der VIM-Genotypen verschiedener Referenzstämme mittels Endpunkt PCR.....	76
Abbildung 14	Amplifikationskurven und Standardkurve zur Bestimmung der Linearität und analytischen Sensitivität am Beispiel von IMP-2.....	77
Abbildung 15	Überwachung der PCR-Inhibition in klinischen Proben anhand der exogenen internen Inhibitionskontrolle (exoIPC).....	81
Abbildung 16	Prävalenz der Vancomycin-Resistenzgene.....	88
Abbildung 17	Prävalenz der 10 häufigsten Antibiotikaresistenzgene des gramnegativen Erregerspektrums.....	89
Abbildung 18	Anzahl der in den Stuhlproben detektierten Antibiotikaresistenzgene pro Individuum.....	90
Abbildung 19	Prävalenz pathogener Bakterien in Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte.....	91
Abbildung 20	Anzahl der in den Stuhlproben detektierten Pathogene pro Individuum.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Referenzstämme und klinische Isolate	23
Tabelle 3-1	Übersicht der verwendeten Probenmaterialien	26
Tabelle 3-2	Beschreibung der Kohorte Flüchtlinge.....	28
Tabelle 3-3	Beschreibung der FoCUS Kontrollkohorte	29
Tabelle 3-4	Aufbau der Bakterienverdünnungsreihe	31
Tabelle 3-5	Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der extrahierten Bakteriengenome	33
Tabelle 3-6	Sequenzen und Eigenschaften der entwickelten Primer- und Sondensets	43
Tabelle 3-7	GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für <i>bla</i> OXA-48 ähnliche Carbapenemasen	45
Tabelle 3-8	GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für <i>bla</i> OXA-23, OXA-40 und OXA-58 ähnliche Carbapenemasen	46
Tabelle 3-9	GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für <i>bla</i> NDM-1 ähnliche Carbapenemasen.....	47
Tabelle 3-10	Reaktionsansatz für die Real-Time PCR in Einzelreaktionen	48
Tabelle 3-11	DNA-Verdünnungsreihen zur Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen.....	50
Tabelle 3-12	TaqMan® Assays zur Untersuchung der Kohorte stationäre Patienten	53
Tabelle 3-13	TaqMan® Assays, die auf TaqMan® Array Cards implementiert wurden.	56
Tabelle 3-14	Reaktionsansatz für Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards (TAC)	57
Tabelle 3-15	DNA-Verdünnungsreihen zur Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards	59
Tabelle 3-16	Primer zur Amplifikation verschiedener Metallo-β-Lactamase-Gene	61
Tabelle 3-17	Standard Reaktionsansatz für Endpunkt PCR.....	62
Tabelle 3-18	Temperaturprofile (A, B) für die Endpunkt PCR zur Detektion von <i>bla</i> VIM und <i>bla</i> IMP	62
Tabelle 3-19	Temperaturprofile (C, D) für die Endpunkt PCR zur Detektion von <i>bla</i> VIM und <i>bla</i> IMP	62
Tabelle 4-1	Arbeits- und Zeitaufwand verschiedener DNA-Extraktionsmethoden	67
Tabelle 4-2	Effekt eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes auf die Extraktionseffizienz der thermischen Lysemethode	71
Tabelle 4-3	Ergebnisse der analytischen Spezifitätsprüfung in Einzelreaktionen	73
Tabelle 4-4	Ergebnisse der analytischen Sensitivitätsprüfung in Einzelreaktionen	78
Tabelle 4-5	Molekularbiologische Detektion von Resistenzgenen in der Kohorte stationäre Patienten	80
Tabelle 4-6	Ergebnisse des MRE Nachweises mittels TaqMan® Real-Time PCR in klinischen Proben stationärer Patienten im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard	82
Tabelle 4-7	Vorkommen von ESBL-Genotypen in Patientenproben, die in der TaqMan® Real-Time PCR richtig-positiv erkannt wurden.....	83
Tabelle 4-8	Ergebnisse der analytischen Sensitivitätsprüfung auf TaqMan® Array Cards	85

Tabelle 4-9	Übersicht der verfügbaren molekularbiologischen und kulturbasierten Daten	86
Tabelle 4-10	Prävalenz von Antibiotikaresistenzgenen in kombinierten Abstrich-Proben der Nasenvorhöfe, des Rachens und der Leistenregion.....	93
Tabelle 4-11	Prävalenz pathogener Erreger in Abstrich-Proben aus der Kohorte Flüchtlinge basierend auf einer 16S rRNA-Gen Analyse	94
Tabelle 4-12	Prävalenz multiresistenten Erreger in der Kohorte Flüchtlinge	95
Tabelle 8-1	Übersicht über die verwendeten TaqMan® Real-Time Assays.....	153

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Name einer β -Lactamase, <i>H. alvei</i> -Gruppe Plasmid-codierter AmpC β -Lactamasen, Ambler class C
ACT	Name einer β -Lactamase, AmpC type
AE	QIAamp DNA Mini Kit Elutionspuffer
ampC	Name einer β -Lactamase
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AsylG	Asylgesetz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATL	QIAamp DNA Mini Kit Lysepuffer
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> Nährmedium
BIL	Name einer β -Lactamase, erstmals beschrieben in Patient Bilal
bla	<i>beta-lactamase gene</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CA-MRSA	<i>community-acquired</i> Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CI	<i>confidence interval</i>
CMY	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen Cephamicine
CRE	Carbapenem-resistente Enterobakterien oder Erreger
Ct	<i>Thershold Cycles</i>
CTX-M	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen Cefotaxim, isoliert in München
d.h.	das heißt
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DHA	Name einer β -Lactamase, <i>M. morgani</i> -Gruppe Plasmid-codierter AmpC β -Lactamasen, gefunden in Dhahran
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EARS-Net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
erm	<i>erythromycin ribosom methylase</i>

ESBL	<i>Extended-Spectrum beta-Lactamase</i>
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EU	Europäische Union
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
exoIPC	exogene interne Positivkontrolle
fem	<i>Factor essential for expression of methicillin resistance</i>
FoCus	<i>Food Chain Plus</i>
FOX	Name einer β -Lactamase, <i>A. sobria</i> -Gruppe Plasmid-codierter AmpC β -Lactamasen, aktiv gegen Cefoxitin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GE	Genomäquivalente
GES	<i>Guyana Extended-Spectrum β-Lactamase</i>
HA-MRSA	<i>healthcare-acquired</i> Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
HGT	Horizontaler Gentransfer
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMP	Name einer Carbapenemase, aktiv gegen Imipenem
KBE	Keimbildende Einheiten
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KONS	Koagulase-negative Staphylokokken
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionspräventionen
LA-MRSA	<i>livestock associated</i> Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
LAT	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen Latamoxcef
LOD	<i>limit of detection</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
mecA	Methicillin-Resistenzdeterminante
mef	<i>macrolide efflux gene</i>
MIR	Name einer β -Lactamase, gefunden im Miriam Krankenhaus
MOX	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen Moxalactam
MRE	multiresistente Erreger
MRGN	Multiresistente gramnegative Erreger

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
NC	<i>negative control</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NDM	<i>New Delhi Metallo-β-Lactamase</i>
NPV	<i>negative predictive value</i>
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTC	<i>no template control</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
orfX	<i>open reading frame X</i>
OTC	<i>over the counter</i>
OXA	Name einer β -Lactamase, aktiv gegen Oxacillin
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PC	<i>positive control</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	<i>pandrug resistance</i> oder <i>pandrug-resistant</i>
PER	<i>Pseudomonas Extended-Spectrum β-Lactamase</i>
PPV	<i>positive predictive value</i>
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
qnr	<i>quinolone resistance gene</i>
QRDR	<i>quinolone-resistance determining region</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RSD	<i>relative standard deviation</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARI	Surveillance der Antibiotika-Anwendung und bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen
SCCmec	<i>Staphylococcus cassette chromosome mec</i>

SD	<i>standard deviation</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SHV	Name einer β -Lactamase, <i>Sulphydryl reagent variable</i>
spp.	<i>species pluralis</i> , verschiedene Spezies der genannten Gattung
TAC	TaqMan [®] Array Card
TEM	Name einer β -Lactamase, erstmals beschrieben in Patient Temoneira
TOF	<i>time of flight</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UN	<i>United Nations</i>
USA	<i>United States of America</i>
van	<i>vancomycin resistance gene</i>
VEB	<i>Vietnamese Extended-Spectrum β-Lactamase</i>
VIM	<i>Verona Integron-Encoded Metallo-β-Lactamase</i>
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Historie von Antibiotikaresistenzen

Antibiotika gehören zu den größten Errungenschaften der modernen Medizin. Noch bis zum Ende des 19. Jahrhunderts waren durch Bakterien verursachte Infektionskrankheiten, wie Syphilis und Tuberkulose, oder Infektionen der Haut sowie der Harn- oder Atemwege nicht behandelbar und führten häufig zum Tode. Die Ätiologie dieser Infektionskrankheiten war zu dieser Zeit unbekannt, so ging man davon aus, dass die Ansteckung durch immaterielle Ausdünstungen aus Böden, Sümpfen oder Leichen, den sogenannten *Miasmen*, erfolgte [1]. Im Jahr 1847 machte Ignaz Semmelweis als Assistenzarzt in der Geburtshilfeabteilung des Allgemeinen Krankenhauses in Wien eine bemerkenswerte Beobachtung. Mütter, die von Ärzten oder Medizinstudenten entbunden wurden, hatten eine weitaus höhere Kindsbettfieber-bedingte Mortalität (13 – 18 %) als Mütter, die von Hebammenschülerinnen oder Hebammen entbunden wurden (2 %). Er erkannte, dass Medizinstudenten, die verstorbene Wöchnerinnen autopsierten und anschließend auch vaginale Untersuchungen während einer Entbindung vornahmen, das „Krankheitsgift“ übertrugen. In der Folge hielt er die behandelnden Ärzte und Medizinstudenten dazu an, sich vor der Entbindung die Hände mit Chlorwasser zu waschen und konnte so die Sterblichkeitsrate auf 2 % und somit auf das Niveau der Hebammen senken [2]. Der Verdacht, dass Ansteckungskrankheiten durch die Übertragung von und die Infektion mit Mikroorganismen verursacht werden könnten, wurde von Luis Pasteur intensiv untersucht und später durch die systematischen Arbeiten Robert Kochs im Jahre 1876 zur sicheren Erkenntnis [1]. Auf Grundlage dessen konnten die krankheits-verursachenden Bakterien erforscht und die Untersuchung von antibakteriell wirkenden Substanzen sowie die Entwicklung der ersten Antibiotika vorangetrieben werden. Als einer der Ersten erkannte Paul Ehrlich, dass Anilinfarbstoffe selektiv bestimmte Mikroorganismen anfärbten, andere jedoch nicht und entwickelte daraufhin die Vorstellung von einer „Zauberkegel“, die ihre volle Wirkung allein im Krankheitserreger entfaltet. Getrieben von dieser Idee konnte Ehrlich in Zusammenarbeit mit dem Mikrobiologen Sahachiro Hata durch großangelegte systematische Versuchsreihen, die als Vorbild für die moderne Arzneimittelforschung anzusehen sind, im Jahr 1910 das Salversan genannte Arsphenamin zur Behandlung der bis dato unheilbaren Syphilis entwickeln [3]. In den folgenden Jahren wurde durch die systematische Testung der antimikrobiellen Wirkung verschiedenster Azofarbstoff-Verbindungen das Prontosil genannte Sulfamidochrysoidin entdeckt und im Jahr 1934 erstmals durch Chemiker der IG Farben (Bayer) synthetisiert. Im Jahr darauf konnte der deutsche Arzt Gerhard Domagk im Tierversuch die Wirksamkeit Prontosils bei Infektionen mit Staphylokokken und Streptokokken belegen, womit der erste Arzneistoff aus der Gruppe der Sulfonamid-Antibiotika zur Verfügung stand [4]. In England, zu etwa der gleichen Zeit, versuchte Alexander Fleming seine im Jahr 1928 zufällig gemachte Entdeckung, dass Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* es vermochten, Staphylokokken abzutöten, medizinisch nutzbar zu machen. Jedoch gelang es Fleming

erst nach 12 Jahren akribischer Forschung, und in Zusammenarbeit mit den Oxford Chemikern Howard Florey und Ernest Cain den Penicillin bzw. Benzylpenicillin genannten Wirkstoff in Mengen zu isolieren, die für eine klinische Anwendung hinreichend waren [3]. Sowohl das Prontosil als auch das Penicillin wurden fortan massenhaft produziert und im Zweiten Weltkrieg zur Prophylaxe der Wundinfektion bei verletzten Soldaten verwendet – Prontosil auf deutscher Seite und Penicillin auf Seiten der Alliierten. Ausgehend von den ersten drei Antibiotika – Salversan, Prontosil und Penicillin – begann eine Ära, in der immer mehr Derivate und neue Antibiotikagruppen entwickelt wurden, deren breiter Einsatz zum Erfolg der modernen Medizin maßgeblich beitrug. Doch bereits Fleming warnte in seinem Vortrag anlässlich der Verleihung des Nobelpreises im Jahr 1945 davor, dass eine falsche Anwendung, vor allem eine Unterdosierung, die Gefahr der Entwicklung von Penicillin-resistenten Stämmen birgt:

„The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant“ [5].

Bereits kurz nach der Einführung des Benzylpenicillins wurden Infektionen mit Penicillin-resistenten Staphylokokken beobachtet und die Substanz verlor in den folgenden Jahren zunehmend an Wirksamkeit. Als Ursache dieser Resistenz konnte bereits 1940 ein bakterielles Enzym, die Penicillinase, von Ernest Chain identifiziert werden [6]. Im Jahr 1959 wurde das Methicillin als Penicillinase-stabiles Penicillin eingeführt, nur 2 Jahre später wurden vermehrt auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Isolate (MRSA) beobachtet und das Wettrennen zwischen Mensch und Mikrobe begann [7]. Abbildung 1 zeigt exemplarisch den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Einführung neuer Antibiotikagruppen und der Entdeckung der korrespondierenden Resistenzen in humanpathogenen Bakterien. In ähnlicher Weise entwickelten pathogene *Enterobacteriaceae* nicht nur eine Resistenz gegenüber Penicilline, sondern im weiteren Verlauf auch gegenüber partialsynthetische Penicilline, Cephalosporine und sogar Carbapeneme [8]. Auch wenn dabei der Eindruck entsteht, die Ausbildung einer Resistenz sei ausschließlich die Folge der menschlichen Nutzung von antibakteriell wirkenden Substanzen, so stellt die Antibiotikaresistenz tatsächlich eine natürliche Fähigkeit dar, die Bakterien gegenüber antibakteriellen Stoffwechselprodukten anderer Mikroorganismen, z.B. *Penicillium notatum* oder Tetracyclin-produzierende *Streptomyces* spp., schützt [1,9]. Genauso wie antimikrobiell wirkende Stoffe waren auch entsprechende Resistenzen als evolutionäre Antwort von Anbeginn in der Umwelt vorhanden. Barlow & Hall *et al.* konnten zeigen, dass Bakterien verschiedene β -Lactamase-Gene bereits vor mehreren Millionen Jahren in sich trugen [10,11]. Die Resistenz entsteht dabei entweder durch Mutationen im eigenen Genom oder durch die Aufnahme transferabler Resistenzgene von anderen Bakterien innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, wobei die Gesamtheit aller bakteriellen Gene innerhalb dieser Gemeinschaft als Mikrobiom und die darin enthaltenen Resistenz-vermittelnden Gene als Resistom bezeichnet werden [12].

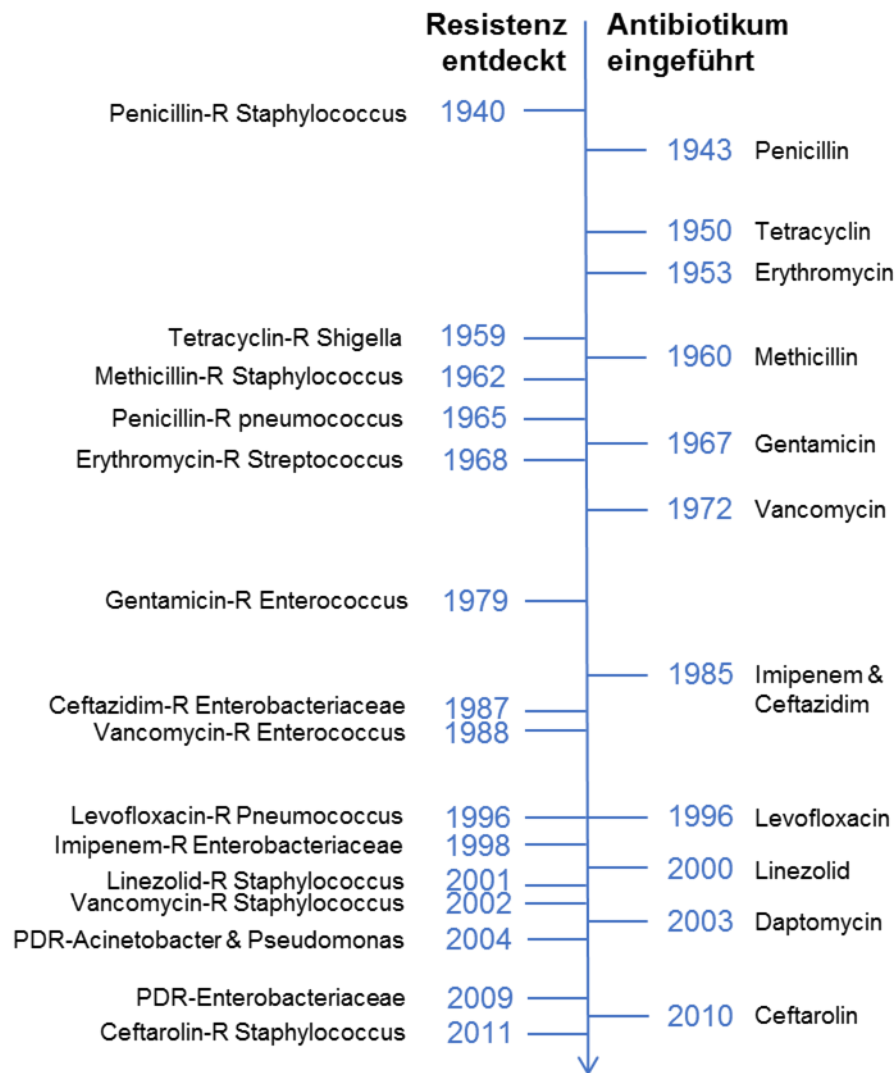


Abbildung 1 Die Einführung neuer Antibiotika und die Entdeckung von resistenten Pathogenen im Verlauf der Zeit

Die Jahresdaten basieren auf frühe Berichte in der wissenschaftlichen Literatur. Im Falle der *pandrug-resistant* (PDR) *Acinetobacter* und *Pseudomonas* Spezies basiert die Jahreszahl auf erstmalig dokumentierte klinische Ausbrüche. Der Begriff *pandrug-resistant* ist eine speziesabhängige, international verwendete Definition, für ein Isolat, das gegen alle für die betreffende Spezies zugelassenen und gebräuchlichen Antibiotikaklassen resistent ist. Die Abbildung wurde in Abwandlung aus dem *Antibiotic Resistance Threats Report* der *Centers for Disease an Prevention* (CDC) übernommen [13].

Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge führte zum einen der massive Antibiotika-Einsatz in Humanmedizin, Veterinärmedizin und Tiermast [14,15] und zum anderen die Freisetzung von Produktionsabfällen [6,16] zu einer forcierten Selektion von resistenten Stämmen in Umwelt und Klinik. In der Tiermast werden Antibiotika nicht nur therapeutisch in einzelnen, erkrankten Tieren angewendet, sondern metaphylaktisch in der gesamten Mastherde des betreffenden Tieres [17]. Da die Arzneistoffe über die Nahrung oder das Trinkwasser zugeführt werden, sind therapeutische Spiegel nicht gewährleistet. Die direkten Auswirkungen auf die Resistenzlage in der Humanmedizin sind dabei umfassend belegt [18,19]. Die kontroverse Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer wurde daher im Jahr 2006 von der *European Medicines Agency* (EMA) in der EU verboten, allerdings existiert in den USA nur ein freiwilliger Verzicht [20]

und in Entwicklungsländern keine Reglementierung in dieser Hinsicht [21]. In absoluten Zahlen wurden im Jahr 2014 insgesamt 1.238 Tonnen Antibiotika an Tierärzte abgegeben, wohingegen im humanmedizinischen Bereich insgesamt 700 – 800 Tonnen eingesetzt wurden, von denen ca. 85 % auf den ambulanten und 15 % auf den stationären Bereich entfielen [22]. Auch wenn der Verbrauch in der Veterinärmedizin weitaus größer ist, bedingen vor allem der freie Antibiotikazugang, überwiegend in Entwicklungsländern, und die inadäquate Antibiotikaverschreibung im humanmedizinischen Sektor eine Zunahme von Resistenzen im Allgemeinen und spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Reserve-Antibiotika im Speziellen [23,24].

Die Weitergabe und Verbreitung der Resistenzgene erfolgt dabei nicht nur klonal, sondern auch horizontal zwischen Bakterien einer Spezies, verschiedenen Spezies und sogar verschiedenen Gattungen. Der horizontale Gentransfer (HGT) via Konjugation, Transduktion oder Transformation erlaubt darüber hinaus die Vernetzung von mikrobiellen Gemeinschaften unterschiedlichster Habitats, wie z.B. marine Gewässer, Böden und eben auch der mikrobiellen Flora von Mensch und Tier [25,26]. Der HGT zwischen Bakterien erfolgt dabei hauptsächlich konjugativ mittels mobiler genetischer Elemente wie Plasmide, Transposons und Integrons [25]. Da die Resistenz aus evolutionsbiologischer Sicht einen natürlichen Vorteil darstellt, akkumulieren derartige Resistenzdeterminanten zusammen mit Virulenzfaktoren auf einem einzigen Plasmid, das dann eine bakterielle Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotikaklassen (Multiresistenz) vermittelt [6]. Somit existiert ein reiches und weitverbreitetes Resistenzgen-Reservoir, an dem sowohl apathogene Kommensalen als auch pathogene Spezies der Mikroflora des Menschen via HGT teilhaben, und das die Basis für das Auftauchen und die Verbreitung von phänotypischen Resistenzen in klinisch relevanten Humanpathogenen bildet [27–29]. Humanpathogene Keime, die mehrere phänotypische Resistenzen gegenüber Antibiotika verschiedener Klassen besitzen, werden dabei als multiresistente Erreger (MRE) bezeichnet. Im Falle einer Infektion mit MRE sind die verbleibenden noch wirksamen Antibiotika somit limitiert und eine adäquate Therapie wird erschwert.

1.2 Bedeutung für die Klinik und das Gesundheitssystem

Klinisch bedeutsame Problemkeime wie z.B. der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN), die β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) produzieren und/oder Carbapenem-resistent (CRE) sind, verursachen immer häufiger nosokomial und ambulant erworbene Infektionen, deren Therapieoptionen aufgrund des Fehlens wirksamer Antibiotika limitiert sind [30]. Die in Abbildung 2 dargestellten Daten aus dem SARI-Projekt (Surveillance der Antibiotika-Anwendung und bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen) zeigen, dass der Anteil resistenter Isolate an der Gesamtzahl aller klinischen Isolate zwischen 2008 und 2015

im Falle von VRE und MRGN stark zunimmt und im Falle von MRSA auf einem hohen Niveau stagniert [31].

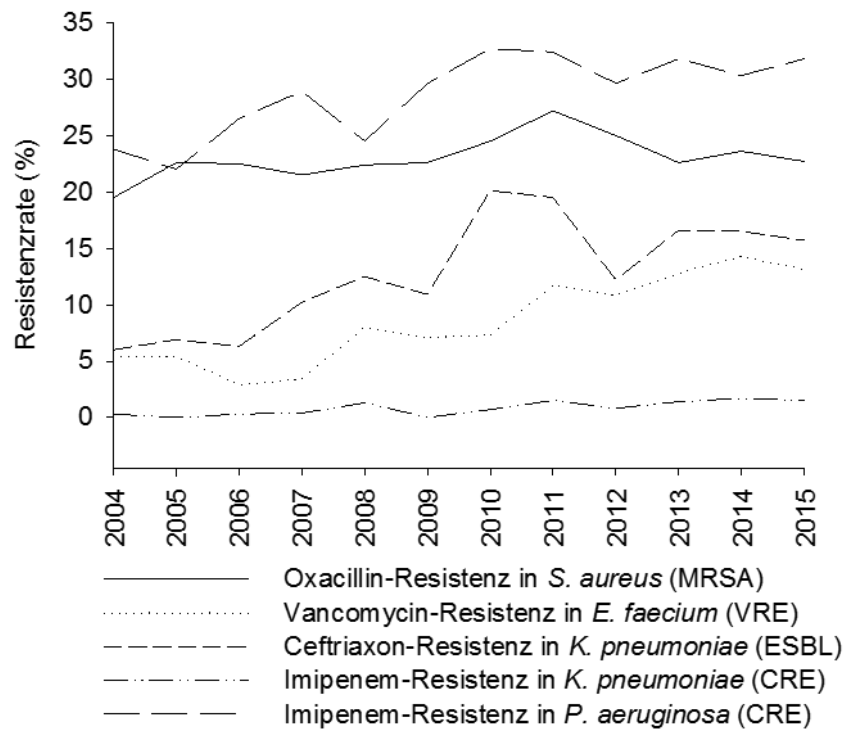


Abbildung 2 Resistenzraten nehmen speziessübergreifend zu

Die Resistenzrate beschreibt den Anteil der resistenten Stämme an der Gesamtzahl aller Isolate, die im Rahmen des SARI-Projektes von den teilnehmenden deutschen Intensivstationen gemeldet wurden [31].

Diese Erreger besitzen zwar eine weitgehende Resistenz, weisen jedoch selten eine erhöhte Pathogenität oder Virulenz auf, sodass vor allem Menschen durch MRE-Infektionen gefährdet sind, die aufgrund von Operationen oder schweren Grunderkrankungen immungeschwächt sind. Tatsächlich stellen MRE vor allem ein Problem bei nosokomialen, d.h. im Rahmen einer stationären Behandlung erworbenen, Infektionen dar. Jährlich infizieren sich circa 500.000 Patienten in deutschen Krankenhäusern mit Problemkeimen, womit nosokomiale Infektionen zu den häufigsten Komplikationen einer stationären Behandlung zählen [32]. Bemerkenswert ist, dass 91 %, 70 % und 75 % der registrierten MRSA-, VRE- und MRGN-Fälle mehrheitlich von außen durch Patienten in die Klinik gebracht werden, die vorher bereits asymptomatisch mit MRE kolonisiert waren [33,34]. Das Risiko für eine Kolonisierung ist stark mit den Ursachen und der Entstehung von Resistenzen assoziiert und wird durch bestimmte Faktoren, wie z.B. antibiotische Therapien in der Vorgeschichte, bestehende Vorerkrankungen, vorhergehende Krankenhausaufenthalte, liegende Katheter und berufsbedingte Kontakte zur Tiermast oder zu Gesundheitseinrichtungen sowie Reisen in Länder mit endemischen MRE-Vorkommen, beeinflusst [35–38].

Somit kommt der frühen Identifizierung dieser Patienten, neben der adäquaten Hygiene, eine zentrale Rolle in der Prävention der Verbreitung innerhalb des Krankenhauses zu. Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) des Robert Koch-Institutes hat aus diesem Grund Richtlinien festgelegt, wonach die aktive

Suche (Screening) nach MRE-besiedelten Patienten unabhängig von klinischen Symptomen gezielt anhand der oben beispielhaft genannten Risikofaktoren empfohlen wird [36,38]. Die Bedeutung eines MRE-Screenings wird anhand zweier Studien ersichtlich, die am Beispiel von MRSA zeigen konnten, dass ohne Screening 69 % - 85 % der MRSA-besiedelten Patienten bei Krankenhausaufnahme unerkannt bleiben und somit potentiell Ausgangspunkte einer unkontrollierten Ausbreitung in der Klinik bilden [39,40].

Besteht bereits eine MRE-Infektion, ist die Therapie deutlich erschwert und das Risiko von Therapieversagen mit fatalem Ausgang steigt. In der Behandlung von MRE-Infektionen wird daher vermehrt auf sogenannte Reserveantibiotika wie Daptomycin, Telavancin, Linezolid im grampositiven, sowie Tigecyclin und Colistin im gramnegativen Erregerspektrum zurückgegriffen, die zwar noch wirksam sind, allerdings auch mit einem höheren Risiko für schwere Nebenwirkungen einhergehen [41]. Aufgrund des vermehrten Therapieversagens sind MRE-Infektionen folglich mit einer höheren Morbidität und Mortalität gekennzeichnet, wobei längere Krankenhausaufenthalte und hohe Krankenhauskosten große ökonomische Auswirkungen auf das Gesundheitssystem haben [30,42,43]. Das *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) schätzt, dass jährlich 25.000 Patienten an Infektionen mit MRE versterben. Allein in Europa verursachen diese vermeidbaren Todesfälle einen ökonomischen Schaden durch zusätzliche Kosten im Gesundheitswesen und durch Produktivitätsverlust von jährlich rund 1,5 Milliarden Euro [44]. Da lediglich sieben ausgewählte MRE in diese Schätzung einbezogen wurden, ist es wahrscheinlich, dass die tatsächlichen Zahlen wesentlich höher sind. Bei Fortschreiten der Resistenzentwicklung könnte die weltweite Zahl der Antibiotikaresistenz-assoziierten Todesfälle bis zum Jahr 2050 von 700.000 auf 10.000.000 steigen und eine von der WHO prophezeite *post antibiotic era* droht Wirklichkeit zu werden [45,46]. Smith & Coast et al. analysierten mögliche medizinische Konsequenzen des Fehlens wirksamer Antibiotika und konnten am Beispiel der perioperativen Antibiotikaphylaxe in der Hüftchirurgie zeigen, dass die Zahl der postoperativen Infektion von 0,5 % - 2 % auf bis zu 50 % steigen würde und rund 30 % der Patienten an dieser Infektion sterben könnten [47]. Das Gesundheitssystem im Allgemeinen und die Kliniken im Besonderen sehen sich daher mit wachsenden Aufgaben bei der Identifikation, Isolation, Sanierung und Behandlung von Patienten konfrontiert, die mit multiresistenten Erregern besiedelt oder infiziert sind. In den folgenden Kapiteln werden die Charakteristika der Erreger mit der aktuell größten klinischen Relevanz vorgestellt.

1.2.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylokokken sind grampositive, kugelförmige Haufenkokken, zeichnen sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen aus und gehören zur physiologischen Standortflora von Mensch und Tier, wobei verschiedene Hautareale sowie die nasalen Schleimhäute Prädilektionsstellen darstellen [1]. Zu den klinisch wichtigsten Spezies dieser Gattung zählen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* und *S. saprophyticus*, von denen *S. aureus*, im Gegensatz zu den übrigen Staphylokokken, eine Koagulase bildet, die sowohl einen wichtigen Virulenzfaktor als auch ein diagnostisches Unterscheidungsmerkmal zur Abgrenzung des *S. aureus* von anderen Koagulase-negativen Staphylokokken (KONS) darstellt. Die potentiell pathogene Spezies *S. aureus* zählt zu den häufigsten Verursachern lokaler Wund- und Weichteilinfektionen sowie von Osteomyelitis, Endokarditis, Sepsis und nosokomialen Pneumonien. Die Pathogenität wird dabei im Wesentlichen durch verschiedene Virulenzfaktoren, wie Koagulasen, Hyaluronidasen, Leukozydine (Panton-Valentine-Leukozydin, PVL) und Hämolsine bestimmt, deren Bildung v.a. mit tiefen, nekrotisierenden Infektionen assoziiert ist [48]. *S. aureus* ist von Natur aus empfindlich gegenüber β -Lactam-Antibiotika, Makrolide, Chinolone, Lincosamide, Linezolid und Glycopeptide wie Vancomycin oder Teicoplanin [1].

Als Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) werden Isolate bezeichnet, die nicht nur gegen Methicillin, sondern gegen alle Antibiotika der β -Lactam-Klasse, einschließlich Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, resistent sind. Der zugrundeliegende Resistenzmechanismus beruht auf der Bildung des Penicillin-bindenden Proteins 2a (PBP2a), eine zusätzliche bakterielle Transpeptidase die am Zellwandaufbau beteiligt ist und als modifizierte Zielstruktur nur eine geringe Affinität gegenüber β -Lactam-Antibiotika aufweist. Auf genetischer Ebene wird PBP2a durch das *mecA*-Gen kodiert, das auf einem Staphylokokken-spezifischen, mobilen genetischen Element, der sogenannten *staphylococcal chromosomal cassette* (SCC*mec*), liegt [49]. Initial zeichneten sich MRSA durch diverse Ko-Resistenzen, insbesondere gegenüber Makrolid-Antibiotika, Chinolone und Lincosamide aus, traten stets im klinischen Umfeld bei Patienten mit bestimmten Risikofaktoren auf und wurden daher als *healthcare-acquired* MRSA (HA-MRSA) bezeichnet. Heute sind weitere Varianten bekannt, die zum einen ambulant erworben und somit bei immunkompetenten Personen ohne klassische Risikofaktoren für eine MRSA-Infektion (*community-acquired*, CA-MRSA) und zum anderen gehäuft im Umfeld von Tiermastbetrieben (*life-stock associated*, LA-MRSA) auftreten und sich in ihrer Resistenz und Pathogenität vom HA-MRSA unterscheiden [34]. Da die SCC*mec* Genkassette in allen Staphylokokken auftritt, ist die Methicillin-Resistenz nicht nur auf die Spezies *S. aureus* beschränkt, sondern kommt mit Raten von bis zu 80 % auch in den verschiedenen Spezies von KONS vor, die auf der menschlichen Haut als Kommensalen ubiquitär vorhanden sind [50]. Unabhängig von der Herkunft des Isolates sind MRSA-Infektionen aufgrund der multiplen Resistenzen oft nur mit Reserve-Antibiotika wie Vancomycin, Teicoplanin oder Linezolid behandelbar, wobei erste Isolate mit zusätzlicher Glycopeptid- oder Linezolid-Resistenz weltweit vereinzelt beobachtet wurden [51–53].

Daten des *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) aus dem Jahr 2009 zeigen, dass sich der Anteil von MRSA an der Gesamtzahl aller klinischen *S. aureus* Isolate aus invasiven Infektionen in den verschiedenen Ländern deutlich unterscheidet. Die MRSA-Raten variieren demnach zwischen weniger als 1 % in Norwegen, Schweden, sowie Holland und 49 %, 40 % und 37 % in Portugal, Griechenland und Italien. Mit 19 % lag Deutschland im Mittelfeld, wobei die MRSA-Rate in den folgenden Jahren auf diesem Niveau stagniert bzw. mit 11,8 % im Jahr 2014 rückläufig ist [54,55].

1.2.2 Vancomycin-resistente *Enterococcus* spp. (VRE)

Enterokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Kokken, gehören serologisch zu den Gruppe D Streptokokken und bilden heute aufgrund von Gensequenz-basierter Taxonomie eine eigene *Enterococcus* genannte Gattung [56]. Sie sind Teil der physiologischen Darmflora sowohl in Mensch als auch in Tier und verursachen aufgrund geringer Pathogenität und Virulenz nur selten Infektionen bei gesunden Menschen [48]. Besonders gefährdet sind somit Früh- und Neugeborene sowie Patienten, deren Immunsystem aufgrund von Operationen oder Vorerkrankungen geschwächt ist. Am häufigsten werden nosokomiale Harnwegsinfekte, Wundinfektionen und seltener Septikämien, die mit Mortalitätsraten von bis zu 58 % assoziiert sind, durch *E. faecalis* oder *E. faecium*, als klinisch wichtigste Vertreter, verursacht [57].

Enterococcus Spezies sind gegenüber Aminopenicillinen und Glycopeptiden sensibel und besitzen intrinsische Resistenzen gegen alle Cephalosporin-, Lincosamid- und Aminoglycosid-Antibiotika (*low-level* Resistenz), ein Umstand, der auch als Enterokokkenlücke bezeichnet wird. *E. gallinarium* und *E. casseliflavus* zeichnen sich zudem durch eine natürliche, *low-level* Vancomycin-Resistenz aus [56]. Zusätzlich können erworbene *high-level* Resistenzen gegen Aminoglycoside, Chinolone und Glycopeptide, wie Vancomycin und Teicoplanin, auftreten [56,57]. Als Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) werden dabei Isolate bezeichnet, die häufig Resistenzen gegen nahezu alle zugelassenen Antibiotika in sich vereinen und zusätzlich eine erworbene *high-level* Vancomycin-Resistenz besitzen. Der Resistenzmechanismus beruht auf einer van-Gen vermittelten Änderung der Zielstruktur von Glycopeptid-Antibiotika. Diese greifen normalerweise in den bakteriellen Zellwandaufbau ein, indem die Quervernetzung des, aus Peptidoglycan bestehenden, Mureins über endständige L-Lysin-D-Alanin-D-Alanin-Gruppen durch Komplexbildung verhindert wird. In VRE wird das terminale Ende jedoch durch D-Alanin-D-Lactat (*high-level*) oder D-Alanin-D-Serin (*low-level*) Gruppen ersetzt, wodurch die Bindungsaffinität von z.B. Vancomycin um das 1000-fache abnimmt und die Quervernetzung nicht mehr effektiv gehemmt wird [56]. Aktuell werden neun van-Gen-Cluster unterschieden, die variierende phänotypische Glycopeptid-Resistenz-Muster vermitteln. Genvarianten vom Typ vanA und vanB sind auf transferablen Plasmiden kodiert und vermitteln die erworbene *high-level* Vancomycin-Resistenz in den klinisch relevanten Spezies *E. faecium* und *E. faecalis*. Die intrinsische *low-level* Vancomycin-Resistenz in *E. gallinarium* und *E. casseliflavus* wird hingegen durch chromosomal kodierte, nicht übertragbare Varianten des vanC-

Genclusters vermittelt. Während vanA gleichzeitig auch eine Teicoplanin-Resistenz vermittelt, bleiben VRE vom Typ vanB und vanC Teicoplanin-sensibel. Die sechs weiteren Vancomycin-Resistenzgene des Typs vanD, vanE, vanG, vanL, vanM und vanN sind teilweise übertragbar, vermitteln unterschiedliche phänotypische Ausprägungen der Resistenz und haben noch keine klinische Relevanz [56,57]. Bemerkenswert ist, dass ein horizontaler Transfer eines Vancomycin-Resistenzgens nicht nur innerhalb der Gattung Enterokokken, sondern auch zwischen Enterokokken und Staphylokokken möglich ist und somit zum Auftreten von Vancomycin-resistenten MRSA (VRSA) führt [58].

Infektionen mit VRE sind aufgrund der wenigen noch verbleibenden Therapieoptionen, wie z.B. Linezolid, Tigecyclin oder Daptomycin, schwer zu behandeln und gehen mit einer gesteigerten Mortalitätsrate einher [59,60]. Daten aus dem deutschen Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) zeigen jedoch, dass über 80 % aller VRE-Fälle in deutschen Kliniken auf Patienten zurückzuführen, die lediglich asymptomatische Träger ohne klinische Anzeichen einer Infektion waren [33]. Besiedelte Patienten stellen nicht nur ein Reservoir für die Verbreitung in der Klinik und die Übertragung auf andere Patienten dar, sondern sind selbst einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt, beispielsweise entwickelten 34 % aller kolonisierten Patienten nach Stammzelltransplantation im Verlauf eine VRE-Sepsis [61]. Ein besonderes Risiko für eine VRE-Besiedelung besteht demnach für intensiv- oder dialysepflichtige Patienten, hämatologisch-onkologische und transplantierte Patienten sowie für Patienten aus Langzeitpflegeeinrichtungen [34].

Aus epidemiologischer Sicht wird der Großteil aller Enterokokken-Infektionen durch *E. faecalis* (60 % - 95 %) verursacht, wohingegen *E. faecium* zwar seltener (5 % - 40 %) für Infektionen verantwortlich ist, allerdings mit 16 % eine wesentlich höhere Resistenzrate im Vergleich zu *E. faecalis* mit < 1 % aufweist [62]. In Europa unterscheiden sich die Resistenzraten, ähnlich wie bei MRSA, erheblich zwischen den einzelnen Ländern, wobei kein klarer Nord-Süd-Gradient erkennbar ist. Die höchsten Resistenzraten wurden demnach aus Irland (38 %), Griechenland (27 %) und Portugal (23 %) gemeldet, wohingegen in Frankreich, Finnland und Holland weniger als 1 % aller Enterokokken-Isolate Vancomycin-resistent waren. Im Vergleich dazu betrug die Resistenzrate im Jahr 2009 in Deutschland zunächst 6 %, stieg im Jahr 2012 auf 16 % und ist seitdem leicht rückläufig [54,55].

1.2.3 Multiresistente gramnegative Stäbchen (MRGN)

Zu den gramnegativen Stäbchenbakterien zählen eine Vielzahl von Familien und Gattungen, wobei Spezies aus der *Enterobacteriaceae* Familie (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* u.a.) sowie Vertreter der nichtfermentierenden Gattungen (Nonfermenter) *Pseudomonas* und *Acinetobacter*, schwere, hauptsächlich nosokomiale Infektionen verursachen können und somit die größte klinische Relevanz besitzen [32]. Während *Enterobacteriaceae* spp. häufig zur physiologischen Flora des menschlichen Darms gehören, stellen *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. Umweltkeime dar, die ubiquitär in Feuchthabitaten sowie auf Haut und Schleimhäuten vorkommen. In der

Regel handelt es sich somit um fakultative bzw. opportunistische Pathogene die überwiegend nosokomiale Harnwegsinfektionen, Pneumonien, Wundinfektionen und Septitiden bei Patienten verursachen, deren Immunabwehr durch Grunderkrankungen, Operationen oder medikamentöse Therapien kompromittiert ist [1,34,48]. Antibiotika-sensible Stämme sprechen gewöhnlich gut auf Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme oder Gyrasehemmer an, wobei einige Spezies wie *Klebsiella pneumoniae* oder *Enterobacter cloacae* mit Penicillinen, aufgrund intrinsischer β -Lactamasen, nur in Kombination mit β -Lactamase-Inhibitoren therapiert werden können. Besonders *Pseudomonas aeruginosa* besitzt weitreichende natürliche Resistenzen gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen der 1. bis 3. Generation [34,63]. Die intrinsische Resistenz beruht zumeist auf die erhöhte Expression von Effluxpumpen, den Verlust von Porinen oder der Bildung von natürlichen, chromosomal kodierten β -Lactamasen [64]. Ursächlich für die rapide Zunahme der Resistenz in diversen Spezies sind jedoch hauptsächlich β -Lactamasen, die als bakterielle Enzyme in der Lage sind, den für diese Antibiotikagruppe typischen β -Lactam-Ring hydrolytisch zu spalten und somit verhindern, dass die Transpeptidase (Penicillin-bindendes Protein, PBP) als Zielstruktur aller β -Lactam-Antibiotika gehemmt wird. Der extensive Einsatz dieser Antibiotikagruppe führte in den letzten Jahren zur Entwicklung von β -Lactamasen, die Penicilline, Cephalosporine der 1., 2. und 3. Generation und Aztreonam hydrolysieren (Extendet Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) oder darüber hinaus eine Resistenz gegen alle Antibiotika dieser Gruppe, einschließlich der Carbapeneme (sogenannte Carbapenemasen), verleihen. ESBL werden häufig durch Plasmid-kodierte *bla*-Gene vermittelt, die mehrheitlich den drei Genfamilien TEM, SHV und CTX-M zugeordnet werden können. Ausgehend von den parental Breitspektrum-Varianten TEM-1, TEM-2 und SHV-1 entwickelten sich durch Punktmutationen (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) neue Varianten, die durch ein erweitertes Substratspektrum gekennzeichnet waren. Bis heute umfassen diese Familien mehrere hundert Varianten, die mehrheitlich ESBL vermitteln und von denen einige Typen, wie z.B. TEM-3, SHV-12 und CTX-M 15, globale Verbreitung fanden. Des Weiteren sind die Plasmid-kodierten ESBL-Familien OXA, PER, GES und VEB von großer klinischer Relevanz, wenngleich ihre Verbreitung noch auf bestimmte Regionen beschränkt ist. Zusätzlich kommt das Gen der ampC β -Lactamase in den Chromosomen von nahezu allen Spezies der *Enterobacteriaceae* vor, vermittelt allerdings nur einen ESBL-Phänotyp, wenn eine Promoter-assoziierte Überexpression des ampC-Enzyms vorliegt [63–66]. Mittlerweile wurden jedoch diverse Plasmid-kodierte ampC-Gene entdeckt, die phylogenetisch von den chromosomal-kodierten ampC Varianten verschiedener Spezies abstammen, konstitutiv hoch exprimiert und via HGT verbreitet werden. Dazu zählen v.a. Varianten aus den Genfamilien ACC, ACT, MIR, BIL, LAT, CMY, DHA, FOX und MOX [64].

Da die Auswahl noch wirksamer Antibiotika-Gruppen zur Behandlung von ESBL-Infektionen stark limitiert ist, werden in der Folge immer häufiger Carbapeneme zur Behandlung schwerer nosokomialer Infektionen angewendet. Als Konsequenz der zunehmenden Carbapenem-Exposition und dem daraus resultierenden Selektionsdruck entwickelten sich dann erste Carbapenem-resistenten Isolate, bei denen faktisch kein

β -Lactam-Antibiotikum mehr wirksam ist und nur zwei Optionen verbleiben: Colistin oder Tigecyclin [63,67]. Eine Carbapenem-Resistenz in *Enterobacteriaceae* und Nonfermentern wird dabei entweder durch eine Kombination aus Porinverlust und Expression einer ESBL bzw. ampC β -Lactamase [68] oder, wesentlich häufiger, durch die Bildung spezifischer Carbapenem-hydrolysierender β -Lactamasen, im Folgenden Carbapenemasen genannt, verursacht [63]. Ähnlich wie ESBL werden Carbapenemasen mehrheitlich durch Plasmid-kodierte *bla*-Gene kodiert, die den HGT zwischen verschiedenen Spezies ermöglichen und aufgrund der schnellen Verbreitung und des Fehlens etwaiger Therapieoptionen von besonderer klinischer Bedeutung sind [63,64]. Zu den wichtigsten Carbapenemasen, die weltweite Verbreitung fanden oder lokal endemisch vorkommen, gehören sowohl die zu den Serin- β -Lactamasen zählenden Typen KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) und OXA (Oxacillinase) als auch Metallo- β -Lactamasen wie NDM (New Delhi- β -Lactamase), VIM (*Verona integron-encoded β -lactamase*) oder IMP (Imipenemase), wobei jedes dieser Enzyme auf genetischer Ebene durch diverse Genvarianten oder Gencluster repräsentiert wird [64,69,70]. Besonders OXA- β -Lactamasen zeichnen sich mit fast 500 *bla*-Gen-Varianten durch eine hohe genetische Diversität aus, die sowohl Breitspektrum- und *Extended Spectrum* β -Lactamasen als auch Carbapenemasen umfasst [71]. Wichtige Carbapenemase-kodierende Gencluster sind OXA-48-ähnliche Varianten, die von verschiedenen *Enterobacteriaceae* Spezies exprimiert werden und Varianten, wie OXA-23, OXA-40, OXA-58 und OXA-72, die ausschließlich in der Spezies *A. baumannii* zu finden sind [72,73].

Epidemiologische Daten aus dem EARS-NET zeigen Carbapenem-Resistenzraten in *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*) zwischen weniger als 1 % in z.B. Norwegen, Dänemark und Deutschland, mehr als 25 % in Italien, Bulgarien und Rumänien, bis hin zu 63 % in Griechenland [74]. Dennoch wird auch in Nordeuropa eine besorgniserregende Zunahme der Resistenzraten beobachtet [54]. Die in Deutschland am häufigsten isolierten Genvarianten umfassen OXA-48-ähnliche Typen, VIM, NDM und KPC [75].

Bedingt durch die Vielzahl verschiedener Spezies, die Diversität der zugrundeliegenden Resistenzdeterminanten und die mögliche Mehrfachresistenz gegenüber diversen Antibiotika-Klassen, ermöglichte die KRINKO mit Einführung des Begriffs Multiresistente gramnegative Erreger (MRGN) eine einheitliche Definition anhand einer vereinfachten Klassifikation. Nach erfolgter phänotypischer Resistenztestung des jeweiligen Isolates wird geprüft, ob Resistenzen gegen Vertreter aus den vier bakterizid wirkenden Antibiotika-Gruppen Acylureidopenicilline (Piperacillin), Cephalosporine (3./4. Generation, z.B. Cefotaxim), Carbapeneme (Imipenem) und Fluorchinolone (Ciprofloxacin) vorhanden sind. Je nachdem gegen wie viele Gruppen eine phänotypische Resistenz besteht, wird das Isolat bei drei von vier Gruppen als 3MRGN und bei vier von vier Gruppen als 4MRGN klassifiziert [38]. Dabei ist zu beachten, dass diese vereinfachende Klassifizierung ausschließlich der Ergreifung adäquater Hygienemaßnahmen dient und keinesfalls zur Ableitung therapeutischer Maßnahmen

geeignet ist, da andere, möglicherweise wirksame, Antibiotika nicht berücksichtigt werden.

1.3 Aktuelle Herausforderungen durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen

Die weltweit zunehmende Verbreitung von Bakterien, die gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent sind, ist zu einer der größten Gefahren des 21. Jahrhunderts für die menschliche Gesundheit geworden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt dies im Jahr 2014 erschienenen *Global Report on Antimicrobial Resistance Surveillance* heraus und warnt eindringlich vor einer postantibiotischen Ära, einer zukünftigen Epoche in der es keine wirksamen Antibiotika mehr gibt [21]. Um dieser beschleunigten Entwicklung entgegen zu treten, bekräftigten die Mitglieder der Vereinten Nationen (UN) im September 2016 den Beschluss, nationale Strategien zur Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen zu entwickeln, die sich am globalen WHO Aktionsplan orientieren [76,77]. Die Herausforderungen haben dabei globale Ausmaße und müssen durch koordinierte Maßnahmen der einzelnen Nationen angegangen werden. Aus diesem Grund sehen sowohl der WHO Aktionsplan als auch die Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART), als nationales Abbild, Maßnahmen in einem „One Health“ – Ansatz vor, die sowohl den human- und veterinärmedizinischen Sektor als auch die Umwelt als relevantes Resistenzreservoir betreffen. Dazu zählen die adäquate Verschreibung und Abgabe der verbleibenden Antibiotika sowie die verstärkte Überwachung und Restriktion der Antibiotikaverbräuche, nicht nur auf nationaler, sondern insbesondere auch auf internationaler Ebene. Des Weiteren ist die länderübergreifende Überwachung der Art und Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen in Form einer Antibiotika-Resistenz Surveillance von zentraler Bedeutung, um neu auftretende Resistenzen frühzeitig zu erkennen und um das Ordnungsverhalten der Resistenzsituation anzupassen [77,78]. Das Resistenzproblem wird zusätzlich durch den Mangel an neuen, antibiotisch wirksamen Substanzen verschärft. Nach Einführung der Carbapeneme im Jahr 1985 wurden bis zum Jahr 2000 keine und seitdem nur wenige grundlegend neue Antibiotikaklassen mit alternativen Wirkmechanismen entwickelt, die für die Behandlung bereits resistenter Bakterien essentiell sind [30,79]. In der Antibiotikaentwicklung stehen sich hohe Entwicklungskosten und kurze Therapie- sowie Patentlaufzeiten gegenüber und es ist anzunehmen, dass möglicherweise ein geringes Interesse der pharmazeutischen Industrie an der Erforschung neuer Substanzen besteht. Obwohl in den letzten Jahren einige neue Präparate überwiegend gegen MRSA auf den Markt kamen, müssen die universitäre Grundlagenforschung und die Kooperationen zwischen Industrie und Wissenschaft stärker gefördert werden. Doch selbst wenn genügend wirksame Therapieoptionen zur Verfügung stehen würden, hinge der indikations- und erregergerechte Einsatz von der Identifizierung des Krankheitserregers und somit von einer zeitnahen Diagnostik ab. Jedoch beruht die mikrobiologische Routinediagnostik, seit der Entdeckung des Bakteriums als Krankheitsverursacher, im Wesentlichen auf der kulturellen Anzucht mit anschließender

biochemischer Identifizierung der Spezies und phänotypischer Resistenzbestimmung. Üblicherweise benötigen derartige kulturbasierte Methoden mindestens 18 – 24 Stunden für die biochemische Identifizierung des ursächlichen Erregers und weitere 24 Stunden für die Erstellung eines Resistogramms. Die Zeitspanne bis zum Beginn der antibiotischen Therapie hat dabei erheblichen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität bakterieller Infektionen [80,81], sodass häufig anhand des klinischen Bildes eine kalkulierte bzw. empirische Breitspektrum-Therapie begonnen wird, die wiederum die Entwicklung neuer Resistenzen fördert [82]. Zunehmende Erkenntnisse weisen des Weiteren darauf hin, dass besiedelte oder infizierte Patienten ein Reservoir und Vehikel für die Verbreitung von MRE im Krankenhaus darstellen [70,83–86]. Deshalb scheint es essentiell asymptomatische MRE-Träger frühzeitig zu identifizieren und gegebenenfalls gezielte Hygienemaßnahmen zur Vermeidung einer nosokomialen Transmission zu ergreifen. Die Einschleppung und Verbreitung von MRE kann durch verschiedene Maßnahmen erreicht werden, wobei sich die Kombination mehrerer Ansätze am effektivsten erwies. Dazu zählen zunächst die strikte Einhaltung und Verbesserung der Basis- und Handhygiene sowie die Ergreifung zusätzlicher Kontakthygienemaßnahmen, wie die vorsorgliche Einzelzimmerunterbringung (Isolation), Dekolonisierungsmaßnahmen sowie die Durchführung eines MRE-Screenings, universell für alle Patienten oder gezielt für Risikopatienten, bei Krankenhausaufnahme [87,88]. Länder wie Dänemark, Norwegen und die Niederlande verfolgen eine „*search and destroy*“-Strategie und konnten mit der offensiven und nachhaltigen Implementierung eines MRE-Screenings, in Kombination mit einer vorsorglichen Isolierung des Patienten, eine effektive Reduzierung der Resistenzraten erreichen [40,89]. Im europäischen Vergleich weisen diese Länder teils erheblich niedrigere Resistenzraten aus, als Länder, wie z.B. Deutschland, die weniger restriktive Hygienerichtlinien umsetzen (siehe Abbildung 3).

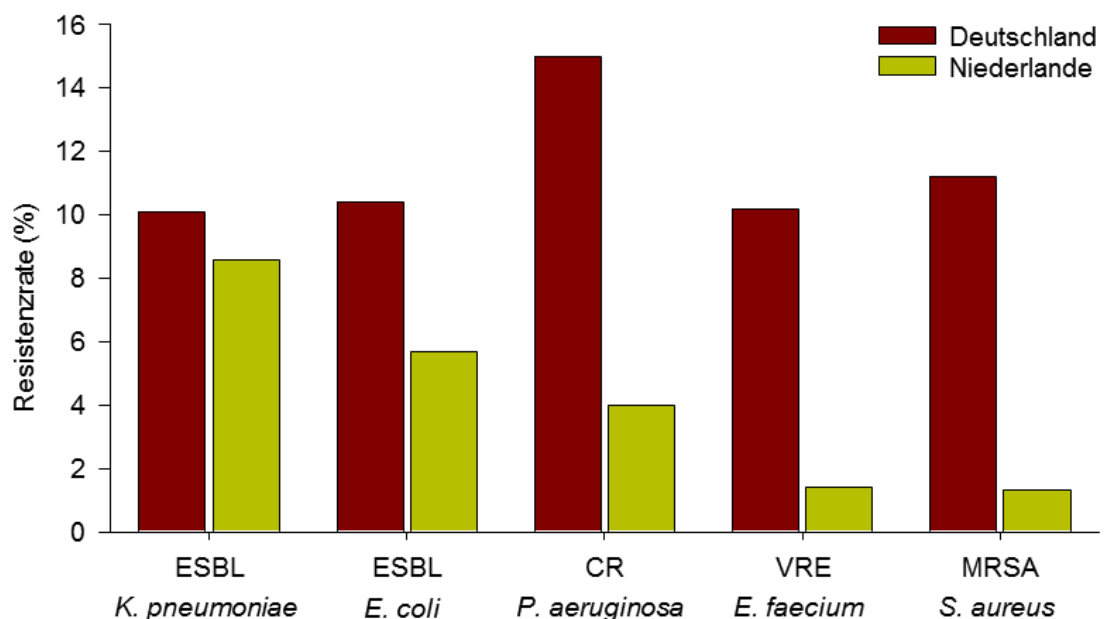


Abbildung 3 Resistenzraten in Deutschland und den Niederlanden

Die Resistenzrate beschreibt den Anteil der resistenten Stämme an der Gesamtzahl aller untersuchten invasiven Isolate (Blut und *Liquor cerebrospinalis*), die im Jahr 2015 an das *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) gemeldet wurden [90].

Ein MRE-Screening basiert zumeist auf nicht-invasive und einfach durchzuführende Abstriche von bestimmten Körperarealen, die bevorzugte Siedlungsorte, sogenannte Prädilektionsstellen, der entsprechenden Spezies darstellen [36,38]. Auch hier stellen kulturbasierte Methoden momentan den Goldstandard in der Routinediagnostik dar, die in Abhängigkeit vom nachzuweisenden MRE frühestens nach 24 – 72 Stunden Ergebnisse liefern. Speziell für die Screening-Anwendung wurden daher Selektivmedien entwickelt, die neben selektierender Antibiotika auch chromogene Substrate enthalten und eine schnelle biochemische Identifizierung von MRSA, VRE, ESBL und CRE innerhalb von 18 – 24 Stunden ermöglichen, wobei die resultierenden Ergebnisse als vorläufig anzusehen sind und einer Bestätigung durch zusätzliche Tests bedürfen [91–94]. Bedingt durch die lange Testzeit werden gezielte Hygienemaßnahmen sowohl verzögert ergriffen als auch, im Falle einer vorsorglichen Isolierung, unnötig lange aufrechterhalten, wodurch entweder das Transmissionsrisiko steigt oder das Patientenbefinden und die Behandlungsqualität leiden [95,96]. Zudem ist die kulturbasierte Detektion von anspruchsvollen, langsam wachsenden Bakterien und von Erregern, die eine *low-level* Resistenz aufweisen, nur eingeschränkt möglich [91,97].

Der Entwicklung und Einführung neuer diagnostischer Methoden zur schnellen Identifikation von MRE kommt daher sowohl im Aktionsplan der WHO als auch in DART eine zentrale Rolle zu. In den letzten Jahren etablierten sich in der mikrobiologischen Routinediagnostik vermehrt molekularbiologische, meist PCR-basierte Verfahren, die einen kulturunabhängigen MRE-Nachweis innerhalb weniger Stunden ermöglichen. Neben der konventionellen Endpunkt-PCR kommen hauptsächlich Real-Time PCR basierte Methoden zum Einsatz, in denen bakterielle Resistenzgene, mittels spezifischer Primer und fluoreszierender Sonden, exponentiell amplifiziert und simultan in „*real-time*“ detektiert werden [98,99]. Es existieren bereits verschiedene laborinterne und kommerzielle Real-Time PCR Tests, die in der Lage sind, MRSA, VRE und CRE innerhalb von 2 – 6 Stunden, mit einer hohen Sensitivität und Spezifität, direkt aus Probenmaterial zu detektieren [93,100–105]. Allerdings fokussieren sich bisherige Testsysteme auf die Detektion weniger Resistenzdeterminanten, die für einen einzelnen Problemkeim spezifisch sind. Der parallele Nachweis von MRSA, VRE, ESBL und CRE aus einer einzelnen Probe ist dagegen bisher nicht möglich. Real-Time PCR basierte Verfahren unterliegen zudem einigen Limitierungen, die zu berücksichtigen sind. Erstens können bestimmte Bestandteile der Probenmatrix die Amplifikation inhibieren und somit falsch-negative Testresultate verursachen [106,107]. Zweitens können nur Resistenzdeterminanten detektiert werden, die bereits bekannt sind und für die entsprechende Primer- und SONDENSSETS integriert wurden. Drittens stoßen die meisten Systeme aufgrund der Vielzahl möglicher Resistenzgene und Genvarianten an ihre kapazitären Grenzen, wodurch sowohl falsch-positive als auch falsch-negative MRE-Nachweise auftreten können [108,109]. Sofern diese Einschränkungen bei der Entwicklung neuer Systeme adressiert werden, haben Real-Time PCR basierte Methoden das Potential, in Ergänzung zu den kulturbasierten Verfahren, Isolationszeiten zu verkürzen, Transmissionen zu verhindern und Kosten zu sparen [110,111]. Darüber hinaus stellt die unmittelbare Identifizierung der zugrundeliegenden Resistenzgene eine

wertvolle Zusatzinformation in Ausbruchssituationen dar, in denen der Ausbruchsstamm von anderen Stämmen unterschieden werden muss. Zusätzlich könnte der Einsatz in der frühen Infektionsdiagnostik die Wahl der richtigen Therapie sichern und dabei helfen, den Bedarf an Breitspektrum-Antibiotika zu reduzieren [112]

Die Bedeutung einer schnellen Diagnostik wird nicht zuletzt am Beispiel des Ausbruchs eines *Acinetobacter baumannii* 4MRGN am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) in Kiel deutlich. Insgesamt wurden 31 Patienten infiziert, 15 Patienten starben im Verlauf, wobei in drei Fällen der Erreger nicht sicher als Todesursache ausgeschlossen werden konnte. Als mutmaßlicher Überträger gilt ein deutscher Patient, der als Tourist in einem türkischen Krankenhaus behandelt und anschließend ins UKSH verlegt wurde. Zwar wurde ein breites kulturbasiertes MRE-Screening durchgeführt, eine vorsorgliche Isolierung bis zum Vorliegen der Ergebnisse wurde jedoch nicht eingeleitet, sodass eine Übertragung auf andere Patienten und die Ausbreitung in der Klinik maßgeblich durch den verzögerten Nachweis ermöglicht wurde [113].

1.4 Antibiotikaresistenzen vor dem Hintergrund internationaler Reisen und Migration

Die MRE-Prävalenz variiert erheblich zwischen verschiedenen Ländern, sowohl auf europäischer Ebene als auch weltweit und verändert sich teilweise erheblich mit der Zeit [44,74,114]. Obwohl MRE nicht an Staatsgrenzen gebunden sind, ist es offensichtlich, dass nordeuropäische Staaten, wie Norwegen, Dänemark und die Niederlande, verglichen mit süd- und osteuropäischen Staaten, wie Italien, Griechenland und Bulgarien, wesentlich geringere Resistenzraten aufweisen [54]. Die Migration aus und die Reise durch MRE-Endemiegebiete, besonders wenn Kontakt zu lokalen Gesundheitseinrichtungen bestand, gilt daher als Risikofaktor für eine MRE-Besiedelung [37,115–117]. Tatsächlich konnte das erstmalige Auftauchen der NDM-Carbapenemase in Schweden, der KPC-Carbapenemase in Deutschland und der OXA-48-Carbapenemase in Frankreich auf Patienten zurückgeführt werden, die entweder aus Endemieländern stammten oder dort behandelt wurden [118–120]. Diese Erkenntnisse gewinnen an Brisanz, seitdem gewaltsame Konflikte im Mittleren Osten Millionen von Menschen dazu zwangen, aus ihrer Heimat zu fliehen, um Schutz in fremden Ländern mit fremden Gesundheitssystemen zu suchen. Weltweit nahm die Zahl der Flüchtlinge von 10,4 Millionen im Jahr 2011 auf rund 15,1 Millionen im Jahr 2015 zu. Aufgrund des Syrischen Bürgerkriegs flohen innerhalb von 5 Jahren 4,2 Millionen Menschen aus Syrien, wobei umliegende Länder wie die Türkei, der Libanon und Jordanien ein Großteil der Flüchtlinge aufnahmen und noch immer aufnehmen [121]. Ausgehend von der Türkei versuchen viele von ihnen über Griechenland und verschiedene Balkanstaaten Zentral-Europa zu erreichen, um dort Sicherheit und Asyl zu finden. Aktuell sieht sich besonders Deutschland einem enormen Zustrom von Flüchtlingen ausgesetzt, die aus oder durch Länder flohen, in denen MRE, zumindest in Gesundheitseinrichtungen, endemisch vorkommen, wobei etwaige Auswirkungen auf das lokale Resistenzvorkommen und somit auf das deutsche Gesundheitssystem nicht vorhersehbar sind [122–128].

Es existieren nur sehr wenige systematische Studien zum Vorkommen von MRE in den betreffenden Herkunftsländern im Allgemeinen und innerhalb der heterogen zusammengesetzten Gruppe von Flüchtlingen im Speziellen. In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung fanden Reinheimer *et al.*, dass 60,8 % der 143 Patienten mit Fluchthintergrund zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme mit MRGN und 5,6 % mit MRSA besiedelt waren. Im Vergleich dazu betrug die MRGN-Prävalenz bei Patienten ohne Fluchthintergrund, die in dem gleichen Zeitraum aufgenommen wurden, lediglich 16,4 % [129]. Weitere Studien aus Deutschland fanden ebenfalls hohe MRE-Kolonisationsraten von 35 % (42 von 119) bzw. 34 % (110 von 325) in hospitalisierten, pädiatrischen Patienten mit Fluchthintergrund [130,131], wobei Daten zur MRE-Kolonisationsrate in gesunden, nicht-hospitalisierten Individuen, als größte Gruppe innerhalb der Flüchtlingspopulation, weiter fehlen.

In einer Stellungnahme zur Frage des MRE-Screenings von Asylsuchenden empfiehlt das Robert Koch-Institut lediglich ein MRSA- oder CRE-Screening für Flüchtlinge, im Rahmen einer Krankenhausaufnahme, sofern ein Kontakt zu ausländischen Gesundheitseinrichtungen bestand. Ein Screening auf ESBL wird dagegen generell nicht

empfohlen [132]. Allerdings deuten die oben genannten Studien daraufhin, dass die Prävalenz von MRGN inklusive ESBL deutlich erhöht ist, weshalb die Autoren für eine Anpassung der geltenden Screening-Richtlinien für Flüchtlinge, die einer stationären Behandlung bedürfen, plädieren. Jedoch wurden in diesen Studien kultur-basierte Methoden mit anschließender Antibiotika-Empfindlichkeitstestung verwendet, die ausschließlich den Nachweis phänotypischer Resistenzen in wenigen, klinisch relevanten Pathogenen ermöglichen. In Anbetracht dessen bleibt ein großer Teil des vorhandenen Keimspektrums verborgen, denn die meisten, den menschlichen Körper kolonisierenden Bakterien sind apathogen, schwer kultivierbar und dienen möglicherweise dennoch als Reservoir für übertragbare Gene, die klinisch relevante Antibiotikaresistenzen vermitteln [133,134]. Tatsächlich deuten zunehmende Erkenntnisse daraufhin, dass der Austausch von Resistenzdeterminanten via horizontalem Gentransfer von Kommensalen der menschlichen Darmflora auf transiente, den Darm passierende Pathogene oder umgekehrt direkte klinische Auswirkungen hat [27–29,135–138].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Entwicklung und Ausbreitung von MRE kann nur eingedämmt werden, wenn die Ursachen auf allen Ebenen bekämpft werden. Neue Strategien zur adäquaten Antibiotikaaanwendung sowohl auf der humanmedizinischen als auch auf der veterinärmedizinischen Ebene, sowie die Überwachung und Restriktion des Antibiotikaeinsatzes in der Tiermast, sind der Schlüssel für die Entschärfung der zukünftigen Entwicklung. Um die Sicherheit von Patienten und deren Angehörigen in der jetzigen Situation gewährleisten zu können, müssen sowohl im ambulanten als auch im klinischen Alltag geeignete Maßnahmen ergriffen werden. Dazu zählt vor allem die Prävention einer Übertragung von und einer Infektion mit MRE durch gezielte und adäquate Hygiene. Essentiell für die Ergreifung geeigneter Hygienemaßnahmen ist dabei eine umfassende, zeitnahe und schnelle Erreger- und Resistenzdiagnostik.

Das übergreifende Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems für die schnelle und direkte Detektion eines möglichst breiten Spektrums bakterieller Antibiotikaresistenz-Determinanten von klinischer Relevanz. Hierfür sollte eine auf TaqMan[®] Sonden basierende Real-Time PCR zum Nachweis von Genen entwickelt werden, die die phänotypische Resistenz in klinisch bedeutsamen Problemkeimen wie dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN), die β -Lactamasen mit breitem Wirkspektrum produzieren (ESBL) und/oder Carbapenem-resistent (CRE) sind, vermitteln. Um schnelle Resultate des MRE Screenings zu ermöglichen, sollten möglichst wenige, einfache Arbeitsschritte erforderlich sein und die zugrundeliegenden Abstrich-Proben sollten ohne weitere Reinigungs- und Anreicherungsmaßnahmen direkt im Testsystem verwendet werden können. Im Einzelnen wurden in dieser Arbeit verschiedene Aspekte der Methodenentwicklung mit folgenden Zielen bearbeitet:

- 1) Im Rahmen der Konzeptionierung eines vollumfänglichen Testsystems sollte zum einen durch die Auswahl von relevanten Antibiotikaresistenzgenen die parallele und sichere Detektion der wichtigsten Problemkeime ermöglicht werden und zum anderen ein Probenahmesystem gefunden werden, dass mit der nachfolgenden TaqMan® Real-Time PCR kompatibel ist.
- 2) Die Validierung des vorgestellten Systems sollte anschließend in zwei Stufen erfolgen. Dazu sollte zunächst die technische Leistungsfähigkeit anhand von Referenzstämmen untersucht und anschließend die diagnostische Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems im Vergleich zum kulturellen Goldstandard anhand von klinischen Abstrich-Proben aus einer Kohorte von stationären Patienten nachgewiesen werden.
- 3) In einem letzten Schritt sollten die entwickelten TaqMan® Assays auf TaqMan® Array Cards als mikrofluide Plattform zur Hochdurchsatz-Genanalyse integriert und getestet werden.

Die Integration der TaqMan® Array Plattform bildet die Grundlage für die mögliche Anwendung des Testsystems in größeren Kohorten, die eine hohe Probenzahl bedingen. Folglich konnte ein Forschungsvorhaben initiiert werden, das das Vorkommen von bakteriellen Resistenzgenen und MRE in einer Kohorte Flüchtlinge, die in der Erstaufnahmeeinrichtung für Flüchtlinge des Landes Schleswig-Holstein in Neumünster aufgenommen wurden, untersucht. Anhand von Stuhlproben sollten zum einen klinisch relevante Resistenzgene mittels TaqMan® Array Cards detektiert und zum anderen pathogene Erreger mittels 16S rRNA-Genanalyse identifiziert werden. Unter Verwendung beider molekularbiologischer Methoden sollten zusätzlich Stuhlproben einer Kohorte deutscher Einwohnermeldeamtskontrollen untersucht und die resultierenden Resistenzgen- und Erreger-Profile beider Kohorten verglichen werden. Um ein detaillierteres Bild von der Resistenzbelastung in der Kohorte Flüchtlinge zu erhalten, sollten darüber hinaus im Rahmen der medizinischen Erstuntersuchung Screening-Abstriche gewonnen und sowohl mittels molekularbiologischer als auch kulturbasierter Methoden auf das Vorhandensein von Resistenzgenen und MRE untersucht werden. Mit Hilfe der gewonnenen Daten sollen erstmals Erkenntnisse zur Art und Häufigkeit klinisch relevanter Resistenzgene in einer Gruppe von nicht-hospitalisierten Flüchtlingen gewonnen und in Relation zu einer Stichprobe der deutschen Allgemeinbevölkerung gesetzt werden. Das Wissen um die Resistenzsituation in einer heterogen und wechselnd zusammengesetzten Gruppe von Flüchtlingen könnte dazu beitragen, potentielle Risiken durch neue oder vermehrt auftretende Resistenzgene sowohl in apathogenen Kommensalen als auch in pathogenen Erregern zu identifizieren. Des Weiteren werden erstmals kulturbasierte Daten zum Vorkommen von MRSA, VRE und MRGN in der nicht-hospitalisierten Bevölkerung der jeweiligen Herkunftsländer erhoben.

2 Materialien

2.1 Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Real-Time PCR System	Viiia 7	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Sanger-Sequenzierung	Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Elektrophorese-System	Power PAC 300	Bio Rad (Hercules, USA)
Geldokumentation	ChemiDoc XRS	Bio Rad (Hercules, USA)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugal Vakuum Konzentrator	Concetrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
	Multifuge 3S-R	Heraeus™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Tischzentrifugen	himac CT 15E	Hitachi Koki (Tokyo, Japan)
	NeoLab Zentrifuge mit Vortexer	NeoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
pH-Meter	Microprocessor pH 212	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy plus	Integra Biosciences (Hudson, USA)
Fluorimeter	Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
UV-Vis Spektrophotometer	NanoDrop ND-2000	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Homogenisator	MagNA Lyser	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Brutschrank	Inkubator Typ B50	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
	Microplate Genie	Scientific Industries (New York, USA)
Pipetten	Biohit proline 5 - 100 µl, Einkannal	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
	Biohit proline 50 - 1000 µl, Einkannal	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
	Biohit proline 5 - 100 µl, Achtkanal	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

2.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
LE Agarose	Biozyme (Oldendorf, Deutschland)
Tween 20 pure	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Triton X-100	Sigma Life Science (St. Louis, USA)
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-HCL	Pufferan® Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, absolut for analysis	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser, Nuklease-frei	Ambion™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Cefotaxim-Na 1,05g	Eberth Arzneimittel (Ursensollen, Deutschland)
Imipenem/Cilastin 500mg/500mg	Actavis (Luxemburg)

2.3 Reagenzien und Kits

Reagenzien und Kits	Hersteller
Lysozyme BioUltra from chicken egg white	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Lysostaphin from <i>Staphylococcus aimulans</i> , recombinant, expressed in <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Proteinase K BioUltra from <i>Tritirachium album</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dream Taq green buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
dNTPs	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dream Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gene Ruler 100 bp Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Smart Ladder MW 200-10000 bp	Eurogentec (Seraing, Belgien)
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™ Thermo Fisher
TaqMan Fast Universal Master Mix	Applied Biosystems™ Thermo Fisher
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems™ Thermo Fisher
TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents	Applied Biosystems™ Thermo Fisher
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Precellys Glas/Keramik-Kit SK 38 2,0 ml	Peqlab (Erlangen, Deutschland)

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Hersteller	Zusammensetzung
PBS DULBECCO	Biochrom Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)	Siehe Herstellerangaben
GIBCO DPBS	Life Technologies™ Thermo Fisher (Waltham, USA)	Siehe Herstellerangaben
50X TAE-Puffer	Invitrogen™ Thermo Fisher (Waltham, USA)	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA
Trypton Soja Bouillon (TSB)	Oxoid (Hampshire, UK)	Siehe Herstellerangaben
Columbia Blut Agar mit 5 % Schafsblut (ColSB)	Oxoid (Hampshire, UK)	Siehe Herstellerangaben
LB-Medium (<i>lysogeny</i> <i>broth</i> nach Lennox)	Eigenherstellung	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar
NaCl 0,85%	Eigenherstellung	0,85 % Natriumchlorid
Enzym Lösung (QIAamp DNA Mini Kit)	Eigenherstellung	20 mg/ml Lysozym 20 mM Tris-HCl, pH 8 2 mM EDTA 1,2 % Triton-X 100
Lyse Puffer	Eigenherstellung	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA 1 % Triton-X 100 0,5 % Tween 20
Detergenzien-Konzentrat	Eigenherstellung	161 mM Tris-HCl, pH 8 16,1 mM EDTA 16,1 % Triton-X 100 8,06 % Tween 20

2.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96 PCR-Platte, Halbrand	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
SafetySpace Filter Spitzen, 120 µl	Sartorius Biohit (Helsinki, Finnland)
BioClean Filter LTS® Spitzen, 200µl	Mettler Toledo (Columbus, USA)
Biosphere® Filter Spitzen, 0,1 - 20 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Biosphere® Filter Spitzen, 0,1 - 10 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Biosphere® Filter Spitzen, 2 - 100 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Biosphere® Filter Spitzen, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
FloqSwab™ Abstrichtupfer	Copan (Brescia, Italien)
Transystem™ Steriler Transport Tupfer mit Liquid Stuart Medium	Copan (Brescia, Italien)

2.6 Software

Software	Hersteller und Internetadressen
ViiA™ 7 RUO Software	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
MS Excel 2013	Microsoft (Redmond, USA)
Sigma Plot 11.0	Systat Software (Erkrath, Deutschland)
Primer Express 3.0	Applied Biosystems™ Thermo Fisher (Waltham, USA)
Primer BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Nucleotide BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
SPSS	IBM (Armonk, USA)
Spotfire 7.6.1.8	TIBCO Software Inc (Palo Alto, USA)

2.7 Referenzstämme und Klinische Isolate

Die verwendeten Referenzstämme wurden von kooperierenden Forschungseinrichtungen, Nationalen Referenzzentren (NRZ)¹ oder Konsiliarlaboratorien zur Verfügung gestellt. Die Sammlung umfasst dabei Positiv-Kontrollstämme die ein entsprechendes Resistenzgen tragen und Negativ-Kontrollstämme, die andere oder keine Resistenzgene tragen. Das Institut für Infektionsmedizin Kiel (InfMed) stellte sowohl einen Großteil der ESBL-produzierenden *Klebsiella pneumoniae* Stämme, als

¹ Die Nationalen Referenzzentren beschäftigen sich mit der Entwicklung bzw. Verbesserung diagnostischer Verfahren der jeweiligen ihnen zugeordneten Erreger, deren Spezialdiagnostik sowie mit Resistenz- und Virulenz-Aspekten. Die Berufung erfolgt durch das RKI in Abstimmung mit dem Bundesministerium für Gesundheit. Zu ihren Aufgaben zählen unter anderem die Feintypisierung von Erregern einschließlich molekularbiologischer Untersuchungen, das Führen einer Stammsammlung sowie die Abgabe von Referenzstämmen bzw. -Präparaten. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/nrz_node.html

auch alle *Staphylococcus Spezies* zur Verfügung. Des Weiteren brachten Prof. Dr. med. Sören Gatermann und Dr. med. Martin Kaase vom NRZ für gramnegative Krankenhauserreger, Bochum (RUB) diverse Carbapenemase- und ESBL-produzierende Stämme in die Sammlung ein. Das Institut für Medizinische Mikrobiologie und NRZ für Streptokokken (RWTH) unter Leitung von Dr. Mark van der Linden stellte verschiedene *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus mitis* Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften bereit. Die Stammsammlung wurde durch vier weitere Isolate von Dr. Yvonne Pfeifer und Dr. Guido Werner vom Robert-Koch-Institut Wernigerode (RKI) ergänzt. Für die Lagerung der Bakterien wurden jeweils mehrere Glyceroldauerkulturen (Glycerol-Stock) angelegt, indem 100 µl einer frischen Bakterienkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Glycerol 85 % überschichtet wurden. Das Gefäß wurde fest verschlossen, gut durchmischt und anschließend bei -80 °C gelagert. Einige Typ-Stämme wurden kommerziell über die *National Collection of Type Cultures* (NCTC, England) bezogen. Die Lieferung erfolgte in Ampullen mit lyophilisierten Kulturen, die nach einer entsprechenden Kultivierung ebenfalls als Glycerol-Stock in die Sammlung aufgenommen wurden. Die Stammsammlung umfasst darüber hinaus klinische Isolate, deren Antibiotikaresistenzgene mit Standardmethoden identifiziert wurden. Alle verwendeten Bakterienstämme, die jeweiligen Antibiotikaresistenz-Genotypen und die entsprechenden Bezugsquellen der Isolate sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Für die weitere Verwendung wurden die betreffenden Glycerol-Stocks zunächst aufgetaut. Anschließend wurde mit einer ausgeglühten Impföse etwas Kultur aufgenommen und auf Columbia Agar mit 5 % Schafsblut fraktioniert ausgestrichen. Die Inkubation der beimpften Kulturmedien erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Tabelle 2-1 Referenzstämme und klinische Isolate

Spezies	Bezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NCTC 13301	OXA-23, OXA-51-like	NCTC
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00330	OXA-23	InfMed
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00518	OXA-58	InfMed
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NRZ-00449	OXA-72	InfMed
<i>Enterobacter asburiae</i>	NRZ-01112	MIR	RUB
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 13405	AmpC	NCTC
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 13406	AmpC	NCTC
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 13464	CTX-M group 9	NCTC
<i>Enterobacter cloacae</i>	NRZ-00239	VIM-1	RUB
<i>Enterobacter cloacae</i>	NRZ-00239	VIM-1	InfMed
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	RKI UW703	vanC-2	InfMed
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹⁾	ATCC 29212		InfMed
<i>Enterococcus faecalis</i> ²⁾	ATCC 51299		InfMed
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12201	vanA	NCTC
<i>Enterococcus faecium</i>	RKI UW2314	vanA	RKI
<i>Enterococcus faecium</i>	RKI UW699	vanB	RKI
<i>Enterococcus faecium</i> ²⁾	Klinisches Isolat		InfMed
<i>Enterococcus gallinarum</i>	RKI UW701	vanC-1	RKI

Spezies	Bezeichnung	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> ³⁾	ATCC 11775		InfMed
<i>Escherichia coli</i>	14/05	CTX-M 14,	RKI
<i>Escherichia coli</i>	129/07	CTX-M 2, TEM-1	RKI
<i>Escherichia coli</i>	NRZ-8814	CTX-M group 8	RUB
<i>Escherichia coli</i>	NRZ-02721	TEM-1, OXA-1, OXA-10	RUB
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13461	CTX-M group 1	NCTC
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13462	CTX-M group 2	NCTC
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13463	CTX-M group 8	NCTC
<i>Escherichia coli</i>	NRZ-00401	VIM-1	InfMed
<i>Escherichia coli</i>	NRZ-00302	NDM-1	InfMed
<i>Klebsiella oxytoca</i>	106/04	CTX-M 9	RKI
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NRZ-01745	VIM-1, ACC	RUB
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NRZ-00405	VIM-1	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UR 1697	VIM	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 25	CTX-M 3, TEM-1, SHV-12	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 299	CTX-M 2, TEM-1, SHV-5	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 302	CTX-M 14, [-] TEM, SHV-11	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 344	CTX-M 3, [-] TEM, [+] SHV	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 356	CTX-M 15, TEM-1, SHV-1	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 398	CTX-M 15, TEM-1, SHV-1	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL 538	[-] CTX-M, TEM-3, SHV-38	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24/10	KPC	RKI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00002	OXA-48	RUB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00103	KPC-2	RUB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00313	NDM-1	RUB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-01013	CMY-2	RUB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-06269	DHA-1	RUB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	CTX-M group 25	NCTC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00535	VIM-1	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00103	KPC-2	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00223	KPC-3	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-00002	OXA-48	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-05050	OXA-48, OXA-1	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-05747	OXA-48	InfMed
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NRZ-05782	OXA-48, TEM	InfMed
<i>Proteus mirabilis</i>	NRZ-00185	CMY-2	InfMed
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁾	ATCC 10145		InfMed
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRZ-00196	IMP-16	RUB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRZ-00425	VIM-2	RUB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRZ-00638	IMP-7	RUB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁾	NRZ-01058		RUB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³⁾	CF446		RUB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48/09	IMP-2	RKI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRZ-00425	VIM-2	InfMed
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁴⁾	ATCC 12600		InfMed
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁴⁾	ATCC 29213		InfMed

Spezies	Bezeichnung	Genotyp	Quelle
Staphylococcus aureus	ATCC 43300	mecA	InfMed
Staphylococcus epidermidis ⁴⁾	ATCC 12228		InfMed
Staphylococcus epidermidis ⁴⁾	ATCC 14990		InfMed
Staphylococcus epidermidis	12058814-01	mecA	InfMed
Staphylococcus haemolyticus ⁴⁾	ATCC 29970		InfMed
Staphylococcus hominis ³⁾	ATCC 27844		InfMed
Staphylococcus saprophyticus ⁴⁾	ATCC 15305		InfMed
Streptococcus mitis	NRZ-57642	ermB	RWTH
Streptococcus mitis	NRZ-57099	mefA	RWTH
Streptococcus mitis	NRZ-57641	mefA	RWTH
Streptococcus mitis ⁵⁾	NRZ-56156		RWTH
Streptococcus mitis ⁵⁾	NRZ-56752		RWTH
Streptococcus mitis ⁵⁾	NRZ-56767		RWTH
Streptococcus pneumoniae ⁵⁾	NRZ-23083		RWTH
Streptococcus pneumoniae ⁵⁾	NRZ-23090		RWTH
Streptococcus pneumoniae ⁵⁾	NRZ-23092		RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-46335	ermB	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-50330	ermB	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-59543	ermB	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-43901	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-44908	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-56298	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-42588	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-58434	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-58538	mefA	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-43994	mefA, ermB	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-49732	mefA, ermB	RWTH
Streptococcus pneumoniae	NRZ-52410	mefA, ermB	RWTH

¹⁾ phänotypisch Vancomycin-sensibel; ²⁾ phänotypisch VRE, unbekannter Genotyp; ³⁾ phänotypisch keine β -Lactam- oder Carbapenem-Resistenz; ⁴⁾ phänotypisch Methicillin-sensibel; ⁵⁾ phänotypisch Makrolid-sensibel

3 Methoden

3.1 Klinische Proben und Ethik

Um im Rahmen dieses Forschungsvorhabens Untersuchungen an körpereigenem Material von Patienten durchführen zu können, wurde die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel befragt, woraufhin diese ein positives Votum erteilte. Das initiale Votum mit dem Aktenzeichen D 501/14 umfasst dabei die Untersuchung einer Kohorte, die ausschließlich stationäre Patienten des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins umfasst. Im weiteren Verlauf wurde ein Erweiterungsantrag für die Untersuchung einer Kohorte von Flüchtlingen gestellt und ein positives Votum mit dem Aktenzeichen 537/15 erteilt. Alle Probanden der beiden betrachteten Kohorten wurden vor der Untersuchung aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Die entnommenen Proben und die erfassten Daten wurden durch Zuteilung einer fortlaufenden Studiennummer vollständig und irreversibel anonymisiert.

Tabelle 3-1 Übersicht der verwendeten Probenmaterialien

Probengruppe	Ziel	Biomaterial	Anzahl
Referenzstämme	Analytische Validierung	Glycerol-Dauerkultur	92
Abstriche aus der Kohorte stationäre Patienten	Klinische Validierung	Nasen-/Rachenabstrich Perianalabstrich	73
Abstriche aus der Kohorte Flüchtlinge	Forschungseinsatz	Nasen-/Rachenabstrich Leistenabstrich	506
Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge	Forschungseinsatz	Stuhl	360
Stuhlproben aus der FoCUS Kontrollkohorte	Forschungseinsatz	Stuhl	100
Summe			1130

3.1.1 Screening-Abstriche in der Kohorte stationäre Patienten

Das zu untersuchende Patientenkollektiv umfasst alle Patienten, die in der internistischen Notaufnahme der Inneren Medizin I aufgenommen wurden und der KRINKO-Empfehlung [36] folgend, eine Risikopopulation für eine MRSA-Besiedlung darstellen. Somit wurden alle Patienten eingeschlossen, die folgendes Risikoprofil erfüllen und ohnehin für ein routinemäßiges MRSA/MRE-Screening vorgesehen waren.

Eine oder mehr Angaben zutreffend:

- Ein Krankenhausaufenthalt > 3 d in den letzten 12 Monaten
- Bekannte MRSA Anamnese / Kontakt zu MRSA positiven Patienten
- Patient kommt aus einer Pflegeeinrichtung
- Patient hat direkten Kontakt zu Tieren in der Landwirtschaftlichen Tiermast

Zwei oder mehr Angaben zutreffend:

- Chronische Pflegebedürftigkeit
- Antibiotikatherapie in den letzten 12 Monaten
- Liegende Katheter
- Dialysepflicht
- Chronische Wunden
- Brandverletzungen

Safdar und Maki *et al.* haben in einer Übersichtsarbeit gezeigt, dass die Patienten mit einer Besiedelung durch MRE unabhängig von der Erregerspezies gemeinsame Risikofaktoren aufweisen [35]. Aus diesem Grund wurden für diese Studie, neben dem oben genannten MRSA – Abstrich, weitere Abstriche durchgeführt und mit Hilfe einer kulturbasierten Methode auf folgende phänotypische Resistenzen untersucht:

- a) Methicillin-resistente *Staphylococcus spp.*
- b) Vancomycin-resistente *Enterococcus spp.*
- c) 3MRGN- und 4MRGN-Resistenzmuster (ESBL- und Carbapenemasebildner)

Des Weiteren wurden Patienten aus den bettenführenden Kliniken am UKSH, Campus Kiel eingeschlossen, die in der mikrobiologischen Routineuntersuchung einen positiven Befund für eine der oben genannten phänotypischen Resistenzen aufwiesen. Informationen über den Resistenzstatus der Patienten wurden dem Klinikinformationssystem Orbis entnommen oder direkt über das Institut für Infektionsmedizin erhalten.

Nachdem die Patienten der Studienteilnahme zustimmten, wurden mit Hilfe von zwei separaten FloqSwabs™ Abstrichtupfern (Fa. Copan, Italien) Screening-Abstriche durchgeführt. Mit dem ersten Tupfer wurde ein kombinierter Abstrich der Nasenvorhöfe und des Rachens gemacht. Dazu wurde der trockene Tupfer zunächst mit einer leichten Drehbewegung an der Rachenwand (Tonsillen Bereich) und anschließend derselbe Tupfer an den Wänden beider Nasenvorhöfe entlang gestrichen. Mit dem zweiten Tupfer wurden das Perineum und der Perianalbereich großflächig abgestrichen. Beide Tupfer wurden anschließend in ein steriles Kulturröhrchen (Fa. Greiner Bio-One, Österreich), das 2 ml sterile Natriumchloridlösung 0,85 % enthält, gegeben und bei Raumtemperatur gelagert. Die gesammelten Abstriche wurden innerhalb von 4 bis 8 Stunden in das Forschungslabor (Sicherheitsstufe S2) des Institutes für Infektionsmedizin transportiert und weiterverarbeitet. Dazu wurden die fest verschlossenen Kulturröhrchen für 15 Sekunden intensiv auf einem Vortexer gemischt. Anschließend wurde das Kulturröhrchen geöffnet und die enthaltenen Tupfer mit einer ausgeglühten Pinzette entnommen und verworfen. Die Probensuspension wurde dann sowohl für die mikrobiologische Untersuchung (siehe Kapitel 3.5) als auch zur DNA-Extraktion (siehe Kapitel 3.4) für die molekularbiologische Untersuchung verwendet. Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 8 Monaten 73 Patienten eingeschlossen.

3.1.2 Screening-Abstriche und Stuhlproben in der Kohorte Flüchtlinge

Für den zweiten Teil dieses Forschungsvorhabens wurde das MRE-Screening in der Kohorte Flüchtlinge durchgeführt. Diese Kohorte umfasst alle geflüchteten Menschen, die im Zeitraum vom 29. September bis zum 16. Oktober 2016 in der Erstaufnahmeeinrichtung für Flüchtlinge des Landes Schleswig-Holstein in Neumünster aufgenommen wurden. Erstaufnahmeeinrichtungen dienen dabei als initiale, vorläufige Unterbringung für in Deutschland ankommende Flüchtlinge verschiedenster Nationen. Bevor ein formaler Asylantrag in Deutschland gestellt werden kann, werden vor Ort die Personalien und die Fingerabdrücke bei Ankunft registriert und eine medizinische Erstuntersuchung wird gemäß § 62 Asylgesetz (AsylG) durchgeführt. Die Erstuntersuchung umfasst dabei ein Anamnesegespräch, eine körperliche Untersuchung, eine Röntgen-Thoraxuntersuchung², eine Blutprobe für Serologische Tests und eine Stuhlprobe für die mikrobiologische Untersuchung auf Darmpathogene. Ein generelles MRE-Screening bei Aufnahme in einer Unterkunft wurde vom zuständigen Robert-Koch-Institut zum damaligen Zeitpunkt und auch im späteren Verlauf nicht empfohlen [132].

Während der medizinischen Erstuntersuchung wurden zufällig ausgewählte Flüchtlinge über das Forschungsvorhaben informiert und nach mündlicher Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Bei sprachlichen Barrieren fand die Aufklärung in Anwesenheit eines Dolmetschers statt. Während des medizinischen Anamnesegesprächs wurden epidemiologische Daten wie das Alter, das Geschlecht, das Herkunftsland und die Herkunftsregion in diesem Land erfragt und gesammelt. Die Tabelle 3-2 fasst die Charakteristika der Kohorte Flüchtlinge zusammen.

Tabelle 3-2 Beschreibung der Kohorte Flüchtlinge

Herkunftsland	Anzahl	Geschlecht (w/m)	Alter Median	Alter Spannweite
Syrien	236	33/203	26	0 - 75
Irak	115	13/102	25	18 - 57
Afghanistan	95	13/82	23	17 - 70
Eritrea	20	1/19	23	18 - 43
Iran	20	4/16	32	6 - 49
Anderere ¹⁾	20	7/13	23	17 - 60
Summe	506	71/435	24	0-75

¹⁾ Andere: Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Jemen, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei

Aus ethischen Gründen und aus Respekt vor religiösen Gefühlen wurde auf einen Abstrich des Perineums für alle Flüchtlinge verzichtet und durch einen kombinierten

² Gemäß § 36 Absatz 4 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) muss eine infektiöse Lungentuberkulose anhand einer Röntgenaufnahme der Lunge ausgeschlossen werden. Dies gilt für alle Asylsuchenden, die das 15. Lebensjahr vollendet haben, mit Ausnahme von Schwangeren.

Abstrich der linken und rechten Leistenregion ersetzt. Des Weiteren wurden weibliche Flüchtlinge nur von Ärztinnen in die Studie eingeschlossen und untersucht. Für das MRE-Screening wurden somit ebenfalls zwei separate FloqSwabs™ Abstrichtupfer (Fa. Copan, Italien) für das Screening verwendet. Mit dem ersten Tupfer wurde ein kombinierter Abstrich beider Nasenvorhöfe und des Rachens, mit dem zweiten Tupfer ein kombinierter Abstrich der linken und rechten Leistenregion gemacht. Beide Tupfer wurden anschließend in ein steriles Kulturröhrchen (Fa. Greiner Bio-One, Österreich), das 2 ml sterile Natriumchloridlösung 0,85 % enthält, gegeben und bis zur weiteren Untersuchung bei circa 4 °C gelagert. Die gesammelten Abstriche wurden innerhalb von 16 bis 24 Stunden in das Institut für Infektionsmedizin transportiert und, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, für die anschließenden Untersuchungen vorbereitet. Zusätzlich wurden die für die Untersuchung auf Darmpathogene gesammelten Stuhlproben aller rekrutierten Flüchtlinge vom Routinelabor abgerufen und für Studienzwecke bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Stuhlproben von Probanden der Focus Kohorte

Food Chain Plus (FoCus) ist ein vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördertes Kompetenznetz der Agrar- und Ernährungsforschung. Als Kooperationspartner untersucht der Ernährungsmediziner Professor Dr. Matthias Laudes (Klinik für Innere Medizin I, UKSH Kiel) mit seiner Arbeitsgruppe, ob bestimmte Ernährungsweisen oder genetische Veranlagungen mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen im menschlichen Körper assoziiert sind. Im Rahmen von verschiedenen Interventionsstudien wurden diverse Biomaterialien z.B. Blut, DNA und Stuhl von Patienten und Kontrollprobanden der Biomaterialdatenbank PopGen zugeführt. Um Stuhlproben einer adäquaten deutschen Kontrollgruppe im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersuchen zu können, wurden 100 archivierte Stuhlproben von Probanden einer Einwohnermeldeamtsstichprobe von der Biobank PopGen angefordert und entsprechend der Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge untersucht (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Beschreibung der FoCus Kontrollkohorte

Herkunftsland	Anzahl	Geschlecht (w/m)	Alter Median	Alter Spannweite
Deutschland	100	14/86	33	19 - 71

3.2 DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen zur Herstellung von Referenz-DNA

Die Etablierung des Probenahmesystems sowie die Etablierung der TaqMan Real-Time PCR erfolgten mit Hilfe von DNA, die aus den in Tabelle 2-1 aufgeführten Referenzstämmen und klinischen Isolaten mittels QIAamp DNA Mini Kit extrahiert wurden. Dazu wurde mit einer Impföse eine Bakterienkolonie von einer Übernacht-Kultur aufgenommen und im Falle von gramnegativen Bakterien in 180 µl ATL-Puffer oder im Falle von grampositiven Bakterien in 180 µl Enzymlösung suspendiert und entsprechend

des Herstellerprotokolls extrahiert. Die isolierte DNA wurde in 50 – 100 µl AE-Puffer eluiert und abschließend photometrisch mit einem NanoDrop ND 1000 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen AE-Puffer quantifiziert. Alle DNA Extrakte wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Basierend auf den gemessenen Nucleotid-Konzentrationen wurden für die verwendeten Bakterienstämme Genomäquivalente (GE) berechnet. Ein Genomäquivalent entspricht dabei der Nucleotid-Masse eines einzelnen Bakteriengenoms in Nanogramm. Für die Berechnung wurde die Nucleotid-Länge n , angegeben in Basenpaare je Genom (bp), der betreffenden Spezies von der Internetdatenbank NCBI Genome bezogen [139]. Nimmt man an, dass die molare Masse eines einzelnen Basenpaares im Mittel 650 Dalton entspricht, lässt sich die Masse eines Genoms der betreffenden Spezies mit folgenden Formeln berechnen:

$$(1) \quad GE [ng] = \frac{n * 650}{N_A} * 10^9$$

$$(2) \quad \text{Anzahl GE} = \frac{GE_{\text{Bakterium}}}{c_{\text{Nucleotid}}}$$

In der gesamten weiteren Betrachtung werden die Nucleotid-Konzentrationen in der Einheit GE pro Volumen angegeben.

3.3 Etablierung einer geeigneten Probenahme und Probenvorbereitung

3.3.1 Vergleich verschiedener DNA Extraktionsmethoden

Es wurden vier verschiedene Methoden zur DNA-Extraktion aus Bakterien miteinander verglichen, die sich hinsichtlich der Zell-Lyse und der DNA-Aufreinigung unterscheiden. Dazu wurden Bakterienverdünnungsreihen hergestellt und jede Extraktionsvariante mit drei Stufen von unterschiedlichen Ausgangskeimzahlen durchgeführt. Da sich grampositive und gramnegative Bakterien in ihrem Zellwandaufbau und somit in Ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen unterscheiden, wurde diese Untersuchung jeweils mit einem *Escherichia Coli* NRZ-02721 und einem *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Extrakte wurden abschließend mit Hilfe einer Real-Time PCR quantifiziert und verglichen.

3.3.1.1 Herstellung der Bakterienverdünnungsreihen

Für die Herstellung der Verdünnungsreihen wurde jeweils eine Kolonie einer frischen Übernachtskultur mit einer Impföse aufgenommen und in BHI Bouillon suspendiert. Die beimpften Röhrchen wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden im Kulturröhrchen intensiv auf einem Vortexer gemischt. Anschließend wurden 100 µl der Suspension mit 900 µl steriler Kochsalzlösung 0,85 % verdünnt. Um Bakterienagglomerate aufzubrechen, wurden die verdünnten Suspensionen durch mehrmaliges aufziehen mit einer Spritze über subkutan Kanülen

homogenisiert. Vom Homogenisat wurden anschließend jeweils 9-stufige, dezimale Verdünnungsreihen (0,1 ml Suspension auf 0,9 ml Kochsalzlösung) im Doppelansatz (I, II) hergestellt. Die Bestimmung der Keimkonzentration, angegeben als Koloniebildende Einheiten (KBE) je Milliliter, erfolgte durch Ausplattieren von jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 6,7 und 8 auf ColSB Agar, jeweils im Doppelansatz (A, B). Nachdem die beimpften Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden, erfolgte die Auszählung der gebildeten Kolonien mit Hilfe eines elektrischen Koloniezählers.

Tabelle 3-4 Aufbau der Bakterienverdünnungsreihe

Verdünnungs- stufe	Verdünnung	Erwartete Keim-Konz. [KBE/ml]	Keimzahl je Einsatzvolumen	
			zur Keimzahl- bestimmung [KBE/100µl]	zur DNA- Extraktion [KBE/10µl]
0	10 ⁰	10 ⁹	-	-
1	10 ⁻¹	10 ⁸	-	10 ⁶
2	10 ⁻²	10 ⁷	-	-
3	10 ⁻³	10 ⁶	-	10 ⁴
4	10 ⁻⁴	10 ⁵	-	-
5	10 ⁻⁵	10 ⁴	-	10 ²
6	10 ⁻⁶	10 ³	100	-
7	10 ⁻⁷	10 ²	10	-
8	10 ⁻⁸	10 ¹	1	-
9	10 ⁻⁹	10 ⁰	-	-

3.3.1.2 Beschreibung der DNA-Extraktionsmethoden

Von den Verdünnungsstufen 1, 3 und 5 (Verdünnungsreihenansatz I) eines jeden Stammes wurden jeweils 10 µl zur Extraktion der bakteriellen DNA mit den im Folgenden beschriebenen drei Extraktionsmethoden (a, b, c) eingesetzt. Die Extraktionsmethode d wurde ausschließlich mit der Verdünnungsstufe 1 eines jeden Stammes durchgeführt. Jede Extraktion wurde im Doppelansatz durchgeführt und zwei Leer-Extraktionen je Methode mitgeführt. Die extrahierte DNA bzw. die fertigen Lysate wurden bis zur Quantifizierung mittels Real-Time PCR bei -20 °C gelagert.

a) QIAamp® DNA Mini Kit

Die DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls für grampositive Bakterien. Dazu wurden 10 µl der entsprechenden Bakterien suspensionen zu 180 µl Enzymlösung (20 mg/ml Lysozym, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton-X 100) gegeben, gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer hinzugefügt und gemischt. Nach einem weiteren Inkubationsintervall von 30 Minuten bei 56 °C wurden die Mischungen kurz zentrifugiert, mit 200 µl Ethanol (absolut) versetzt und gemischt. Die gesamte Mischung wurde einschließlich des Präzipitats auf eine QIAamp® Spin Column gegeben und eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert. Da die

Silica-Säulen selektiv Nucleinsäuren binden, wurde das Eluat verworfen. Die Säulen wurden anschließend mit 500 µl AW 1 Waschpuffer versetzt und bei 6000 rpm zentrifugiert. Das entstehende Eluat wurde erneut verworfen. Danach wurden die Säulen abschließend mit 500 µl AW 2 Puffer gewaschen, zweimal drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die gewaschene DNA wurde dann mit 100 µl AE Puffer durch Zentrifugation bei 6000rpm eluiert und bei -20 °C gelagert.

b) Thermische Lyse nach Reischl *et al.*

Für die thermische Lyse nach Reischl *et al.* [140] wurden jeweils 10 µl Bakteriensuspension zu 190 µl Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 0.5 % Tween 20) pipettiert und 15 s mit dem Vortexer intensiv gemischt. Die Suspensionen wurden 10 Minuten bei 99 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und abschließend kurz zentrifugiert um kondensierte Flüssigkeit abzusetzen.

c) Enzymatische Lyse

Für die enzymatische Lyse wurden 188 µl Enzym-Lyse-Puffer (0,4 mg/ml Lysozym, 0,1 mg/ml Lysostaphin, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 0,5 % Tween 20) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit jeweils 10 µl der zu untersuchenden Bakteriensuspensionen versetzt. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 2 µl Proteinase K (20mg/ml) versetzt und erneut 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen und um Proteine zu denaturieren, wurden die Suspensionen 10 Minuten bei 95 °C inkubiert.

d) Mechanische Lyse (Bead Beating)

Im Rahmen der mechanischen Lyse-Methode wurde das Precellys® Glas/Keramik SK38 Kit verwendet. Die Lyse-Röhrchen enthalten eine Mischung aus Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,1 mm und 3,8 mm sowie Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 3,8 mm. Jedes Schraubdeckelröhrchen wurde mit 590µl Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 0.5 % Tween 20) beschickt und anschließend mit 10 µl Bakteriensuspension versetzt. Das enthaltene Kugelmisch war somit vollständig mit Flüssigkeit bedeckt. Die Schraubdeckelröhrchen wurden fest verschlossen und anschließend in einem MagNA Lyser für 90 Sekunden bei 7000 rpm homogenisiert.

3.3.1.3 Real-Time PCR zur Quantifizierung der bakteriellen DNA

Zur Quantifizierung der freigesetzten bakteriellen DNA wurde die 341F – 806R Region des bakteriellen 16S rRNA Genes amplifiziert und mit Hilfe einer TaqMan Sonde detektiert. Die DNA-Extrakte der Methoden b, c und d sind krude Lysate und enthalten unter anderem Zelltrümmer, denaturierte Proteine und Bestandteile des Lyse-Systems, die unter Umständen die anschließende PCR inhibieren. Um auszuschließen, dass die Quantifizierung der einzelnen DNA-Extrakte durch diese methodenspezifischen Einflüsse verfälscht wird, wurden alle Extrakte der Methoden b, c und d zunächst 1:10 verdünnt und anschließend 5 µl Probevolumen für den PCR Reaktionsansatz

verwendet. Da das QIAamp® DNA Mini Kit hochreine DNA generiert, wurden 5 µl Probevolumen unverdünnt eingesetzt.

Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen wurde zunächst ein externer Standard hergestellt, der das zu detektierende Amplifikat des 16S rRNA Genes in bekannter Konzentration enthält. Aus diesem Standard wurde eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt, die $6,24 \times 10^8$ bis $6,24 \times 10^0$ Genkopien pro Mikroliter umfasst. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden 5 µl der Verdünnungsstufen 1,3 und 5 sowie der Stufen 6 bis 9 für die Real-Time PCR Untersuchung eingesetzt (Tabelle 3-5).

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und das Temperaturprofil der Real-Time PCR wurden wie in 3.6.2 beschrieben umgesetzt. Alle verwendeten Verdünnungsstufen und Nuklease-freies Wasser als negativ-Kontrolle wurden in Doppelbestimmungen untersucht und die resultierenden Ct-Werte gemittelt. Durch Auftragen der gemittelten Ct-Werte (Y-Achse) gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl (X-Achse), wurde mit Hilfe von linearer Regressionsrechnung eine Geradengleichung ermittelt und somit die Kopienzahl in den verschiedenen DNA-Extrakten berechnet. Anhand der ermittelten Kopienzahl (K), lässt sich, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anzahl von 16S rRNA Operonen in den einzelnen Spezies, die Anzahl der entsprechenden Genomäquivalente nach Formel (3) und (4) berechnen. *Escherichia coli* Spezies besitzen sieben und *Staphylococcus aureus* Spezies besitzen fünf 16S rRNA Operone [141].

$$(3) \quad GE_{E.coli} = \frac{K_{E.coli}}{7}$$

$$(4) \quad GE_{S.aureus} = \frac{K_{S.aureus}}{5}$$

Da für alle Extraktionsmethoden die Ausgangskeimzahl (KBE/µl) des jeweiligen Bakterienstammes gleich ist, werden die DNA-Extraktionsmethoden anhand der freigesetzten Genomäquivalente verglichen. Dabei gilt, je effektiver die Lyse-Methode, desto mehr Bakterien wurden aufgebrochen und sind der DNA-Analyse mittels Real-Time PCR zugänglich.

Tabelle 3-5 Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der extrahierten Bakteriengenome

Standard Verdünnungsstufe	Konzentration [Kopien/µl]	Log10 (Kopien)	Probevolumen für qPCR [µl]
0	$6,24 \times 10^9$	9,8	-
1	$6,24 \times 10^8$	8,8	5
2	$6,24 \times 10^7$	7,8	-
3	$6,24 \times 10^6$	6,8	5
4	$6,24 \times 10^5$	5,8	-
5	$6,24 \times 10^4$	4,8	5
6	$6,24 \times 10^3$	3,8	5
7	$6,24 \times 10^2$	2,8	5
8	$6,24 \times 10^1$	1,8	5
9	$6,24 \times 10^0$	0,8	5

3.3.2 PCR-Inhibition durch Bestandteile des Probenahmesystems

PCR-Inhibitoren können an verschiedenen Punkten der Probenahme und der Probenverarbeitung eingetragen werden. Dazu zählen Körperflüssigkeiten, die neben den zu detektierenden Bakterien am Tupfer anhaften. Auch das Transportmedium und die verschiedenen Puffer und Reagenzien zur weiteren Verarbeitung können die anschließende PCR und somit die sichere Detektion potentiell stören.

Um die inhibitorischen Einflüsse in verschiedenen Abschnitten des Probenahmesystems erkennen und quantifizieren zu können, wurde eine exogene, interne Inhibitionskontrolle (exoIPC) verwendet. Dabei wird eine bestimmte Menge an artifizieller DNA in das PCR-Reaktionsgemisch eingebracht und mit einem separaten Primer/Sonden-Paar detektiert. Sobald PCR-Inhibitoren die Taq-Polymerase inhibieren, nimmt die Amplifikationseffizienz für die artifizielle DNA in der betreffenden Probe ab. Mit abnehmender Effizienz wird weniger Amplifikat gebildet und die Änderung der Fluoreszenz erreicht zu einem späteren Zeitpunkt den Cycle-Threshold, wodurch der entsprechende Ct-Wert zu höheren Werten verschoben wird. Je stärker die Inhibition desto höher die Ct-Werte, bis hin zur absoluten Inhibition ohne detektierbare Fluoreszenzänderung.

3.3.2.1 Untersuchung der Probenmatrix

Die Probenmatrix setzt sich in abhängig vom abgestrichenen Areal und den verwendeten Tupfern unterschiedlich zusammen. Dabei können das anhaftende Probenmaterial, Tupfermaterialien, Transportmedien und andere Komponenten potentiell inhibitorischen Einfluss auf nachfolgende PCR-basierte Untersuchungen haben. Um problematische Probenarten identifizieren zu können, wurden von vier gesunden Freiwilligen Abstriche von drei verschiedenen Körperarealen genommen, einer schnellen Bakteriolyse entsprechend 3.3.1.2 unterzogen und mit Hilfe des exoIPC Assays auf PCR Inhibition hin untersucht.

Mit dem Transystem™ Sterilen Transport Tupfer mit Liquid Stuart Medium wurden jeweils ein kombinierter Nasen-/Rachenabstrich, ein kombinierter Abstrich von der linken und rechten Leiste und ein Perianalabstrich genommen. Nach der Probenahme wurden die verwendeten Tupfer in die mitgelieferten Transportröhrchen eingeführt und für 72 Stunden bei 4 °C gelagert. Um die Vermehrungsfähigkeit der anhaftenden Bakterien zu ermöglichen, enthalten diese ein Liquid Stuart Erhaltungsmedium. Um inhibitorische Einflüsse durch das enthaltene Transportmedium aufdecken zu können, wurden des Weiteren drei sterile Tupfer direkt in das Transportröhrchen überführt und den Proben entsprechend untersucht.

Für die anschließende Bakteriolyse wurden die Spitzen der verwendeten Tupfer mit einer ausgeglühten Schere abgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Die Tubes wurden anschließend mit jeweils 0,2 ml Lyse Puffer beschickt und fest verschlossen. Das anhaftende Material wurde durch intensives Mischen auf einem Vortexer abgelöst. Daraufhin wurden die Tupferspitzen aus den Suspensionen entfernt und verworfen. Die

eigentliche Bakteriolyse erfolgte dann durch Inkubation bei 99 °C für 10 Minuten. Die erhaltenen Lysate wurden für die weiteren Untersuchungen bei -20 °C eingefroren.

Für die Real-Time PCR wurden zunächst 28,8 µl Lysat mit 1,2 µl exoIPC DNA versetzt und gemischt. Jeweils 10 µl der drei Proben von verschiedenen Körperarealen eines jeden Freiwilligen wurden zu einer gepoolten Probe zusammengefasst und gemischt. Des Weiteren wurde der zugrundeliegende Lyse Puffer separat mit exoIPC DNA versetzt und in Vierfach-Ansatz untersucht. Als Vergleichskontrolle wurde in gleicher Weise Nuklease-freies Wasser mit exoIPC DNA versetzt und in einem Vierfach-Ansatz untersucht. Die Real-Time PCR wurde für die drei einzelnen Proben und die gepoolte Probe eines jeden Freiwilligen sowie für die einzelnen Proben der sterilen Tupfer in Dreifachbestimmung durchgeführt (vgl. Abbildung 4). Dazu wurden 5 µl der gespickten Proben für den PCR-Ansatz verwendet und die Real-Time PCR entsprechend Kapitel 3.6.2 durchgeführt. Um die inhibitorischen Einflüsse der Einzelkomponenten darstellen zu können, wurden die jeweiligen Abweichungen der Ct-Einzelwerte vom mittleren Ct-Wert der Vergleichskontrolle (delta Ct) berechnet und verglichen.

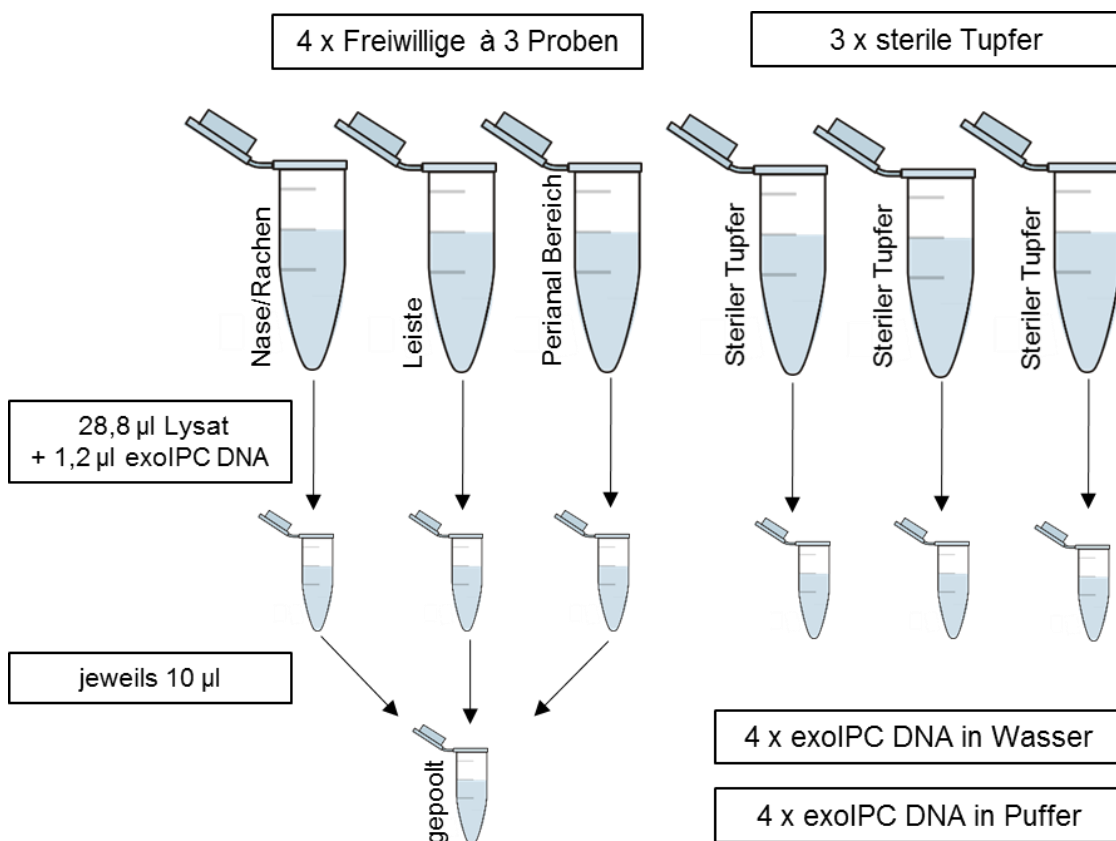


Abbildung 4 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Probenmatrix.

3.3.2.2 Untersuchung des Transportmediums für Abstrichtupfer

Das Transportmedium für die verwendeten Abstrichtupfer nimmt während der Probenaufarbeitung die anhaftenden Bakterien, Partikel und Körperflüssigkeiten auf und bildet somit einen grundlegenden Bestandteil der gesamten Probenmatrix. Um zu untersuchen welchen inhibitorischen Einfluss unterschiedliche Transportlösungen haben, wurden drei gepufferte, isotone Salzlösungen und das Eluat eines sterilen

Tupfers in Nuklease-freiem Wasser mit Hilfe des exoIPC Assays untersucht und mit Nuklease-freiem Wasser als Kontrolle verglichen. Da im weiteren Verlauf der Probenaufarbeitung Detergenzien zur Herstellung des Lyse Puffers hinzugefügt werden, wurden alle Lösungen auch in Kombination mit den Detergenzien in entsprechender Konzentration untersucht.

Für den Vergleich wurden Nuklease-freies Wasser, eine sterilisierte Natriumchloridlösung 0,85 % und zwei phosphatgepufferte Salzlösungen nach Dulbecco (DPBS) von unterschiedlichen Firmen herangezogen. Des Weiteren wurde ein steriler Copan FloqSwab™ Tupfer in einem Milliliter Nuklease-freiem Wasser gegeben und das resultierende Eluat verwendet. Diese fünf unterschiedlichen Lösungen wurden in drei verschiedenen Gruppen miteinander verglichen.

In der ersten Gruppe wurden jeweils 93,8 µl der zu untersuchenden Salzlösungen und Tupfer-Eluate zunächst mit 6,2 µl Detergenzien-Konzentrat (161 mM Tris-HCl, 16,1 mM EDTA, 16,1 % Triton-X 100, 8,06 % Tween 20) versetzt und gemischt. Die resultierenden Mischungen entsprechen somit dem in 3.3.1.2, b) beschriebenen Lyse Puffer für die thermische Lyse. Um auszuschließen, dass das um 6,2 µl verringerte Volumen der Ausgangslösungen den Vergleich beeinflusst wurden in der zweiten Gruppe die zu vergleichenden Lösungen mit 6,2 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und gemischt. In der dritten Gruppe wurden die unbehandelten Salzlösungen und die unbehandelten Eluate direkt für die weiteren Untersuchungen verwendet. Alle Mischungen wurden jeweils im Doppelansatz hergestellt.

Von diesen Mischungen wurden jeweils 28,8 µl in ein 0,2 ml Eppendorf Gefäß überführt, mit 1,2 µl exoIPC DNA versetzt und gemischt. Für die nachfolgende Real-Time PCR wurde jeweils ein Probevolumen von 5 µl verwendet. Die Abweichungen der Ct-Einzelwerte vom mittleren Ct-Wert der Kontrolle, angegeben als ΔC_t , wurden wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben, berechnet und verglichen.

3.3.3 Anpassungen für den Einsatz auf TaqMan® Array Cards

Die Bestimmung der Effizienz verschiedener Extraktionsmethoden, die Untersuchung der Probenmatrix und die Bestimmung der Spezifität der einzelnen Assays erfolgten in Einzelreaktionen auf Mikrotiterplatten. Für die einzelnen Real-Time PCR Untersuchungen wurde jeweils ein Reaktionsvolumen von 10 µl verwendet (siehe Kapitel 3.6.2). Das Reaktionsvolumen auf TaqMan® Array Cards beträgt 1 µl. Durch den Wechsel des Formates ist davon auszugehen, dass sich die eingebrachte Probemenge und somit die Sensitivität des Gesamtsystems um den Faktor 10 reduziert.

Um einem Sensitivitätsverlust vorzubeugen, wurde im Folgenden untersucht wie sich ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt auf die Extraktionseffizienz der schnellen Bakteriolyse (3.3.1.2, b)) auswirkt. Um den Effekt dieses zusätzlichen Konzentrationsschrittes quantifizieren zu können, wurde das ursprüngliche Protokoll ohne Konzentrationsschritt mit dem neuen Protokoll inklusive Zentrifugationsschritt verglichen. Dazu wurden Bakterienverdünnungsreihen, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, hergestellt und die

Keimkonzentrationen mittels Plattenzählverfahren bestimmt. Für beide Protokolle wurden zunächst 990 µl sterile Natriumchloridlösung 0,85 % mit jeweils 10 µl der Verdünnungsstufen 1 und 2 eines jeden Bakterienstammes versetzt und gemischt. Für die thermische Lyse ohne Zentrifugation wurden diese Primärproben direkt mit 66,1 µl Detergenzien-Konzentrat (161 mM Tris-HCl, 16,1 mM EDTA, 16,1 % Triton-X 100, 8,06 % Tween 20) versetzt. Anschließend wurden 106,6 µl dieser Mischung in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und 10 Minuten bei 99 °C thermisch lysiert.

Um eine Erhöhung der Ausgangskeimzahl zu erreichen, wurde das gesamte Volumen der Primärproben (1000 µl) zunächst 9 Minuten bei 3000 rpm und anschließend 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation werden vorhandene Bakterien und unlösliche Probenbestandteile sedimentiert und bilden zusammen ein festes Pellet am Boden des Gefäßes. Mit einer 1000 µl Kolbenhubpipette wurde der Überstand vorsichtig, ohne das Pellet aufzuwirbeln, aufgenommen und verworfen. Das Bakterienpellet wurde dann in 106,6 µl Lyse-Puffer resuspendiert und entsprechend des ursprünglichen Protokolls lysiert.

Als Leerwert-Kontrollen wurden Extraktionen mit 10 µl Nuklease-freiem Wasser parallel durchgeführt. Die Durchführung aller Extraktionen erfolgte in Doppelbestimmung.

Da eine Zentrifugation nicht nur Bakterien anreichert, sondern auch andere Bestandteile, die potentiell PCR-Inhibitorisch wirken, wird in einem zweiten Versuchsarm eine repräsentative Probenmatrix der Extraktion zugrunde gelegt. Zur Herstellung der Probenmatrix wurden von einer freiwilligen Person ein kombinierter Nasen-/Rachenabstich und ein Abstrich vom Perianalbereich mit jeweils einem FloqSwab™ Tupfer genommen. Beide Tupfer wurden in einem Proberöhrchen, das 2 ml sterile Natriumchloridlösung 0,85 % enthält, vereinigt. Das anhaftende Material wurde durch intensives Mischen auf einem Vortexer abgelöst und die Tupfer aus den Suspensionen entfernt. Von den Tupfer-Eluaten wurden dann ebenfalls 990 µl mit jeweils 10 µl der Verdünnungsstufen 1 und 2 eines jeden Bakterienstammes versetzt und wie oben beschrieben verarbeitet.

Für die nachfolgende Real-Time PCR wurde ein Probevolumen von 5 µl eingesetzt. Da die verwendeten Teststämme *E. coli* NRZ-02721 und *S. aureus* ATCC 43300 ein *bla* OXA-1 bzw. ein *mecA* Gen tragen, wurden zur Detektion die entsprechenden TaqMan Assays verwendet. Die resultierenden Ct-Werte einer Doppelbestimmung wurden gemittelt. Um die mögliche Konzentrierung von inhibitorischen Bestandteilen erkennen zu können, wurden alle Proben mit 0,2 µl exoIPC DNA (50X) beimpft und parallel mit dem exoIPC TaqMan Assay untersucht.

3.4 Aufarbeitung von Klinischen Proben für die molekularbiologische Untersuchung mittels Real-Time PCR

3.4.1 Screening-Abstriche

Kohorte stationäre Patienten

Von den Probensuspensionen, die aus den Abstrichen von stationären Patienten resultieren, wurden 469 µl in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und mit 31 µl Detergenzien-Konzentrat versetzt. Das Eppendorf Gefäß wurde daraufhin fest verschlossen und 15 Sekunden lang auf einem Vortexer intensiv gemischt. Die Bakteriolyse erfolgte dann durch Inkubation für 15 Minuten bei 99 °C. Im Anschluss an die thermische Lyse wurden die Lysate auf Raumtemperatur abgekühlt und an der Gefäßwand entstehendes Kondensat wurde durch kurzes Zentrifugieren abgesetzt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80 °C.

Kohorte Flüchtlinge

Alle Probensuspensionen, die aus den Screening-Abstrichen von Flüchtlingen resultieren, wurden mit einem für die Anwendung auf TaqMan Array Cards angepassten Protokoll verarbeitet. Dazu wurden 1000 µl der Probensuspension in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und diese fest verschlossen. Um eine Erhöhung der Ausgangskeimzahl zu erreichen, wurde das gesamte Volumen zunächst 9 Minuten bei 3000 rpm und anschließend 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Durch die Zentrifugation werden vorhandene Bakterien und unlösliche Probenbestandteile sedimentiert und bilden zusammen ein festes Pellet am Boden des Gefäßes. Mit einer 1000 µl Kolbenhubpipette wurde der Überstand vorsichtig, ohne das Pellet aufzuwirbeln, aufgenommen und verworfen. Das Bakterienpellet wurde dann in 120 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Die eigentliche Bakteriolyse erfolgte durch Inkubation für 10 Minuten bei 99 °C. Die abgekühlten Lysate wurden zentrifugiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Stuhlproben

Kohorte Flüchtlinge und FoCus-Kohorte

Die eingefrorenen Stuhlproben wurden angetaut und circa 0,2 g Faeces wurden direkt zur DNA Extraktion mit dem MoBio PowerSoil® DNA Isolations Kit eingesetzt. Die Extraktion erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls, wobei die extrahierte DNA in 100 µl des mitgelieferten C6 Puffers eluiert wurde. Die erhaltenen DNA-Extrakte wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.5 Mikrobiologische Untersuchung von Klinischen Proben

Die vorbereiteten Probensuspensionen, sowohl von den stationären Patienten als auch von den Flüchtlingen, wurden direkt nach der Herstellung dem Forschungslabor des Institutes für Infektionsmedizin übergeben und dort mit den kulturbasierten Routine-Screening Methoden untersucht. Die Detektion von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Spezies (MRSA), von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und multiresistenten gramnegativen Bakterien (MRGN), die β -Lactamasen mit breitem Wirkspektrum (ESBL) produzieren und/oder Carbapenem-resistent sind, erfolgte mit Hilfe von verschiedenen chromogenen Selektivmedien. Dazu wurden Aliquote von jeweils 100 μ l der Probensuspension auf CHROMagar™ MRSA, chromID® VRE Agar und chromID® ESBL Agar ausgebracht und fraktioniert ausgestrichen. Nach erfolgter Inokulation des chromID® ESBL Selektivmediums, wurde zur Detektion einer Carbapenem-Resistenz zusätzlich ein Antibiotikaplättchen, das 10 μ g Imipenem enthält, im Bereich der ersten Ausstrichfraktion aufgelegt. Die beimpften Nährmedien wurden anschließend für bis zu 48 h in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeiten begutachtet.

Die in den folgenden Kapiteln 3.5.1, 3.5.2 und 3.5.3 beschriebenen kulturbasierten Screening Methoden wurden von Mitarbeitern des Instituts für Infektionsmedizin durchgeführt. Die Auswertung der Resistenzbestimmung und die qualitative Bewertung der Ergebnisse (sensibel, intermediär, resistent) erfolgte anhand klinischer Grenzkonzentrationen (Breakpoints) gemäß den Empfehlungen des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Die Übermittlung der Ergebnisse erfolgte anschließend in Form eines medizinischen Befundes.

3.5.1 Kulturbasiertes Screening auf Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Das verwendete CHROMagar™ MRSA Selektivmedium dient dem direkten, qualitativen Nachweis von MRSA in Nasal-, Perineal-, Rachen- und Rektalabstrichen. Das Medium zeichnet sich durch eine erhöhte Salzkonzentration aus, welche selektiv das Wachstum von Staphylokokken begünstigt und die Begleit-Flora unterdrückt. Zum Selektieren von Methicillin-resistenten Staphylokokken ist zusätzlich das Zweitgenerations-Cephalosporin Cefoxitin enthalten, welches das Wachstum von BetaLactam-sensiblen Staphylokokken unterdrückt. Des Weiteren ermöglichen chromogene Zusatzstoffe eine erste Differenzierung anhand der unterschiedlichen Färbung der wachsenden Kolonien. Enterokokken und andere grampositive Bakterien wachsen in blauen bzw. farblosen Kolonien. Resistente Spezies von *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) erscheinen in Form von weißen Kolonien. Das Wachstum von roten Kolonien deutet dabei auf das Vorhandensein von MRSA hin. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die beimpften MRSA Selektivmedien abgelesen. Kulturen ohne bakterielles Wachstum und Kulturen auf denen weiße, blaue oder farblose Kolonien wuchsen, wurden als MRSA-negativ befundet. MRSA-verdächtige, rote Kolonien wurden isoliert und weiteren Bestätigungstests unterzogen. Dazu wurden verdächtige Kolonien isoliert, fraktioniert

auf einem Mannit-Kochsalz Agar ausgestrichen und für 18 h bis 24 h bei 37 °C inkubiert. Bei positivem Wachstum wurde ein Latex-Agglutinationstest (Pastorex Staph Plus) zum Nachweis von verschiedenen Zellwandproteinen durchgeführt, die die Pathogenität von Staphylokokken bedingen. Detektiert werden dabei der Clumping-Faktor A, das Protein A und *S. aureus* spezifische Polysaccharide der bakteriellen Zellwand. Bei einem positiven Pastorex-Test erfolgte eine molekulare Differenzierung des Isolates mittels MALDI-TOF-MS (BRUKER). Wurde durch die molekulare Differenzierung ein *Staphylococcus aureus* identifiziert, dann wurde anschließend eine automatisierte biochemische Differenzierung (GP ID) und Resistenzbestimmung (AST-P632) mit Hilfe eines Vitek 2[®] Gerätes durchgeführt. Wenn beide Untersuchungen einen *Staphylococcus aureus* mit entsprechender Cefoxitin- und Oxacillin-Resistenz zum Ergebnis hatten, dann wurde abschließend ein chromatographischer In-vitro Immunoassay (Alerc[™] PBP2a Culture Colony Test) zum Nachweis von Penicillin-bindendem Protein 2a durchgeführt.

3.5.2 Kulturbasiertes Screening auf Vancomycin-resistente *Enterococcus* spp. (VRE)

Der verwendete ChromID[™] VRE Agar ist ein selektives, chromogenes Medium zum Nachweis von Enterokokken mit erworbener high-level Vancomycin-Resistenz. Durch den Zusatz von Vancomycin in einer Konzentration von 8 mg/l, wird das Wachstum von Glycopeptid-sensiblen Spezies und *E. casseliflavus* sowie *E. gallinarium* mit inhärenter low-level Vancomycin-Resistenz gehemmt. Des Weiteren sind chromogene Salze enthalten, die eine initiale, biochemische Differenzierung von *E. faecium* und *E. faecalis* ermöglichen. *E. faecium* Spezies wachsen aufgrund einer beta-Galactosidase-Aktivität in violett gefärbten Kolonien, wohingegen *E. faecalis* Kolonien aufgrund einer alfa-Glucosidase-Aktivität blaugrün erscheinen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die beimpften VRE Selektivmedien zum ersten Mal abgelesen. Kulturen ohne bakterielles Wachstum wurden für weitere 24 h inkubiert und erneut abgelesen. VRE-verdächtige Kolonien wurden isoliert und weiteren Bestätigungstests unterzogen. Wenn nach 48 h kein bakterielles Wachstum erkennbar war, wurde die Kultur als VRE-negativ befundet. Für die weitere Bestätigung der Screening Ergebnisse wurden VRE suspekten Kolonien isoliert und einer molekularen Differenzierung mittels MALDI-TOF-MS (BRUKER) unterzogen. Bei Identifizierung von Enterokokken, wurde eine automatisierte biochemische Vitek-Differenzierung (GP-ID) und Resistenzbestimmung (AST-P611) angeschlossen.

3.5.3 Kulturbasiertes Screening auf multiresistente gramnegative Stäbchen (MRGN)

Für das kulturbasierte Screening auf MRGN wurde das chromID[™] ESBL Selektivmedium verwendet. Zur Selektierung von ESBL-bildende Bakterien ist das Drittgenerations-Cephalosporin Cefpodoxim enthalten, welches das Wachstum von BetaLactam-sensiblen Bakterien unterdrückt. Um Bakterienstämme, die keine ESBL

bilden, aber eine high-level Cephalosporinase vom Typ AmpC exprimieren, am Wachstum zu hindern ist zusätzlich Cloxacillin als AmpC-Inhibitor im Medium enthalten. Des Weiteren sind verschiedene chromogene Salze enthalten, die eine erste biochemische Differenzierung von verschiedenen Enterobakterien ermöglichen. Pinkfarbene Kolonien weisen dabei auf das Wachstum von ESBL-produzierenden *Escherichia coli* hin, da mehr als 95 % aller Stämme dieser Spezies beta-Glucuronidase bilden. Enterobakterien der Gattung *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* und *Citrobacter* bilden aufgrund der Expression einer beta-Glucosidase grüne bis grün-braune Kolonien. Darüber hinaus erscheinen Bakterien der Gattung *Proteus*, *Morganella* und *Providencia* aufgrund einer Deaminase-Aktivität in Form von tiefbraunen bis hellbraunen Kolonien. Durch das Auflegen eines Antibiotikaplättchens, das 10 µg Imipenem enthält, lässt sich zusätzlich beurteilen, ob der anwachsende ESBL-produzierende Stamm zusätzliche eine Carbapenem-Resistenz aufweist. Carbapenem-sensible Stämme würden einen deutlichen Hemmhof um das aufgelegte Plättchen bilden, wohingegen Carbapenem-resistente Stämme bis an das Plättchen heranreichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die beimpften ESBL Selektivmedien abgelesen. Um den Verdacht einer ESBL- bzw. Carbapenemase-Produktion zu bestätigen, wurden suspekten Kolonien isoliert und zunächst einer molekularen Differenzierung mittels MALDI-TOF-MS unterzogen. Bei Vorliegen von gramnegativen Spezies wurde eine automatisierte biochemische Vitek-Differenzierung (GN-ID) und Resistenzbestimmung (AST-P263) angeschlossen.

3.6 TaqMan® Real-Time PCR

3.6.1 Primer- und Sonden-Design

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden insgesamt 48 Primer- und Sonden-Sets getestet und verwendet (Tabelle 8-1). Die Entwicklung spezifischer Primer und TaqMan®-Sonden erfolgte (I) durch die Entwicklungsabteilung der Firma Applied Biosystems™ (Life Technologies™ Thermo Fisher Scientific), (II) im Rahmen dieser Doktorarbeit und (III) in Kooperation beider Seiten. Die Entwicklung neuer TaqMan Assays erfolgte mit Hilfe von bereits veröffentlichten Sequenzen der zu detektierenden Resistenzgene. Für die Auswahl von geeigneten Regionen innerhalb eines Resistenzgens wurden die verfügbaren Nukleotidsequenzen verschiedener Varianten dieses Resistenzgens von der NCBI Nucleotide Datenbank [142] bezogen und mit Hilfe des vom NIH zur Verfügung gestellten *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) mit einander verglichen. Für das Sonden-Design wurden die Sequenzabschnitte ausgewählt, die hochspezifisch für die gesuchten Genvarianten sind. Anhand der gewählten Sequenzabschnitte wurden anschließend mit Hilfe der Software Primer Express Version 3.0 verschiedene Primer- und Sonden-Sets generiert und unter Berücksichtigung der im Primer Express *Getting Started Guide* [143] vorgegebenen und der von Kwok [144] empfohlenen Parameter angepasst:

- Amplikonlänge von 50 bp bis 150 bp
- Optimale Sondenlänge von 13 bp bis 25 bp
- Optimale Schmelztemperatur (T_M) der Sonde von 68 °C bis 70 °C
- GC – Gehalt von Primer und Sonde in einem Bereich zwischen 30 % und 80 %
- Optimale Primer-Länge von 20 bp
- Optimale Schmelztemperatur (T_M) der Primer von 58 °C bis 60 °C

Des Weiteren sollten Serien von identischen Nukleotiden vermieden werden. Im Besonderen sollten weniger als vier aufeinanderfolgende Guanidin-Nukleotide (G) enthalten sein. Im Falle der verwendeten FAM™ - Reporter-Sonden sollte ein G an der ersten und zweiten Position des 5' – Endes vermieden werden, da es sonst trotz erfolgter Sondenhydrolyse zur Fluoreszenzlöschung (Quenching) kommen kann. Durch Einhaltung dieser Design-Vorgaben ist es möglich diverse Primer- und Sonden-Sets gleichzeitig, unter universellen PCR-Bedingungen (Primer- und Sondenkonzentration, Mastermix, Temperaturprofil) zu verwenden. Die gleichzeitige, parallele Anwendbarkeit ist ferner die Grundvoraussetzung für die potentielle Umsetzung von bis zu 48 TaqMan-Assays auf TaqMan® Array Cards.

Die verwendete Software generiert entsprechende Nukleotidsequenz-Kandidaten und berechnet anhand der vorgegebenen Parameter und anhand von potentiellen Dimer- oder Haarnadel-Sekundärstrukturen den sogenannten Penalty-Score. Je kleiner der Wert dieses Scores ist, desto besser werden die vorgegeben Kriterien eingehalten. Die Kandidaten-Sets mit dem niedrigsten Penalty-Score wurden ausgewählt und mit der frei zugänglichen Primer-BLAST Suche [145] hinsichtlich ihrer Zielgen-Spezifität überprüft

[146]. Dazu wurden die ausgewählten Primer-Sequenzen mit der *nr*-Gendatenbank, ohne Eingrenzung der zu Untersuchenden Organismen, abgeglichen und auf unspezifische Amplifikate hin untersucht.

Primer und Sonden, die den oben genannten Kriterien entsprechen und hochspezifisch für das gesuchte Zielgen sind, wurden von der Firma Applied Biosystems™ (Life Technologies™ Thermo Fisher Scientific) produziert und in gebrauchsfähigen Lösungen geliefert, welche sowohl den Forward- als auch den Reverse-Primer in einer Ausgangskonzentration (20X) von 18 µM enthält. Die zugehörige, mit einem FAM™-Reporterfarbstoff markierte, TaqMan-Sonde ist ebenfalls in einer Konzentration (20X) von 5 µM enthalten.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise und die Rationale für die Entwicklung der in dieser Forschungsarbeit vorgestellten Primer- und Sondenets erläutert. In Tabelle 3-6 sind die Sequenzen und Eigenschaften der resultierenden Primer und TaqMan® Sonden zusammengefasst.

Tabelle 3-6 Sequenzen und Eigenschaften der entwickelten Primer- und Sondenets

Ziel-Gen	Sequenz (5' → 3')	Sequenz- länge (bp)	T _m ¹⁾ (°C)	Produkt- länge (bp)
<i>femA</i> – SA ²⁾				
fwd-Primer	TCATTTTGCCGGAAGTTATGC	21	59	
rev-Primer	AACGGTCAATGCCATGATTTAAT	23	58	71
Sonde	TGCAATGGGAAATGA	17	68	
<i>femA</i> – SE ³⁾				
fwd-Primer	TTACTACGCTGGTGGAACCTTCAA	24	59	
rev-Primer	ATCTTCCATTGAACCGCATAGC	22	59	69
Sonde	CGTTATCGCCATTTTG	16	70	
<i>bla</i> OXA-48				
fwd-Primer	GGGCGAACCAAGCATTTTTT	19	59	
rev-Primer	GCGATCAAGCTATTGGGAATTT	22	58	58
Sonde	CCCGCATCTACCTTT	15	69	
<i>bla</i> NDM-1				
fwd-Primer	GTCGGCATCACCGAGATTG	19	59	
rev-Primer	TGCCTGATCAAGGACAGCAA	20	59	54
Sonde	CGAGCGACTTGGC	13	69	

¹⁾ T_m = Schmelztemperatur des Primers bzw. der Sonde in °C, berechnet mit Primer Express Software 3.0.

²⁾ *femA* – SA detektiert eine *Staphylococcus aureus* spezifische Sequenz des *femA* Gens. ³⁾ *femA* – SE detektiert eine *Staphylococcus epidermidis* spezifische Sequenz des *femA* Gens.

3.6.1.1 Speziespezifische Assays zur Detektion von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*

Die phänotypische Methicillin-Resistenz in MRSA Isolaten wird durch die Produktion des Penicillin-bindenden Proteins 2a bedingt, welches auf genetischer Ebene durch das *mecA*-Gen kodiert wird. Allerdings kommt dieses Gen nicht speziespezifisch nur in *Staphylococcus aureus*, sondern auch in anderen Koagulase-negativen Staphylokokken ohne klinische Relevanz vor. Eine Methicillin-Resistenz in *S. epidermidis*, *S. hominis* oder *S. haemolyticus* würde somit bei einer alleinigen Detektion des *mecA*-Gens zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Die zusätzliche Detektion eines *S. aureus*-spezifischen Gens bzw. einer spezifischen Sequenz in einem universellen Gen kann die Spezifität der Real-Time PCR verbessern. Eine Speziesidentifikation ist dabei über verschiedene Gene möglich, allem voran das bakterielle 16S rRNA Gen. Des Weiteren wurden in anderen Arbeiten das Thermo-nuklease-Gen (*nuc*) [147], das Koagulase-Gen (*coa*), das 442-bp DNA-Fragment (SA442) [148] und verschiedene *fem*-Faktoren (*femA* und *femB*) [149,150], die in der Peptidoglycan Synthese eine entscheidende Rolle spielen, für die Speziesidentifikation verwendet.

Da die chromosomal kodierten *fem*-Faktoren sowohl die phänotypische Methicillin-Resistenz beeinflussen [151], als auch über alle Staphylokokken phylogenetisch konserviert sind, wurden diese als Ziel-Gen für die Detektion und Speziesidentifikation von *S. aureus* und *S. epidermidis* ausgewählt. Die *femA* Referenzsequenzen der Spezies *S. aureus* (GenBank Accession Number X17688) und *S. epidermidis* (GenBank Accession Number U23713) wurden von der NCBI Nucleotide Datenbank bezogen und mit Hilfe von Nucleotide BLAST in einem Alignment verglichen. Die Sequenzübereinstimmung betrug dabei 78 %. Um eine Speziesdifferenzierung zu ermöglichen wurden für das Primer- und Sonden-Design diejenigen Sequenzabschnitte ausgewählt, die eine geringe Homologie aufwiesen.

3.6.1.2 *bla* OXA-48 ähnliche Carbapenemase-Gene

In Europa werden in den letzten Jahren immer häufiger Carbapenemase produzierende *Enterobacteriaceae* identifiziert, die Varianten des *bla* OXA-48 Gens tragen. In Deutschland ist es mit Abstand die häufigste in *Enterobacteriaceae* vorkommende Carbapenemase [152]. Aktuell sind acht OXA-48 ähnliche Varianten bekannt, die sich lediglich durch ein bis fünf Aminosäuresubstitutionen oder -deletionen unterscheiden [153]. Die exprimierten Genvarianten OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244 und OXA-245 hydrolysieren Penicillin-Antibiotika und Carbapeneme, vermitteln jedoch keine Resistenz gegenüber Cephalosporine mit erweitertem Wirkspektrum [154]. Dies bedeutet, dass die kulturelle Detektion mittels Cephalosporin enthaltende Selektivmedien nicht möglich ist, sofern keine weitere ESBL parallel gebildet wird, weshalb die molekularbiologischen Methoden den Goldstandard für die Detektion und die Differenzierung der OXA-Typ Carbapenemasen darstellen [97]. OXA-163 bildet dabei eine Ausnahme und zeigt eine ausgesprochene ESBL- aber keine Carbapenemase-Aktivität.

Für das Primer- und Sonden-Design wurden die GenBank Accession Numbers für die Referenzsequenzen der einzelnen OXA-48 ähnlichen Genvarianten von der *Lahey Clinic* β -Lactamase-Datenbank [154] bezogen. Anschließend wurden die Referenzsequenzen in einem BLAST Alignment verglichen, wobei das OXA-48 Referenzgen als *Query*-Sequenz verwendet wurde. Genregionen mit hoher Sequenzhomologie über alle Genvarianten wurden ausgewählt und die entsprechende Nukleotidsequenz des parentalen OXA-48 Gens für das Primer- und Sonden-Design zugrunde gelegt.

Tabelle 3-7 GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für *bla* OXA-48 ähnliche Carbapenemasen

<i>bla</i> OXA	Accession Number
OXA - 48*	AY236073
OXA - 162	HM015773
OXA - 181	JN205800
OXA - 204	JQ809466
OXA - 232	JX423831
OXA - 244	JX438000
OXA - 245	JX438001

3.6.1.3 *bla* OXA-Carbapenemase-Gene in *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii ist ein gramnegatives, nichtsporenbildendes Stäbchenbakterium, das Glucose nicht fermentieren kann und somit zur Gruppe der Nonfermenter gezählt wird. *Acinetobacter* spp. sind opportunistische Humanpathogene die ubiquitär in der Umwelt sowie auf der Haut und den Schleimhäuten vorkommen [155]. Sie verursachen im wesentlichen Harnwegs- und Wundinfektionen sowie beatmungsassoziierte Pneumonien. Aufgrund der Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen und der natürlichen Kompetenz für die Aufnahme von Fremdgenen im Allgemeinen und Resistenzgenen im Speziellen, sind multiresistente Bakterien des *Acinetobacter baumannii*-Komplexes immer häufiger Ursache einer therapieresistenten nosokomialen Infektion [156]. Die Multiresistenz umfasst dabei oftmals die gleichzeitige Resistenz gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen, Fluorchinolonen und Carbapenemen (4MRGN), wodurch die Therapieoptionen, z.B. auf das Reserveantibiotikum Colistin, limitiert sind. Die Prävalenz für *Acinetobacter*-assoziierte Pneumonien auf deutschen Intensivstationen beträgt circa 2 % [156], wobei 22,6 % der Isolate Carbapenem-resistent waren (Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 01.07.2015). Die phänotypische Carbapenem-resistenz ist dabei in den meisten Fällen genetisch durch eine Vielzahl von verschiedenen OXA-Typ β -Lactamase-Genen determiniert. Diese sind entweder plasmidisch oder chromosomal lokalisiert und lassen sich im Wesentlichen in fünf Gruppen unterteilen, die jeweils nach den parentalen Genen OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58 und OXA-48 benannt wurden [157]. Die GenBank Accession Numbers der wichtigsten Varianten innerhalb der OXA-23, OXA-40

und OXA-58 Gruppen wurden von der *Lahey Clinic* β -Lactamase-Datenbank [154] bezogen und dem Primer- und Sonden-Design durch die Entwicklungsabteilung des Kooperationspartners Applied Biosystems zugrunde gelegt. Da OXA-51 ähnliche Carbapenemase-Gene in allen *A. baumannii* intrinsisch vorkommen und nur durch eine Überexpression zu einer phänotypischen Resistenz führen, wurde auf eine Detektion dieser Genfamilie verzichtet.

Tabelle 3-8 GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für *bla* OXA-23, OXA-40 und OXA-58 ähnliche Carbapenemasen

<i>bla</i> OXA-23	Accession Number	<i>bla</i> OXA-40	Accession Number
OXA - 23*	AJ132105	OXA - 40*	AF509241
OXA - 27	AF201828	OXA - 25	AF201826
OXA - 49	AY288523	OXA - 26	AF201827
OXA - 73	AY762325	OXA - 72	EF534256
OXA - 133	EU571228	OXA - 139	AM991978
OXA - 134	HQ122933	OXA - 160	GU199038
OXA - 146	FJ194494	OXA - 207	JQ838185
OXA - 165	HM488986		
OXA - 166	HM488987	<i>bla</i> OXA-58	Accession Number
OXA - 167	HM488988	OXA - 58*	AY665723
OXA - 168	HM488989	OXA - 96	DQ519090
OXA - 169	HM488990	OXA - 97	EF102240
OXA - 170	HM488991	OXA - 164	GU831575
OXA - 171	HM488992		
OXA - 225	JN638887		
OXA - 239	JQ837239		

* namensgebende Genvariante für die entsprechende Gruppe

3.6.1.4 *bla* NDM-1 ähnliche Carbapenemase-Gene

Die Neu-Delhi Metallo- β -Lactamase, kurz NDM, vermittelt die phänotypische Resistenz gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen. Im Jahr 2008 wurde NDM-1 erstmalig in einem *Klebsiella pneumoniae* Stamm beschrieben, der von einem aus Neu-Delhi stammenden Patienten in einem schwedischen Krankenhaus isoliert wurde [118]. Die zugrundeliegenden *bla* Gene sind häufig auf Plasmiden lokalisiert, die zum einen mehrere Resistenzgene tragen und zum anderen leicht zwischen verschiedenen Spezies von *Enterobacteriaceae* horizontal übertragbar sind. Dies begründet die schnelle Ausbreitung von zumeist multiresistenten Stämmen über die ganze Welt, ausgehend vom indischen Subkontinent [158]. Zurzeit sind 16 Varianten des parentalen *bla* NDM-1 bekannt, wobei NDM-1 die dritthäufigste Carbapenemase bei *Enterobacteriaceae* in Deutschland ist [75].

Für das Primer- und Sonden-Design wurden die GenBank Accession Numbers für die Referenzsequenzen der einzelnen NDM-1 ähnlichen Genvarianten von der *Lahey Clinic*

β -Lactamase-Datenbank [154] bezogen. Anschließend wurden die Referenzsequenzen in einem BLAST Alignment verglichen, wobei das NDM-1 Referenzgen als *Query*-Sequenz verwendet wurde. Genregionen mit hoher Sequenzhomologie über alle Genvarianten wurden ausgewählt und die entsprechende Nukleotidsequenz des parentalen NDM-1 Gens für das Primer- und Sonden-Design zugrunde gelegt.

Tabelle 3-9 GenBank Accession Numbers der Referenzsequenzen für *bla* NDM-1 ähnliche Carbapenemasen

<i>bla</i> NDM	Accession Number
NDM-1	FN396876
NDM-2	JF703135
NDM-3	JQ734687
NDM-4	JQ348841
NDM-5	JN104597
NDM-6	JN967644
NDM-7	JX262694
NDM-8	AB744718
NDM-9	KC999080
NDM-10	KF361506
NDM-11	Assigned
NDM-12	AB926431

3.6.2 Reaktionsansätze und Temperaturprofile für Einzelreaktionen auf Mikrotiterplatten

Sowohl die Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen als auch die Evaluierung der einzelnen Assays an Klinischen Proben erfolgte unter der Verwendung des folgenden universellen Real-Time PCR Protokolls.

Der verwendete TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix ist eine gebrauchsfertige Lösung, die alle Komponenten, bis auf Primer und Sonden, für die Durchführung einer TaqMan Real-Time PCR in entsprechender Konzentration enthält:

- Eine Hot-Start AmpliTaq® DNA Polymerase
- Einen ROX™ Fluoreszenzfarbstoff, der als passive Referenzkontrolle dient und unspezifische Fluoreszenzschwankungen zwischen den Reaktionen eines PCR-Laufs normalisiert
- Einen PCR-Puffer mit Magnesium- und Chlorid-Ionen in optimierter Konzentration
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) als Bausteine zur DNA-Synthese

Die Zusammensetzung und die Konzentrationen der Einzelkomponenten des verwendeten Master Mix sind dabei für die Verwendung von TaqMan® Assays optimiert, die mit Primer Express designt wurden. Der fertige Reaktionsansatz setzt sich somit wie

in Tabelle 3-10 beschrieben zusammen. Innerhalb eines jeden PCR-Laufs wurde jede klinische Probe zusätzlich mit einer internen, exogenen Inhibitionskontrolle (exolPC) untersucht. Die jeweiligen Reaktionsgemische wurden dazu mit jeweils 0,2 µl artifizieller DNA versetzt und mit dem entsprechenden Assay untersucht. Für die Herstellung der Reaktionsansätze wurde zunächst das um die Anzahl der Proben vervielfachte Volumen des TaqMan® Fast Universal Master Mix in ein Eppendorf Gefäß vorgelegt und mit dem entsprechenden Volumen eines Assays versetzt. Das Gefäß wurde verschlossen, vorsichtig gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Ein Probevolumen von 5 µl wurde anschließend in die Kavitäten einer 96er bzw. 384er Mikrotiterplatte pipettiert. Die beschickte Platte wurde mit einer adhäsiven Plattenfolie verschlossen und kurz zentrifugiert, um an der Wandung haftende Flüssigkeit abzusetzen. Nach dem Entfernen der Folie wurden die einzelnen Proben mit den unterschiedlichen Assay/Master Mix Gemischen versetzt. Die Platte wurde anschließend mit einer optischen, adhäsiven Folie (MicroAmp®) verschlossen und erneut zentrifugiert.

Tabelle 3-10 Reaktionsansatz für die Real-Time PCR in Einzelreaktionen

Komponente	Volumen für 1 Reaktion [µl]	
	Resistenzgen	IPC
TaqMan® Fast Universal Master Mix (2X)	4,5	4,5
Primer-/Sonden Mix (20X)	0,5	0,5
Probevolumen	5,0	4,8
exolPC DNA (50X)	-	0,2
Gesamtvolumen	10,0	10,0

Die fertigen Mikrotiterplatten wurden anschließend mit einem ViiA™ 7 Real-Time PCR System untersucht. In der zugehörigen ViiA 7™ RUO Software wurde dazu der entsprechende PCR-Block gewählt und die Einstellungen für die Verwendung für TaqMan® Reagenzien in einem *Fast* – Protokoll vorgenommen. Das *Fast* – Protokoll ermöglicht, aufgrund von beschleunigten Temperaturrampen, eine schnellere Gesamtanalyse innerhalb von 40 Minuten.

Das verwendete Temperaturprofil (Abbildung 5) startet mit einer initialen 20-sekündigen Denaturierungsphase bei 95 °C. Dabei werden vorliegende doppelsträngige DNA-Fragmente und etwaige Primer-Dimere vollständig voneinander getrennt und die verwendete Hot-Start Polymerase wird aktiviert. Die anschließende Amplifikation findet in 40 Zyklen statt, die jeweils mit einer 1-sekündigen Denaturierung bei 95 °C beginnen und mit einem 20-sekündigen kombinierten Annealing/Extensions-Schritt bei 60 °C (Zwei-Schritt-PCR) enden. Die Echtzeitmessung der Fluoreszenzänderung erfolgte jeweils während der Annealing/Extensions-Phase.

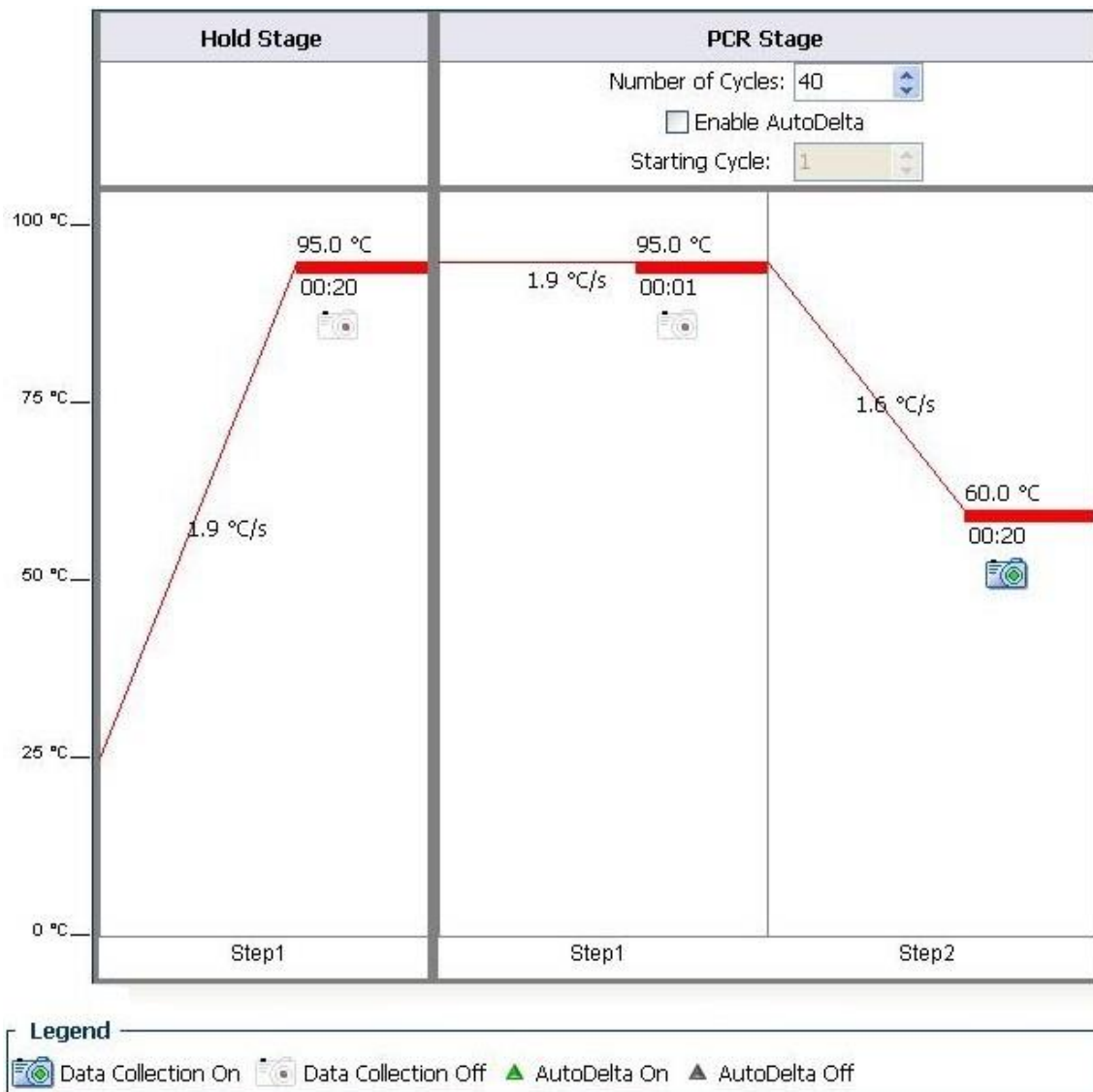


Abbildung 5 Temperaturprofil I für die Real-Time PCR in Einzelreaktionen
 ViiA™ 7 Real-Time PCR System, ViiA™ 7 RUO Software

3.6.3 Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen

Für die Etablierung des Real-Time PCR Systems wurde mindestens ein Referenzstamm verwendet, der das zu detektierende Resistenzgen trägt (Positiv-Kontrollen) und verschiedene verwandte Bakterienstämme, die ein anderes bzw. kein entsprechendes Resistenzgen tragen (Negativ-Kontrollen). Die verwendeten Referenzstämme und deren Resistenz-Genotyp sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Für die Bestimmung der allgemeinen PCR-Parameter, der analytischen Sensitivität und Spezifität sowie zur Bestimmung der Nachweisgrenzen und der Robustheit der verwendeten TaqMan Assays wurden zunächst die im Kapitel 3.2 hergestellten DNA-Extrakte auf 200.000 GE/µl eingestellt. Die folgenden Untersuchungen dienen der Beurteilung der technischen Leistungsfähigkeit des Real-Time PCR Systems.

3.6.3.1 Herstellung von Verdünnungsreihen mit DNA aus Referenzstämmen zur Bestimmung der analytischen Sensitivität

Die auf 200.000 GE/ μ l eingestellten Stammlösungen wurden anschließend mit Nuklease-freiem Wasser in einer 7-stufigen Verdünnungsreihe 1:10 verdünnt. Um den Bereich der Nachweisgrenze besser auflösen zu können, wurden zwei zusätzliche 1:1-Verdünnungsstufen (5a, 6a) integriert (vgl. Tabelle 3-11).

Nachfolgend wurde ein Volumen von 5 μ l der Verdünnungsstufen 1, 3, 4, 5, 5a, 6, 6a und 7 eines Referenzstammes für die Real-Time PCR Untersuchung des entsprechenden TaqMan Assays eingesetzt. Dabei wurden die Verdünnungsstufen mit 10^6 , 10^4 , 10^2 GE pro 5 μ l im Doppelansatz und die Verdünnungsstufen mit 50, 10, 5 und 1 GE pro 5 μ l im fünffach-Ansatz untersucht. Zusätzlich wurde Nuklease-freies Wasser als Negativ-Kontrolle in Doppelbestimmung untersucht.

Tabelle 3-11 DNA-Verdünnungsreihen zur Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen

Verdünnungsstufe	Kopienzahl [GE/ μ l]	Probevolumen für PCR [μ l]	Kopienzahl [GE/5 μ l]	Replikate in PCR
1	200.000	5	1.000.000	2
2	20.000	-	-	-
3	2.000	5	10.000	2
4	200	-	-	-
5	20	5	100	2
5a	10	5	50	5
6	2	5	10	5
6a	1	5	5	5
7	0,2	5	1	5

Die resultierenden Ct-Werte einer Verdünnungsstufe wurden gemittelt und in einem XY – Diagramm gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden GE-Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurde anschließend eine lineare Regression durchgeführt und der Pearson-Korrelationskoeffizient (r^2) der Regressionsgeraden berechnet. Mit Hilfe der resultierenden Geradengleichung (5) wurde die Amplifikations-Effizienz E der Real-Time PCR entsprechend Formel (6) bestimmt.

$$(5) \quad y = m * x + n$$

$$(6) \quad E = (10^{-\frac{1}{m}}) - 1$$

Die Real-Time PCR Untersuchung der einzelnen Verdünnungsstufen hat den Ct-Wert als kontinuierliche Größe zum Ergebnis. Um die resultierenden Ct-Werte in eine qualitative Aussage, detektiert oder nicht detektiert, zu übersetzen, wurde ein Cut-Off-Wert von 40 definiert. Nachfolgend wurde der Anteil an positiv getesteten Replikaten einer Verdünnungsstufe bestimmt und für die Ermittlung der analytischen Sensitivität verwendet.

3.6.3.2 Probit-Analyse zur Bestimmung der Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität, ausgedrückt als Nachweisgrenze oder *Limit of Detection* (LOD), wurde mit Hilfe einer Probit-Analyse bestimmt. Es handelt sich dabei um ein von David Finney (1952) entwickeltes nicht-lineares Regressionsmodell für qualitative Untersuchungen oder Tests, deren Ergebnisgrößen binär sind: ja/ nein, detektiert/ nicht detektiert oder krank/ nicht krank [159]. Dazu wurden die prozentualen Anteile der positiv getesteten Replikate einer jeden Verdünnungsstufe anhand von *Finney's Table* [160] in *Probability Units* (kurz: Probits) umgerechnet und gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden Genomäquivalent-Konzentration aufgetragen.

3.6.3.3 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität bezeichnet das Vermögen eines Testsystems ausschließlich das entsprechende Ziel-Gen, einschließlich wichtiger Varianten dieses Gens, vor dem Hintergrund anderer Gene zu detektieren. Die unspezifische Bindung von Primern und Sonden eines Real-Time PCR Assays an Gensequenzen von phylogenetisch verwandten Bakterien und Bakterien der lokalen Begleit-Flora können zur unspezifischen Amplifikation einer Gensequenz und somit zur falsch-positiven Detektion eines nicht vorhandenen Ziel-Gens führen. Um potentielle Kreuzreaktionen ausschließen zu können, erfolgte die Bestimmung der analytischen Spezifität der verwendeten TaqMan[®] Real-Time PCR Assays mittels extrahierter DNA von mindestens einem Referenzstamm, der das zu detektierende Ziel-Gen trägt (Positiv-Kontrolle) und von verschiedenen verwandten Bakterienstämmen die eine andere Variante des Ziel-Gens, ein anderes Resistenzgen oder kein entsprechendes Resistenzgen tragen (Negativ-Kontrollen). Dazu wurden jeweils 5 µl der auf 200.000 GE/µl eingestellten DNA-Extrakte (Verdünnungsstufe 1, Tabelle 3-11) für die jeweilige Real-Time PCR Untersuchung eingesetzt. Die verwendeten Bakterienstämme und Nuklease-freies Wasser als NTC wurden jeweils in Doppelbestimmung untersucht.

Um die resultierenden Ct-Werte in eine qualitative Aussage – PCR positiv oder PCR negativ bzw. Resistenzgen vorhanden oder nicht vorhanden – überführen zu können, wurden Grenzwerte, sogenannte Cut-off Werte, definiert. Untersuchungsproben deren resultierende Ct-Werte kleiner als der jeweilige Cut-off Wert waren, wurden als Real-Time PCR positiv für das jeweilige Ziel-Gen beurteilt. Dementsprechend wurden Proben als Real-Time PCR negativ beurteilt, in denen die gemessenen Ct-Werte oberhalb des Cut-off Wertes lagen. Für suspekta Untersuchungsproben, in denen das Real-Time PCR Ergebnis nicht mit dem Genotyp des verwendeten Referenzstammes übereinstimmte, erfolgte eine weitergehende Untersuchung der Reaktionslösungen. Zur Charakterisierung der gebildeten Amplifikate in falsch-positiven bzw. die Verifizierung des nicht Vorhandenseins eines Amplifikationsproduktes in falsch-negativen Reaktionslösungen wurde zunächst eine Schmelzkurvenanalyse (Kapitel 3.9) durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine Bestätigung der Ergebnisse mit Hilfe einer Endpunkt-PCR (Kapitel 3.8) mit publizierten Primern zur Detektion des entsprechenden Ziel-Gens.

3.6.3.4 Bestimmung der Wiederholpräzision

Um die Präzision des Real-Time PCR Systems beurteilen zu können, wurden die Mess- (*within run*) und die Wiederholpräzision (*run to run*) bestimmt. Um eine möglichst aussagekräftige Beurteilung der Wiederholpräzision zu ermöglichen wird empfohlen, dass entsprechende Positiv-Kontrollen in einer Konzentration nahe des LOD des jeweiligen Assays untersucht werden [99].

Zur Bestimmung der Präzision unter Wiederholbedingungen wurden die eingestellten DNA-Extrakte der Verdünnungsstufe 5a (50 GE/ 5 µl) des jeweiligen Positiv-Kontroll-Stammes an 6 verschiedenen Tagen, vom selben Prüfer, am selben Gerät, im selben Labor analysiert. Zur Überprüfung der Messpräzision wurden die resultierenden Ct-Werte (5 Replikate) der gleichen Verdünnungsstufe (5a, 50 GE/ 5 µl) aus der vorangegangenen Untersuchung der analytischen Sensitivität (Kapitel 3.6.3.1) herangezogen und ausgewertet. Aus den resultierenden Ct-Werten erfolgte die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des 95 % - Konfidenzintervalls.

3.6.4 Evaluierung an klinischen Proben von stationären Patienten

Für die Evaluierung des gesamten Testsystems, welches die Probenahme, die Probenaufarbeitung und die anschließende Real-Time PCR umfasst, ist es nötig die klinische Leistungsfähigkeit im Vergleich zu einem anerkannten Goldstandard zu bestimmen. Für die schnelle Diagnostik der Besiedelung mit MRSA, VRE und MRGN ist das kulturbasierte Screening mittels Selektivmedien der anerkannte Goldstandard. Die durch den Goldstandard detektierte MRE-Besiedelung eines Patienten wird dabei als gesicherte Diagnose definiert und dem molekularbiologischen Testergebnis als Referenz gegenübergestellt. Als Kenngrößen für die Bewertung der klinischen Leistungsfähigkeit dienen dabei die diagnostische Sensitivität und die diagnostische Spezifität. Für die Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden die Screening-Abstriche aus der Kohorte stationäre Patienten zunächst wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben vorbereitet. Die resultierenden Probensuspensionen wurden separat für die molekularbiologische Untersuchung mittels TaqMan® Real-Time PCR (Kapitel 3.4) und für mikrobiologische Untersuchung mittels kulturbasiertem Screening auf Selektivmedien vorbereitet (Kapitel 3.5) und anschließend parallel untersucht.

3.6.4.1 Durchführung und Auswertung der TaqMan® Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Reaktionsansatz und Temperaturprofil durchgeführt. Für die molekularbiologische Untersuchung in der Kohorte stationäre Patienten wurden die in Tabelle 3-12 zusammengefassten Assays verwendet. In einem Real-Time PCR Lauf wurden bis zu 7 Patientenproben und eine Leerprobe parallel untersucht. Nachdem alle Patientenproben untersucht wurden, erfolgte eine übergreifende Auswertung aller Real-Time PCR Daten. Um sicherzustellen, dass die berechneten Ct-Werte zwischen den Proben und den einzelnen PCR Läufen

vergleichbar sind, wurden für jeden Assay die *Thresholds* für das Reporter-Fluoreszenzsignal (ΔR_n) individuell und für alle Läufe übergreifend definiert.

Tabelle 3-12 TaqMan® Assays zur Untersuchung der Kohorte stationäre Patienten

Nr.	Assay	Phänotyp	Nr.	Assay	Phänotyp
1	CTX-M group 1	ESBL	23	IMP-7	CR
2	CTX-M group 2	ESBL	24	IMP-16	CR
3	CTX-M group 9	ESBL	25	NDM	CR
4	CTX-M group 8/25	ESBL	26	OXA-48	CR
5	SHV	ESBL	27	ACICU_00593	AB
6	TEM	ESBL	28	OXA-23	CR
7	OXA-1	ESBL	29	OXA-40	CR
8	VEB	ESBL	30	OXA-72	CR
9	PER-1	ESBL	31	OXA-58	CR
10	PER-2	ESBL	32	vanA1	VR
11	GES	ESBL	33	vanA2	VR
12	ampC	ESBL	34	vanB	VR
13	FOX	ESBL	35	vanC1	VR
14	ACC	ESBL	36	vanC2-C3-1	VR
15	DHA	ESBL	37	vanC2-C3-2	VR
16	MOX/CMY	ESBL	38	mecA	MR
17	BIL/LAT/CMY	ESBL	39	femA SA	SA
18	ACT/MIR	ESBL	40	femA SE	SE
19	KPC	CR	41	mefA	MLS
20	VIM	CR	42	ermB	MLS
21	IMP-1	CR	43	GAPDH	Kontrolle
22	IMP-2	CR	44	exoIPC	Kontrolle

ESBL – β -Lactamase mit erweitertem Wirkspektrum, CR – Carbapenamse-Resistenz, VR – Vancomycin-Resistenz, MR – Methicillin-Resistenz, AB – speziesspezifisch für *Acinetobacter baumannii*, SA – speziesspezifisch für *Staphylococcus aureus*, SE – speziesspezifisch für *Staphylococcus epidermidis*, MLS – Makrolid, Lincosamid und Streptogramin Kreuzresistenz

Der *exoIPC* Assay (Nr. 44) dient der Überwachung einer internen exogenen Amplifikationskontrolle, d.h. eine artifizielle DNA-Sequenz, die dem Probenmaterial in einer definierten Konzentration zugesetzt wurde. Durch die kontinuierliche Detektion der Amplifikationskontrolle in allen Proben, einschließlich der Leerproben, kann eine auftretende PCR-Inhibition erkannt werden. Die resultierenden Ct-Werte in den Leerproben wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Sobald der resultierende Ct-Wert in einer Probe mehr als das 3,3 fache der Standardabweichung vom mittleren Ct-Wert der Leerproben abwich, wurde die Probe zur Aufhebung der Inhibition 1 : 10 verdünnt und erneut untersucht.

Um das molekularbiologische Testergebnis, Resistenzgen vorhanden oder nicht vorhanden, dem Testergebnis der mikrobiologischen Untersuchung gegenüberstellen zu

können, wurden die einzelnen Assays in Gruppen unterteilt, die den phänotypischen Resistenzen entsprechen. Patientenproben, die sowohl *mecA* als auch *femA* SA positiv waren, wurden in der molekularbiologischen Untersuchung als MRSA positiv bewertet. Alle Patientenproben in denen eines der oben genannten ESBL-Gene nachweisbar war, wurden als ESBL-positiv bewertet. Analog wurde die Detektion eines der oben genannten Carbapenemase-Gene mit dem Vorhandensein eines Carbapenem-resistenten Erregers gleichgesetzt. Die Detektion von Varianten der *vanA* und *vanB* Gene in einer Patientenprobe wurde als VRE-positiv bewertet.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung zwischen TaqMan® Real-Time PCR und kulturbasiertem Screening wurden in einer Vierfeldertafel zusammengefasst und die Zahl der richtig-positiven (TP), richtig-negativen (TN), falsch-positiven (FP) und falsch-negativen (FN) Testergebnisse im Vergleich zum Goldstandard berechnet. Die diagnostische Sensitivität (Se), die diagnostische Spezifität (Sp), der positive Vorhersagewert (PPV) sowie der negative Vorhersagewert (NPV) wurden mit folgenden Formeln berechnet.

$$(7) \quad Se [\%] = \frac{TP}{TP + FN} * 100$$

$$(8) \quad Sp [\%] = \frac{TN}{TN + FP} * 100$$

$$(9) \quad PPV [\%] = \frac{TP}{TP + FP} * 100$$

$$(10) \quad NPV [\%] = \frac{TN}{TN + FN} * 100$$

Die Konfidenzintervalle (CI) der ermittelten klinischen Sensitivität und Spezifität wurden gemäß der CLSI E12-A Leitlinie zur Evaluation der Performance von qualitativen diagnostischen Tests berechnet [161].

3.7 TaqMan® Array Cards

3.7.1 Aufbau und Funktion von TaqMan® Array Cards

Die Architektur der 384er TaqMan® Array Cards ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 48 Ziel-Genen in bis zu acht verschiedenen Proben (siehe Abbildung 6). Die erforderlichen TaqMan® Real-Time PCR Primer- und Sondensets sind dabei während der Produktion vom Hersteller aufgebracht worden und befinden sich in getrockneter Form bereits in den einzelnen Kavitäten der Array Card.

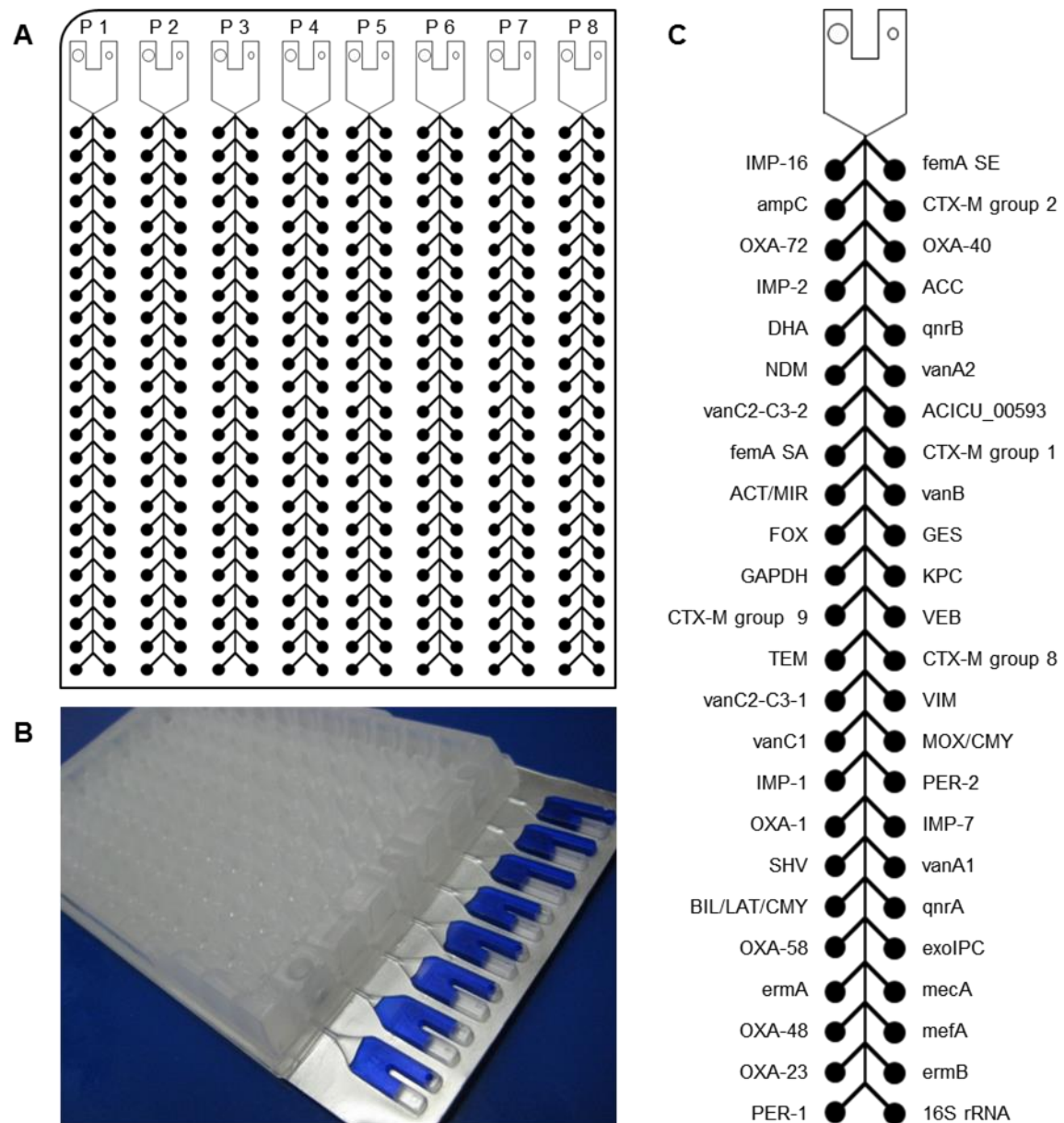


Abbildung 6 Die Mikrofluidik-Architektur der TaqMan® Array Card

Die Darstellung zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten mikrofluiden PCR Karten, die von Thermo Fisher Scientific individuell produziert und vertrieben werden. **(A)** Ausgehend von den acht Probenreservoirs (P 1 bis P 8) werden jeweils 48 einzelne Kavitäten, die mit TaqMan® Primer und Sondensets in getrockneter Form vorbelegt sind, über mikrofluide Kanäle mit Probenlösung und Master Mix beladen. **(B)** Zur Veranschaulichung wurden die Probenreservoirs der TAC mit einer blau gefärbten Lösung beladen. **(C)** Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konfiguration.

Dies bedingt einen wesentlich geringeren Arbeits- und Zeitaufwand und mindert durch den Wegfall von Pipettiervorgängen die Gefahr von Kreuzkontaminationen.

Im Rahmen des MRE Screenings in der Kohorte Flüchtlinge wurde diese Plattform erstmals für die Detektion von bakteriellen Resistenzgenen in diesem Umfang verwendet. In dem hier beschriebenen Setup werden parallel 37 bakterielle Resistenzgene detektiert, die am häufigsten die phänotypische Resistenz in MRSA, VRE, ESBL und CRE determinieren (Tabelle 3-13). Des Weiteren beinhaltet die verwendete TAC drei Assays zur Detektion von Resistenzgenen, die die phänotypische Resistenz von Streptokokken gegenüber Makroliden vermitteln sowie zwei weitere Assays zur Detektion von Chinolon-Resistenzgenen. Zusätzlich sind drei speziesspezifische Assays für die Detektion von *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Acinetobacter baumannii* integriert.

Tabelle 3-13 TaqMan® Assays, die auf TaqMan® Array Cards implementiert wurden.

Nr.	Assay	Phänotyp	Nr.	Assay	Phänotyp
1	16S	Kontrolle	25	OXA-72	CR
2	TEM	ESBL	26	VIM	CR
3	SHV	ESBL	27	IMP-1	CR
4	CTX-M group 1	ESBL	28	IMP-2	CR
5	CTX-M group 2	ESBL	29	IMP-7	CR
6	CTX-M group 8/25	ESBL	30	IMP-16	CR
7	CTX-M group 9	ESBL	31	NDM	CR
8	PER-1	ESBL	32	qnrA	ChR
9	PER-2	ESBL	33	qnrB	ChR
10	GES	ESBL	34	mecA	MR
11	VEB	ESBL	35	mefA	MLS
12	OXA-1	ESBL	36	ermA	MLS
13	ampC	ESBL	37	ermB	MLS
14	ACC	ESBL	38	vanA1	VR
15	ACT/MIR	ESBL	39	vanA2	VR
16	BIL/LAT/CMY	ESBL	40	vanB	VR
17	DHA	ESBL	41	vanC1	VR
18	FOX	ESBL	42	vanC2-C3-1	VR
19	MOX/CMY	ESBL	43	vanC2-C3-2	VR
20	KPC	CR	44	ACICU_00593	AB
21	OXA-48	CR	45	femA SA	SA
22	OXA-23	CR	46	femA SE	SE
23	OXA-40	CR	47	GAPDH	Kontrolle
24	OXA-58	CR	48	exoIPC	Kontrolle

ESBL – β -Lactamase mit erweitertem Wirkspektrum, CR – Carbapenamse-Resistenz, ChR – Chinolon-Resistenz, VR – Vancomycin-Resistenz, MR – Methicillin-Resistenz, AB – speziesspezifisch für *Acinetobacter baumannii*, SA – speziesspezifisch für *Staphylococcus aureus*, SE – speziesspezifisch für *Staphylococcus epidermidis*, MLS – Makrolid, Lincosamid und Streptogramin Kreuzresistenz

Um die Analysequalität zu sichern, wurden eine exogene und zwei endogene interne Kontrollassays implementiert. Die Überwachung einer adäquaten Bakteriolyse erfolgt dabei durch die Detektion des humanen GAPDH Gens und des bakteriellen 16S rRNA Gens (Housekeeping Gene). Der exoIPC Assay dient dabei wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben als exogene interne Amplifikationskontrolle zur Erkennung von PCR Inhibition.

3.7.2 Reaktionsansätze und Temperaturprofile für die Verwendung von TaqMan® Array Cards

Für die Real-Time PCR Untersuchung mittels TaqMan® Array Cards (TAC) wurde ebenfalls der gebrauchsfertige TaqMan® Fast Universal Master Mix verwendet. Da die Zugabe der entsprechenden Assays entfällt, wurden lediglich Probenspezifische Reaktionsansätze (Tabelle 3-14) erstellt. Für die Herstellung des Reaktionsansatzes wurden zunächst 54,5 µl des TaqMan® Fast Universal Master Mix in jedes Gefäß eines 8er PCR-Streifens pipettiert, jeweils mit 1 µl Template-DNA (20X) der exogenen, internen Positiv-Kontrolle versetzt und anschließend gemischt. Durch Zugabe von jeweils 54,5 µl der zu untersuchenden Probe wurde ein Gesamtvolumen von 110 µl erreicht. Die Proben-Reservoirs einer TAC wurden anschließend mit jeweils 100 µl des probespezifischen Reaktionsansatzes beschickt. Um das aufgetragene Probenvolumen auf die einzelnen Kavitäten der TAC zu verteilen, wurden die Karten zweimal für 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Abschließend wurden die befüllten Kavitäten mit einem TaqMan® Array Microfluidic Card Sealer verschlossen und die leeren Proben-Reservoirs mit einer Schere abgeschnitten.

Tabelle 3-14 Reaktionsansatz für Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards (TAC)

Komponente	Volumen für 1 Proben-Reservoir	+ 10 % Überschuss
TaqMan® Fast Universal Master Mix (2X)	49,5	54,5
Probenvolumen	49,5	54,5
exoIPC DNA (20X)	1,0	1,0
Gesamtvolumen	100,0	110,0

Die verschlossenen TaqMan® Array Cards wurden anschließend mit einem ViiA™ 7 Real-Time PCR System untersucht. In der zugehörigen ViiA 7™ RUO Software wurde dazu der entsprechende Array Card – Block gewählt und die Einstellungen für die Verwendung für TaqMan® Reagenzien in einem *Fast* – Protokoll vorgenommen. Das verwendete Temperaturprofil (Abbildung 7) startet mit einer initialen 20-sekündigen Denaturierungsphase bei 95 °C. Dabei werden vorliegende doppelsträngige DNA-Fragmente und etwaige Primer-Dimere vollständig voneinander getrennt und die verwendete Hot-Start Polymerase wird aktiviert. Die anschließende Amplifikation findet in 45 Zyklen statt, die jeweils mit einer 1-sekündigen Denaturierung bei 95 °C beginnen und mit einem 20-sekündigen kombinierten Annealing/Extensions-Schritt bei 60 °C

(Zwei-Schritt-PCR) enden. Die Echtzeitmessung der Fluoreszenzänderung erfolgte jeweils während der Annealing/Extensions-Phase.

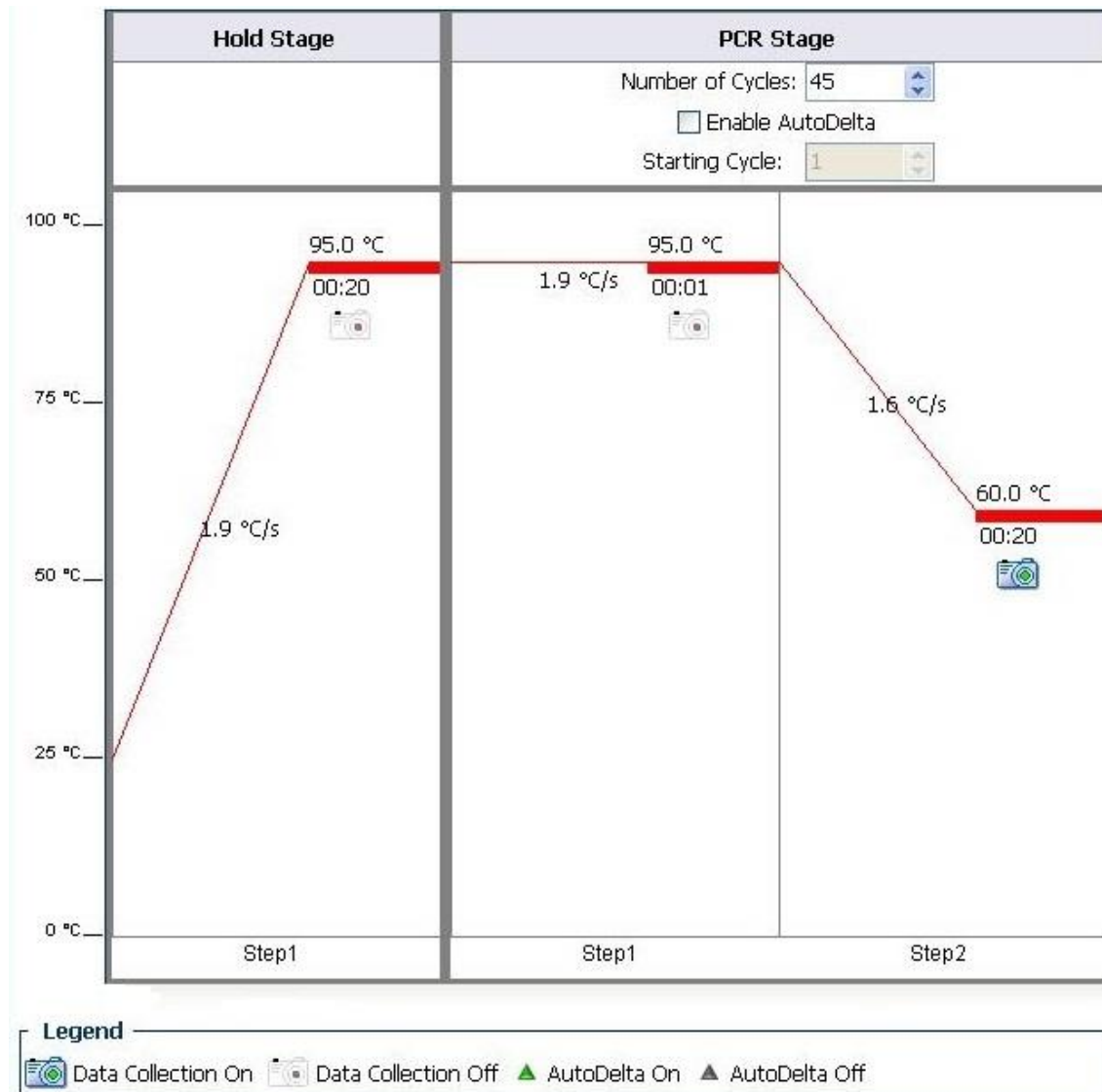


Abbildung 7 Temperaturprofil II für die Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards
ViiA™ 7 Real-Time PCR System, ViiA™ 7 RUO Software

3.7.3 Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards

Um die technische Leistungsfähigkeit des Real-Time PCR Systems nach Integration der TaqMan® Array Cards beurteilen zu können, wurde die analytische Sensitivität der einzelnen auf der Karte befindlichen Assays mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit abnehmender Genomäquivalent-Konzentration der verschiedenen Ziel-Gen-positiven Referenzstämmen bestimmt. Die analytische Spezifität der integrierten Assays wurde im Rahmen der Etablierung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen (Kapitel 3.6.3) bereits untersucht und ist aufgrund der gleichen zugrundeliegenden Primer- und Sondensets auf die Etablierung der TACs übertragbar. Die verwendeten Referenzstämmen und deren Resistenz-Genotyp sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Produktionsbedingte Fehler wie z.B. eine DNA-Kontamination oder eine fehlerhafte Beladung der Kavitäten könnten spätere Testergebnisse verfälschen. Um falsch-positive

oder falsch-negative Testergebnisse auszuschließen, wurden die verwendeten TACs einer Produktionscharge initial mit Nuklease-freiem Wasser als Negativ-Kontrolle (NTC) und einer Positiv-Probe, die die gepoolte DNA von Resistenzgen-positiven Referenzstämmen in einer definierten Konzentration von 10.000 GE pro 100 µl Probenansatz enthält, getestet.

3.7.3.1 Herstellung von Verdünnungsreihen zur Bestimmung der analytischen Sensitivität

Aufgrund der Architektur der verwendeten TACs können bis zu 8 verschiedene Proben parallel untersucht werden. Dies bedingt, dass nicht jeder Assays separat mit seiner spezifischen Referenz-DNA in sinkender Konzentration getestet werden kann. Um trotzdem die analytische Sensitivität aller auf der TAC integrierten Assays bestimmen zu können, wurde eine gepoolte Positiv-Kontrolle hergestellt, die die DNA aller benötigten Referenzstämmen in definierter Konzentration enthält. Dabei ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Referenzstämmen Kombinationen von Resistenzgenen tragen, wodurch sich die Kopienzahl dieser Resistenzgene aufaddiert. Um diesen additiven Effekt zu vermeiden, wurden zwei verschiedene Positiv-Kontrollen (PC I und PC II) hergestellt, die jeweils nur nicht-interferierende Referenzstämmen enthalten. Dazu wurde aus den quantifizierten DNA-Extrakten eines jeden Referenzstammes ein Volumen entnommen, das 2.000.000 GE enthält und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert. Das resultierende DNA-Gemisch wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 µl und eine Endkonzentration von 4000 GE/µl je Stamm ergänzt. Die gepoolten Positiv-Kontrollen wurden anschließend in einer 7-stufigen Verdünnungsreihe 1:4 verdünnt. Alle Verdünnungsstufen und Nuklease-freies Wasser als Negativ-Kontrolle wurden entsprechend Kapitel 3.7.2 vorbereitet und jeweils 100 µl der resultierenden Reaktionsansätze in die Probenreservoirs 1 bis 8 der TAC pipettiert. Bei einem Reaktionsvolumen von 1 µl je Kavität umfasst der untersuchte Konzentrationsbereich somit 2.000 bis 0,5 GE. Beide Positiv-Kontrollen (PC I und PC II) wurden separat auf zwei verschiedenen TACs untersucht.

Tabelle 3-15 DNA-Verdünnungsreihen zur Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards

Verdünnungsstufe	Kopienzahl [GE/µl]	Probevolumen für TAC [µl]	Kopienzahl im Reaktionsansatz [GE/µl]
1	4.080,0	50	2.040
2	1.020,0	50	510
3	255,0	50	128
4	63,8	50	32
5	16,0	50	8
6	4,0	50	2
7	1,0	50	0,5

Der resultierende Ct-Wert einer Verdünnungsstufe wurden in einem XY – Diagramm gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden GE-Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurde anschließend eine lineare Regression durchgeführt und der Pearson-Korrelationskoeffizient der resultierenden Regressionsgeraden sowie die Amplifikations-Effizienz der Real-Time PCR berechnet. Da die einzelnen Punkte der Kalibriergeraden jeweils auf Einzelmesswerte beruhen, war die Anwendung einer Probit-Analyse zur Bestimmung der Nachweisgrenze ($LOD_{95\%}$) nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das untere Ende des linearen Bereichs zur Abschätzung der analytischen Sensitivität herangezogen. Dazu wurde zunächst die Geradengleichung der initialen Kalibriergeraden über den gesamten Konzentrationsbereich (Verdünnungsstufe 1 bis 7) ermittelt. Anschließend wurde der Konzentrationsbereich sukzessive um die jeweils niedrigste Stufe verkleinert und jeweils die Geradengleichung berechnet, sodass vier weitere Geradengleichungen für die Konzentrationsbereiche Stufe 7 bis Stufe 2, Stufe 7 bis Stufe 3 und Stufe 7 bis Stufe 4 erhalten wurden. Durch einsetzen der zugrundeliegenden Ct-Werte in die verschiedenen Geradengleichungen wurde die Anzahl der gemessenen GE pro 100 μ l bestimmt. Für jede Geradengleichung wurde anschließend die Anzahl der gemessenen GE der Anzahl der eingebrachten GE gegenübergestellt und die prozentualen Abweichungen der Messwerte ($GE_{\text{berechnet}}$) von den jeweiligen Erwartungswerten ($GE_{\text{eingebracht}}$) auf jeder Verdünnungsstufe berechnet. Die prozentualen Abweichungen, die auf vier verschiedene Geradengleichungen basieren, wurden abschließend mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests verglichen. Wenn die prozentuale Abweichung durch Weglassen der jeweils letzten Verdünnungsstufe signifikant verringert werden konnte, dann wurde die GE-Konzentration der nächsthöheren Stufe als Nachweisgrenze festgelegt.

3.7.4 Anwendung für das Screening auf multiresistente Erreger in der Kohorte Flüchtlinge

Das vorgestellte Real-Time PCR System und die Implementierung auf TaqMan® Array Cards ermöglicht die schnelle und umfassende Untersuchung von bakteriellen Resistenzgenen in klinischen Untersuchungsproben. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden 505 Abstrich-Proben und 360 korrespondierende Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge (Kapitel 3.1.2) auf das Vorhandensein von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzgenen untersucht. Alle Untersuchungsproben wurden entsprechend Kapitel 3.4 für die molekularbiologische Untersuchung vorbereitet und anschließend mittels TaqMan® Array Cards entsprechend Kapitel 3.7.2 analysiert. Nachdem alle Proben untersucht wurden erfolgte die Auswertung der Real-Time PCR Daten für beide Probenarten separat. Um sicherzustellen, dass die berechneten Ct-Werte zwischen den Proben und den einzelnen PCR Läufen vergleichbar sind, wurden für jeden Assay die *Thresholds* für das Reporter-Fluoreszenzsignal (ΔR_n) individuell und für alle Läufe übergreifend definiert. Die resultierenden Ct-Werte wurden anschließend mit den im vorhergehenden Kapitel bestimmten Geradengleichungen in Genomäquivalente (GE) umgerechnet. Um die quantitative Zusammensetzung der

einzelnen Resistenzgene in den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurden die berechneten Genomäquivalente der einzelnen Resistenzgene mit Hilfe des 16S rRNA Assays auf die Gesamtzahl vorhandener Bakterien-Genomäquivalente normalisiert.

Eine Berechnung der absoluten Häufigkeit und der Prävalenz einzelner Resistenzgene in der untersuchten Kohorte ist nur möglich, wenn die generierten Real-Time PCR Daten in einer qualitativen Aussage münden, Resistenzgen vorhanden oder Resistenzgen nicht vorhanden. Um die kontinuierliche Ergebnisgröße in Form der berechneten Genomäquivalente in eine qualitative Aussage überführen zu können, wurden die im vorhergehenden Kapitel bestimmten Nachweisgrenzen (LODs) als Cut-off-Werte für die einzelnen Assays festgelegt. Dementsprechend wurden alle Proben, mit einer GE-Zahl oberhalb des festgelegten Cut-off-Wertes als Resistenzgen-positiv und alle Proben mit einer GE-Zahl unterhalb des festgelegten Cut-offs als Resistenzgen-negativ beurteilt.

Der integrierte exoIPC Assay dient, analog zur Untersuchung in der Kohorte stationäre Patienten, der Überwachung einer internen exogenen Amplifikationskontrolle, die dem Probenmaterial in einer definierten Konzentration zugesetzt wurde.

3.8 Endpunkt PCR zur Verifizierung der Real-Time PCR

Für suspekta DNA-Proben, die bei der Untersuchung der analytischen Spezifität als falsch-positiv oder falsch-negativ bewertet wurden, erfolgte eine Bestätigung der Ergebnisse durch eine zusätzliche Endpunkt PCR mit bereits veröffentlichten Primern, die ebenfalls das entsprechende Ziel-Gen detektieren.

Tabelle 3-16 Primer zur Amplifikation verschiedener Metallo- β -Lactamase-Gene

Ziel-Gen	Primername	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge (bp)	Referenz
<i>bla</i> VIM	VIM-Det-fwd	AGTGGTGAGTATCCGACAG	261	[162]
	VIM-Det-rev	ATGAAAGTGCGTGGAGAC		
	VIM-Seq1-fwd	TTATGGAGCAGCAACGATGT	920	[163]
	VIM-Seq1-rev	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA		
	VIM-Seq2-fwd	AAAGTTATGCCGCACTCACC	865	[163]
	VIM-Seq2-rev	TGCAACTTCATGTTATGCCG		
<i>bla</i> IMP	IMP-Det-fwd	CATGGTTTTGGTGGTTCTTGT	488	[164]
	IMP-Det-rev	ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
	IMP-Seq1-fwd	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	740	[163]
	IMP-Seq1-rev	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG		
	IMP-Seq2-fwd	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	737	[163]
	IMP-Seq2-rev	TAGTTACTTGGCTGTGATGG		

Als Ausgangsmaterial dienten erneut die jeweiligen quantifizierten DNA-Extrakte. Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem Standard Reaktionsansatz, wobei die Temperaturprofile an die jeweiligen Primer angepasst wurden und in Abhängigkeit vom untersuchten Gen variieren. Alle PCR-Läufe wurden mit einer entsprechenden Positiv-Kontrolle und einer Negativ-Kontrolle mit einem GeneAmp 9700 PCR System durchgeführt.

Tabelle 3-17 Standard Reaktionsansatz für Endpunkt PCR

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
Dream Taq green buffer	10 X	2,5 µl	1 X
dNTP - Mischung	10 mM	0,5 µl	200 nM
Primer fwd	10 mM	1,0 µl	400 nM
Primer rev	10 mM	1,0 µl	400 nM
Dream Taq	5 U/µl	0,2 µl	1,0 U
DNA-Probe	-	1,0 µl	-
Wasser, Nuklease-frei	-	18,8 µl	-
Gesamtvolumen	-	25,0 µl	-

Die Endpunkt PCR wurde für das IMP-Det Primer-Set mit dem Temperaturprofil A und für das VIM-Det Primer-Set mit dem Temperaturprofil B durchgeführt. Die Primer-Sets IMP-Seq1 und VIM-Seq2 wurden beide in Kombination mit dem Temperaturprofil C und die Primer-Sets IMP-Seq2 und VIM-Seq1 in Kombination mit dem Temperaturprofil D verwendet.

Tabelle 3-18 Temperaturprofile (A, B) für die Endpunkt PCR zur Detektion von *bla* VIM und *bla* IMP

	Profil A		Profil B	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	20 sek	95 °C	20 sek
Annealing	30 Zyklen 50 °C	20 sek	60 °C	20 sek
Elongation	72 °C	60 sek	72 °C	60 sek
Finale Elongation	72 °C	2 min	72 °C	2 min

Tabelle 3-19 Temperaturprofile (C, D) für die Endpunkt PCR zur Detektion von *bla* VIM und *bla* IMP

	Profil C		Profil D	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	20 sek	95 °C	20 sek
Annealing	35 Zyklen 60 °C	20 sek	55 °C	20 sek
Elongation	72 °C	35 sek	72 °C	20 sek
Finale Elongation	72 °C	2 min	72 °C	2 min

Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agar-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und untersucht. Die Konzentration der Agarose lag, je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente, bei 1 bis 2 % (w/v). Die entsprechende Menge Agarose wurde vollständig in 1 X TAE Puffer gelöst und anschließend mit SYBR Safe Gel Stain versetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit 1/6 (v/v) Gel-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte in 0,5 X TAE Puffer bei einer konstanten Spannung von 110 V. Als Längenstandard wurde jeweils der Gene Ruler 100 bp verwendet. Die Auswertung der fertigen Gele erfolgte mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS Bio Rad (Hercules, USA).

3.9 Schmelzkurvenanalyse

Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse können die Amplifikationsprodukte einer Real-Time PCR analysiert und charakterisiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I ist ein interkalierender Farbstoff der doppelsträngige DNA unspezifisch markiert. Während einer SYBR Green Real-Time PCR bindet der Farbstoff in der Annealing-Phase an alle doppelsträngigen Amplifikationsprodukte, wodurch dieser nach Anregung messbar fluoresziert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur gebildeten Amplifikatmenge. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird nun nach Beendigung der PCR ein ansteigender Temperaturgradient gefahren um die vorliegenden doppelsträngigen PCR-Produkte zu denaturieren. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff wird dabei freigesetzt und die Fluoreszenzintensität nimmt entsprechend ab. Primer-Dimere und andere PCR Artefakte sind in der Regel kurzketziger und haben dementsprechend niedrigere Schmelztemperaturen als die spezifischen Amplifikationsprodukte, wodurch eine Unterscheidung in der Schmelzkurve möglich wird. Da bei einer TaqMan[®] Real-Time PCR die Fluoreszenz auf der Hydrolyse der verwendeten Sonden beruht, kann mit diesem System keine nachgeschaltete Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Um trotzdem eine Schmelzkurvenanalyse durchführen zu können, wurde das gesamte Reaktionsvolumen (10 µl) der abgelaufenen TaqMan[®] PCR entnommen und mit 10 µl SYBR Select Master Mix versetzt. Anschließend erfolgte die Schmelzkurvenanalyse im ViiA[™] 7 System ohne erneute PCR Amplifikation.

3.10 16S rRNA-Gen-Sequenzierung zur Mikrobiom-Analyse

Die Sequenzierung bestimmter Fragmente des bakteriellen 16S rRNA-Gens ermöglicht es kulturunabhängige Aussagen über die Art und die Menge der in einer Probe enthaltenen Bakterien zu treffen. Eine derartige Sequenzanalyse wird bereits in der täglichen mikrobiologischen Routinediagnostik angewendet und besitzt vor allem Vorteile bei der Identifizierung von anspruchsvollen, anaeroben oder extrem langsam wachsenden Spezies, die durch phänotypische oder biochemische Methoden nicht oder nur schwer zu identifizieren sind. Die zugrundeliegenden rRNA-Gene kodieren die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA), die in unterschiedlich großen Untereinheiten und in einem Komplex mit bestimmten Proteinen das Ribosom sowohl in allen eukaryotischen als auch in allen prokaryotischen Zellen bilden. Die zu den Prokaryoten zählenden Bakterien und Archaeen besitzen im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen sogenannte 70S Ribosomen, die aus einer 50S und einer 30S Untereinheit zusammengesetzt sind³. Die 30S Untereinheit wird weiter durch verschiedene Proteine und einem 16S rRNA-Anteil gebildet. Die 16S rRNA kodierenden Gene besitzen sowohl hochkonservierte und somit in allen Bakterien gleiche Genabschnitte als auch insgesamt 9 Bereiche (V1 - V9) die sich durch eine hohe Sequenzvariabilität auszeichnen und sich somit von Spezies zu Spezies unterscheiden [165]. Mit Hilfe von universellen Primern, die in den konservierten Regionen binden und gleichzeitig variable, speziesspezifische Regionen umfassen können mittels PCR Amplifikate gebildet und anschließend sequenziert werden. Die resultierenden Sequenzen werden dann mit Gen-Datenbanken abgeglichen und letztendlich anhand des Grades von Sequenzhomologien verschiedenen *operational taxonomic units* (OTU) zugeordnet, die eine sequenzbasierte Taxonomie der vorhandenen Bakterien zulassen.

Ausgehend von der extrahierten DNA wurden alle Arbeiten zur 16S rRNA-Gen-Analyse von der technischen Assistenz Karina Greve und Melanie Vollstedt unter Anleitung von Dr. Ateequr Rehman am Institut für klinische Molekularbiologie durchgeführt. Die Analyse umfasste die Amplifikation der variablen Regionen V3 – V4 des 16S rRNA-Gens mit Hilfe von *Barcode*-Primern, die der Kennzeichnung von individuellen Proben dienen. Die Amplifikate einer jeden Probe wurden zu gleichen Teilen gepooled und anschließend mit Hilfe einer Illumina MiSeq Plattform von beiden Seiten (*paired-end reads*) sequenziert [166]. Die erhaltenen Sequenzierungsdaten wurden anschließend mit Hilfe der Bioinformatiksoftware Mothur (Version 1.38.0) kontrolliert, bearbeitet und ausgewertet [167]. Die taxonomische Zuordnung der erhaltenen Gensequenzen erfolgte anhand der *Greengenes* 16S rRNA-Gen-Datenbank [168]. Dabei wurden Sequenz-Reads mit einer mindestens 97%igen Sequenzübereinstimmung in einer OTU zusammengefasst. Die Kategorisierung der verschiedenen OTUs in pathogene oder apathogene Spezies erfolgte anhand einschlägiger Literatur [1,48].

³ Die Masse von Ribosomen wird durch ihr Sedimentationsverhalten charakterisiert, das in Svedberg-Einheiten (S) angegeben wird.

4 Ergebnisse

Das übergeordnete Ziel dieser Forschungsarbeit bestand in der Entwicklung und Etablierung eines schnellen und flexiblen molekularen Testsystems zur Detektion von bakteriellen Genen, die eine Vielzahl klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen vermitteln. Dabei wurden alle Bereiche, von der Konzeptionierung über die Validierung bis hin zur Anwendung des Testsystems, beleuchtet.

Im Rahmen der Konzeptionierung wurden Ziel-Gene mit klinischer Relevanz ausgewählt und entsprechende TaqMan® Real-Time PCR Primer und Sondensets entwickelt sowie ein geeignetes Probenahmesystem erarbeitet (Kapitel 4.1). Die Etablierung der TaqMan® Real-Time PCR erfolgte stufenweise, wobei in einem ersten Schritt die analytische Validierung der Einzelnachweise mit Hilfe von Referenzstämmen erfolgte (Kapitel 4.2.1). Die daraus resultierenden technischen Merkmale Sensitivität und Spezifität, Linearität und Nachweisgrenze, sowie die Wiederholpräzision bildeten die Grundlage für den anschließenden Nachweis der klinischen Leistungsfähigkeit durch die diagnostische Validierung (Kapitel 4.2.2). Hierbei wurde das Zusammenspiel zwischen Probenahmesystem und Real-Time PCR im Vergleich zum kulturbasierten Screening als Goldstandard belegt. Abschließend werden im Kapitel 4.3 die Ergebnisse der Anwendung in einem klinischen Forschungsvorhaben vorgestellt, das die Prävalenz von Antibiotikaresistenzgenen und multiresistenten Bakterien in der Kohorte Flüchtlinge und in einer Kontrollkohorte untersucht.

4.1 Etablierung der Probenahme und Probenvorbereitung

Die Kombination aus Probenahme und Probenaufarbeitung ist Grundlage einer jeden Untersuchungsmethode und hat erheblichen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit eines diagnostischen Tests. Um eine geeignete Methode etablieren zu können, wurden die verschiedenen Stufen bis hin zu einer Real-Time PCR kompatiblen Probenlösung beleuchtet. Die Arbeiten zur Bestimmung der Extraktionseffizienz (siehe Kapitel 4.1.1) dienten dem Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden unter Berücksichtigung des Material- und Zeitaufwandes sowie der PCR-Inhibition durch Bestandteile des Probenahmesystems (siehe Kapitel 4.1.2). Da die Übertragung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen auf das TaqMan® Array Card Format eine Reduktion des Reaktionsvolumens von 10 µl auf 1 µl zur Folge hat, war zu erwarten, dass die analytische Sensitivität um eine \log_{10} -Stufe abnimmt. Um diesen Aspekt aufzugreifen, wurde die erarbeitete Methode für die Verwendung von TaqMan® Array Cards angepasst (siehe Kapitel 4.1.3).

4.1.1 Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienz unter Berücksichtigung des Arbeits- und Zeitaufwandes

Um verschiedene Probenmaterialien einer Real-Time PCR Untersuchung zugänglich zu machen, ist es nötig, die aufgenommenen Bakterien vollständig zu lysieren und die gesamte DNA möglichst unbeschadet freizusetzen. Zu Vergleichszwecken wurden daher vier verschiedene DNA-Extraktionsmethoden anhand eines gramnegativen Modellstamms *E. coli* NRZ-02721 und eines grampositiven Modellstamms *S. aureus* ATCC 43300 durchgeführt und die freigesetzte bakterielle DNA anschließend mit Hilfe einer Real-Time PCR zur Detektion des bakteriellen 16S rRNA-Gens quantifiziert. Um die Extraktionseffizienz auch in Abhängigkeit von der Bakterienzahl in der Probe darstellen zu können, wurden die Extraktionen mit einer Ausgangskeimzahl von 10^6 KBE, 10^4 KBE und 10^2 KBE durchgeführt. Die Mechanische Lyse wurde ausschließlich mit der höchsten Ausgangskeimzahl (10^6 KBE) in den Vergleich einbezogen.

Für den grampositiven Modellstamm konnten bei einer Ausgangskeimzahl von 10^6 KBE mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits signifikant mehr Genomäquivalente freigesetzt und detektiert werden, als mit den Vergleichsmethoden (Abbildung 8 A; QIAamp Kit: $1,69 * 10^7 \pm 0,18 * 10^7$ GE; thermische Lyse: $2,68 * 10^5 \pm 1,42 * 10^5$ GE; enzymatische Lyse: $3,86 * 10^6 \pm 0,30 * 10^6$ GE; mechanische Lyse: $7,05 * 10^5 \pm 2,98 * 10^5$ GE). Ausgehend von den geringeren Ausgangskeimzahlen sind jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Methoden erkennbar. Da für die QIAamp Kit Extraktion mit einer Ausgangskeimzahl von 10^2 lediglich ein Einzelwert zur Verfügung steht, ist eine Aussage zur Signifikanz nicht möglich. Dennoch scheint das Extraktionskit sowohl der thermischen als auch der enzymatischen Lyse unterlegen zu sein ($2,07 * 10^2$ GE vs. $2,08 * 10^4 \pm 0,23 * 10^4$ GE vs. $1,59 * 10^4 \pm 0,05 * 10^4$ GE).

Die Resultate der vergleichenden Untersuchung anhand des gramnegativen Modellstammes zeigen, dass für die höchste Ausgangskeimzahl von 10^6 KBE die thermische Lyse signifikant mehr Genomäquivalente freisetzt, als das QIAamp Kit und die enzymatische Lysemethode. Die mechanische Lysemethode ist dabei mit der enzymatischen Lysemethode vergleichbar (Abbildung 8 B; $3,70 * 10^7 \pm 0,28 * 10^7$ GE vs. $1,25 * 10^7 \pm 0,09 * 10^7$ GE vs. $1,48 * 10^7 \pm 0,12 * 10^7$ GE vs. $2,29 * 10^7 \pm 0,49 * 10^7$ GE). Bei einer Ausgangskeimzahl von 10^4 KBE ist hingegen die enzymatische Lyse der thermischen Lyse leicht überlegen ($1,10 * 10^5 \pm 0,22 * 10^5$ GE vs. $2,37 * 10^4 \pm 0,92 * 10^4$ GE). Für die Extraktion von sowohl 10^4 KBE als auch 10^2 KBE mittels QIAamp Kit konnten jeweils nur Einzelwerte in die Auswertung einbezogen werden und waren somit einer statistischen Analyse nicht zugänglich. Der Vergleich anhand der absoluten Werte legt jedoch nahe, dass die QIAamp Kit Methode bei einer Ausgangskeimzahl von 10^4 KBE eine vergleichbare Zahl von GE freisetzt und bei einer Ausgangskeimzahl von 10^2 KBE den anderen Methoden unterlegen ist.

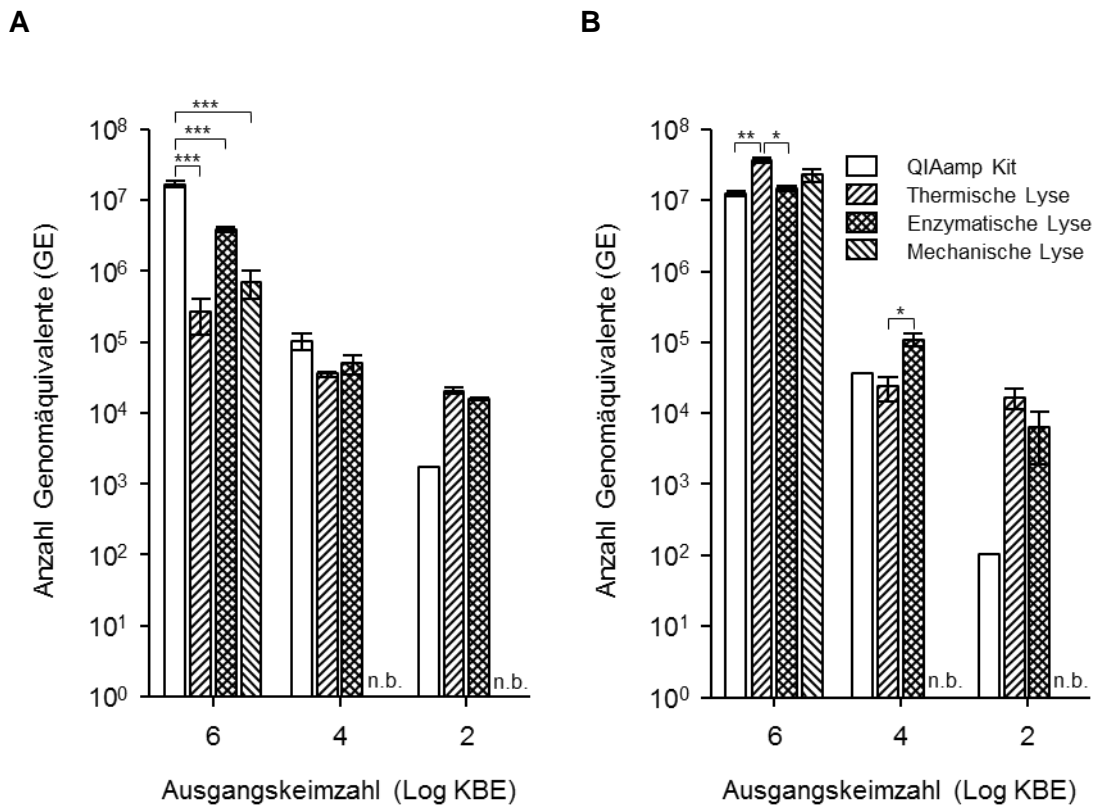


Abbildung 8 Vergleich von vier Extraktionsmethoden bei sinkender Ausgangskeimzahl.

Dargestellt ist die mittlere Anzahl der detektierten Genomäquivalente (GE) bestimmt durch die Real-Time PCR-basierte Quantifizierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens. **A**, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 wurde als Modellstamm für grampositive Bakterien in abnehmender Ausgangskeimzahl (KBE) eingesetzt. **B**, *Escherichia Coli* NRZ-02721 wurde als Modellstamm für gramnegative Bakterien analog untersucht und dargestellt. Die Standardabweichungen der Mehrfachbestimmungen ($n = 2$) sind als Fehlerindikatoren dargestellt. Das Signifikanz-Niveau (p-Wert) wurde mittels einfaktorier ANOVA und Bonferroni-Post-Test bestimmt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). n.b.= nicht bestimmt.

Hinsichtlich des Arbeits- und Zeitaufwandes unterscheiden sich die einzelnen Methoden erheblich (Tabelle 4-1). Im Rahmen aller Extraktionsmethoden wurden Pipetten, Vortexer, Tischzentrifugen und Eppendorf ThermoMixer verwendet. Zusätzliche Geräte und Kits waren sowohl für die QIAamp Kit Extraktion als auch für die mechanische Lyse notwendig. Die mechanische Lyse ist mit insgesamt 3 Arbeitsschritten und einer Gesamtzeit von 5 min allen anderen Methoden deutlich überlegen. Den größten Arbeits- und Zeitaufwand birgt die DNA-Extraktion mittels QIAamp DNA Mini Kit.

Tabelle 4-1 Arbeits- und Zeitaufwand verschiedener DNA-Extraktionsmethoden

Methode	Arbeits-schritte	Zeit [min]		zusätzliche Geräte ¹⁾
		Inkubation	Gesamt ²⁾	
QIAamp Kit	19	64	120	QIAamp Kit, Zentrifuge
thermische Lyse	5	10	15	-
enzymatische Lyse	10	83	95	-
mechanische Lyse ³⁾	3	1,5	5	Precellys Kit, MagnaLyser

¹⁾ Bei den zusätzlichen Geräten handelt es sich um Kits oder Anlagen, die ausschließlich in den betreffenden Methoden verwendet werden mussten. ²⁾ Die gemessene Gesamtzeit basiert auf der einmaligen, parallelen Extraktion von 14 Proben je Methode. ³⁾ Die Inkubationszeit entspricht hier der Zeit für die mechanische Lyse im MagnaLyser.

4.1.2 PCR-Inhibition durch Bestandteile des Probenahmesystems

Im vorhergehenden Kapitel 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass die thermische Lysemethode eine vergleichsweise schnelle, unkomplizierte und somit effiziente Extraktion bakterieller DNA ermöglicht. Sie diene daher in den nachfolgenden Untersuchungen als DNA-Extraktionsmethode der Wahl.

Um den inhibitorischen Effekt einzelner Komponenten einer Probe untersuchen zu können, wurden unterschiedlich zusammengesetzte Matrices, wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben, vergleichend untersucht. Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung des inhibitorischen Einflusses auf den exoIPC Real-Time PCR Assays durch verschiedene Probenarten im Vergleich zu Nuklease-freiem Wasser. Die Inhibitionsrate und der delta Ct-Wert eines Probentyps basieren auf vier Einzelproben, die jeweils in Dreifachbestimmung untersucht wurden ($n = 12$). Zusätzlich wurden insgesamt 3 sterile Tupfer in jeweils 3 Replikaten ($n = 9$) sowie der Lysepuffer und das Nuklease-freie Wasser als Vergleichslösung in 8 Replikaten untersucht ($n = 8$).

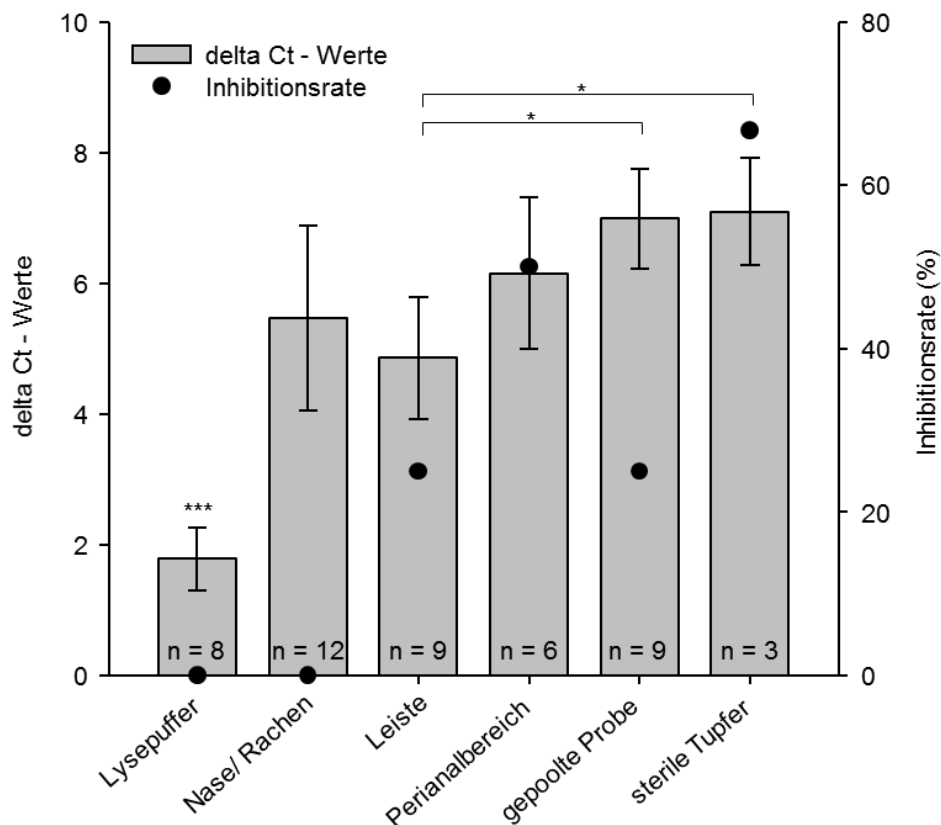


Abbildung 9 Inhibition des exoIPC Assays durch Bestandteile der Probenmatrix

Die dargestellten delta Ct-Werte der einzelnen Probenarten leiten sich aus den gemittelten Differenzen der Ct-Werte der Probenarten und dem mittleren Ct-Wert des exoIPC Assays in Nuklease-freiem Wasser als Vergleichslösung ab. Die Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichungen der delta Ct-Werte zwischen den Einzelreaktionen eines Probentyps dar. Die Inhibitionsrate stellt den Anteil der Replikate in Prozent dar, in denen die Amplifikation durch komplette Inhibition unterbunden wurde. Das Signifikanz-Niveau (p-Wert) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Bonferroni-Post-Test bestimmt und bezieht sich ausschließlich auf den Vergleich von delta Ct-Werten unterschiedlicher Probenarten (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

Die Auswertung der entsprechenden Inhibitionsraten zeigt, dass in 6 von 9 Replikaten (66 %) aller sterile Tupfer Proben keine Amplifikation bzw. Ct-Werte von über 40 Zyklen

zu beobachten waren. Demgegenüber betrug die Inhibitionsrate für den Lysepuffer 0 % (0/8), für Nasenabstriche 0 % (0/12), für Leistenabstriche 25 % (3/12), für Perianalabstriche 50 % (6/12) und für die gepoolte Probe 25 % (3/12).

Replikate, die Ct-Werte < 40 Zyklen zeigten, wurden zur Berechnung des delta Ct-Wertes verwendet und weitergehend analysiert. Der reine Lysepuffer verursacht eine Verschiebung des Ct-Wertes um $1,78 \pm 0,481$ Zyklen und zeigt somit den geringsten inhibitorischen Einfluss auf die Real-Time PCR im Vergleich zu Nuklease-freiem Wasser. Alle anderen Probenmatrices verursachen signifikant höhere delta Ct-Werte, was auf eine stärkere Inhibition durch andere Probenkomponenten neben dem zugrundeliegenden Lysepuffer schließen lässt. Die auf sterile Tupfer basierenden Probelösungen bewirken eine Verschiebung des Ct-Wertes um $7,09 \pm 0,824$ Zyklen und verursachen somit die stärkste PCR-Inhibition, wobei sich, bis auf die Leistenabstriche, keine signifikanten Unterschiede zu den delta Ct-Werten derjenigen Proben ergeben, in denen ebenfalls Tupfer verwendet wurden.

Die Resultate dieser Untersuchung zeigen, dass einzelne Bestandteile des Probenahmesystems die nachgelagerte Real-Time PCR Untersuchung in einem weitaus stärkeren Maße beeinflussen, als der zugrundeliegende Lysepuffer oder das anhaftende Biomaterial des Patienten. Mit einer Inhibitionsrate von 66 % und einer Verschiebung des Ct-Wertes um mehr als 7 Zyklen zeigen die Proben, die allein vom verwendeten sterilen Transystem™ Abstrichtupfer stammen, den größten inhibitorischen Einfluss auf die Real-Time PCR. Es ist anzunehmen, dass das flüssige Stuart Erhaltungsmedium Komponenten enthält, die starke PCR-Inhibitoren sind. Aus diesem Grund wurden für das spätere MRE Screening in der Kohorte stationäre Patienten und in der Kohorte Flüchtlinge FloqSwabs™ Abstrichtupfer ohne Erhaltungsmedium verwendet. Da die Viabilität der anhaftenden Bakterien ohne Umgebungsfeuchtigkeit über einen Zeitraum zwischen Probenahme und mikrobiologischer Untersuchung nicht gewährleistet ist, wird in der folgenden Untersuchung, entsprechend Kapitel 3.3.2.2, ein geeignetes Transportmedium hinsichtlich inhibitorischer Einflüsse auf die nachgelagerte Real-Time PCR Methode untersucht. Die Abbildung 10 zeigt deutlich, dass die phosphat-gepufferten Salzlösungen einen signifikant stärkeren inhibitorischen Einfluss auf die exoIPC Real-Time PCR haben, als die 0,85%ige NaCl-Lösung, das FloqSwab™ Eluat und das Nuklease-freie Wasser. Dies gilt sowohl für die Untersuchung der unbehandelten Salzlösungen als auch für die daraus, durch Zusatz von Detergenzien, hergestellten Lysepuffer. Dagegen unterscheiden sich die delta Ct-Werte der Natriumchloridlösung nicht signifikant von den delta Ct-Werten des Nuklease-freien Wassers, was für die Verwendung als Trägermedium spricht.

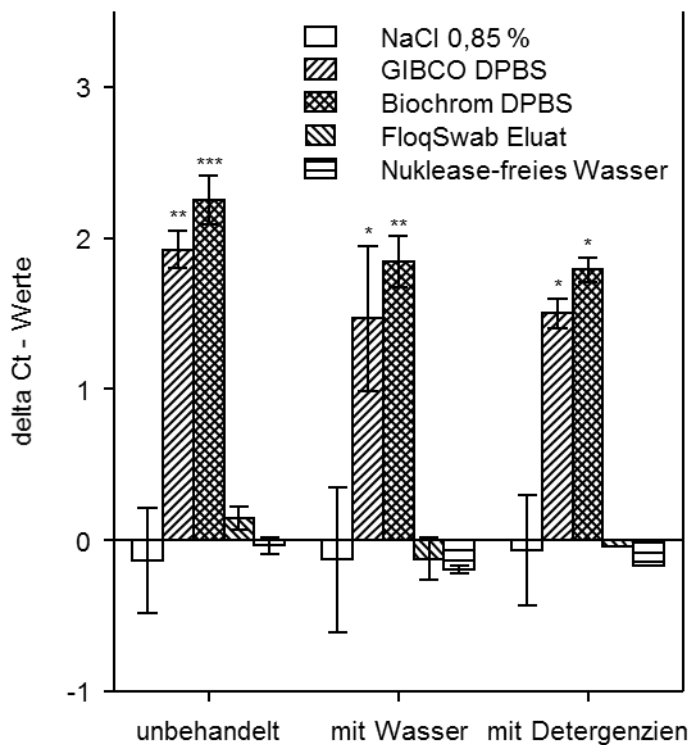


Abbildung 10 Inhibition des *exoIPC* Assays durch diverse Transportmedien.

Die dargestellten delta Ct-Werte der einzelnen salinen Lösungen leiten sich aus den gemittelten Differenzen der Ct-Werte der untersuchten Lösungen ($n = 2$) und dem mittleren Ct-Wert des *exoIPC* Assays in Nuklease-freiem Wasser als Vergleichslösung ab ($n = 4$). Die Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichungen der Einzelreaktionen einer Untersuchungslösung dar. Das Signifikanz-Niveau (p -Wert) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Bonferroni-Post-Test bestimmt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Für das FloqSwab Eluat und für das Nuklease-freie Wasser gilt das Signifikanz-Niveau in der Gruppe mit Detergenzien nicht, da nur Einzelwerte einbezogen wurden.

4.1.3 Anpassungen für die Verwendung mit TaqMan® Array Cards

Durch die Einführung eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes werden die unlöslichen Bestandteile und insbesondere die Bakterien, die in 1000 μ l der Probelösung suspendiert vorliegen, in circa 100 μ l Lysepuffer lysiert. Im folgenden Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob sich eine 10-fache Konzentrierung der Probensuspension auf die quantitativen Ergebnisse der Real-Time PCR auswirken. Die Ergebnisse der vergleichenden Extraktion mit und ohne zusätzlicher Zentrifugation anhand zweier Modellstämme sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Die Extraktion des *E. coli* NRZ 02721 aus einer auf Natriumchlorid 0,85 % basierenden Probelösung zeigt, dass ohne eine vorhergehende Zentrifugation 2 GE und mit Zentrifugation 2498 GE freigesetzt und detektiert werden konnten. Somit hat eine 10-fache Konzentrierung der Probelösung eine ca. 1000-fache Erhöhung der freigesetzten Bakterien-DNA Menge bewirkt. Im Falle der Extraktion des grampositiven Modellstammes *S. aureus* ATCC 43300 ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt war das *mecA* Gen sowohl bei einem Inokulum von 128 KBE als auch bei einem Inokulum von 1280 KBE nicht detektierbar. Um welchen Faktor die freigesetzte Menge an GE erhöht wurde lässt sich somit nicht berechnen, allerdings konnte die Zahl der freigesetzten GE auf ein Niveau oberhalb der Nachweisgrenze erhöht werden. Da in einer klinischen Probe nicht nur Bakterien, sondern auch andere unlösliche Probenbestandteile konzentriert werden, wurde ein weiterer Ansatz mit einer auf einem Nasen-/Rachenabstrich und einem Perianalabstrich basierenden Probensuspension untersucht.

Tabelle 4-2 Effekt eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes auf die Extraktionseffizienz der thermischen Lysemethode

Ansatz mit Modellstamm	KBE ¹⁾	Ergebnisse der qPCR Quantifizierung ²⁾				Faktor ³⁾
		ohne Zentrifugation		mit Zentrifugation		
		Ct-Wert	GE	Ct-Wert	GE	
NaCl						
<i>E. coli</i>	2850	34,6	2	25,2	2498	1057
	285	37,8	0,2	28,4	226	979
<i>S. aureus</i>	1280	n.d.	-	28,4	282	-
	128	n.d.	-	33,5	9	-
Probe						
<i>E. coli</i>	2850	34,8	2	26,9	694	325
	285	38,5	0,1	30,7	43	309
<i>S. aureus</i>	1280	n.d.	-	32,3	21	-
	128	n.d.	-	36,7	1	-

¹⁾ KBE = Eingebrachte Anzahl Keimbildender Einheiten des Modellstammes je PCR Volumen (10 µl). ²⁾ Der angegebene Ct-Wert ist ein Mittelwert aus zwei Einzelbestimmungen und die daraus berechnete Anzahl der lysierten Bakterien, angegeben als Genomäquivalente (GE) je PCR Volumen (10 µl). ³⁾ berechnet als Anzahl GE mit Zentrifugation dividiert durch die Anzahl der GE ohne Zentrifugation. n.d. = nicht detektierbar.

Bei der Extraktion von *E. coli* konnte die Zahl der freigesetzten Genomäquivalente um das circa 300-fache erhöht werden und für *S. aureus* konnte erst nach erfolgter Zentrifugation eine detektierbare Menge an Genomäquivalenten freigesetzt werden. Um eine potentielle Konzentrierung von PCR-Inhibitoren untersuchen und quantifizieren zu können, wurden alle Proben parallel mit dem exoIPC Assay untersucht. Im Ansatz mit NaCl-Lösung unterschieden sich der mittlere Ct-Wert ohne Zentrifugation mit 30,8 Zyklen (n = 10, SD = 0,30) und der mittlere Ct-Wert nach Zentrifugation mit 31,1 Zyklen (n = 10, SD = 0,32) nicht signifikant. Auch im Probenansatz verursachte der zusätzliche Zentrifugationsschritt keine signifikante Verschiebung der resultierenden mittleren Ct-Werte (ohne Zentrifugation: 31,1 ± 0,31 Zyklen; mit Zentrifugation: 31,2 ± 0,28 Zyklen) und somit auch keine zusätzliche PCR-Inhibition.

4.2 TaqMan® Real-Time PCR

4.2.1 Etablierung der TaqMan® Real-Time PCR in Einzelreaktionen

Die Etablierung der TaqMan® Real-Time PCR im Labor hat zum Ziel die technische Leistungsfähigkeit nachzuweisen. Wichtige Parameter, die das System näher charakterisieren sind die analytische Sensitivität, damit einhergehend die Linearität und die Nachweisgrenze sowie die analytische Spezifität. Für die Bestimmung der einzelnen PCR-Parameter wurde mindestens ein Referenzstamm verwendet, der das zu detektierende Resistenzgen trägt (Positiv-Kontrolle, PC) und diverse andere taxonomisch verwandte Stämme, die andere oder keine Resistenzgene tragen (Negativ-Kontrolle, NC). Die Untersuchungen wurden mit extrahierter und gereinigter DNA durchgeführt (Kapitel 3.2).

Die Spezifitätstestung erfolgte anhand von 72 Referenzstämmen unterschiedlicher Familien und Gattungen. Die untersuchten Primer- und SONDENSSETS konnten die ihrem Ziel-Gen entsprechenden Positiv-Kontrollen richtig identifizieren, wobei die resultierenden Ct-Werte in einem Bereich zwischen 14 und 29 Zyklen lagen. Des Weiteren konnten alle mit dem Real-Time PCR System untersuchten Negativ-Kontrollen richtig als Resistenzgen-negativ identifiziert werden (Tabelle 4-3). Die vorliegenden Ergebnisse basieren auf der Anwendung von verschiedenen Cut-Off-Werten, die als Trenngrößen für den Ct-Wert als kontinuierliche Messgröße dienen und zur Beurteilung als Resistenzgen-positiv oder Resistenzgen-negativ herangezogen wurden. Das vorgestellte System erfasst neben häufig vorkommenden Resistenzdeterminanten auch seltene klinisch relevante Genvarianten, so dass für die Gene *bla* FOX, *bla* MOX/CMY, *bla* VEB, *bla* PER-1, *bla* PER-2, *bla* GES und vanC2-C3-2 keine charakterisierten Referenzstämme verfügbar waren.

Tabelle 4-3 Ergebnisse der analytischen Spezifitätsprüfung in Einzelreaktionen

Ziel-Gen	Anzahl getesteter Isolate	Ergebnis der Real-Time PCR			
		richtig positiv	richtig negativ	falsch positiv	falsch negativ
CTX-M group 1	18	5	13	0	0
CTX-M group 2	18	3	15	0	0
CTX-M group 9	18	4	14	0	0
CTX-M group 8/25	18	3	15	0	0
SHV ¹⁾	21	10	11	0	0
TEM ¹⁾	21	10	11	0	0
OXA-1	34	2	32	0	0
ampC ²⁾	21	2	19	0	0
FOX	8	0	8	0	0
ACC	8	2	6	0	0
DHA	8	1	7	0	0
MOX/CMY	8	0	8	0	0
BIL/LAT/CMY	8	1	7	0	0
ACT/MIR	8	1	7	0	0
KPC	35	4	31	0	0
VIM	35	9	26	0	0
IMP-1	35	1	34	0	0
IMP-2	35	1	34	0	0
IMP-7	34	1	33	0	0
IMP-16	34	2	32	0	0
NDM	38	2	36	0	0
OXA-48	37	5	32	0	0
OXA-23	34	2	32	0	0
OXA-40	34	4	30	0	0
OXA-72	34	1	33	0	0
OXA-58	34	1	33	0	0
vanA1	7	2	5	0	0
vanA2	7	2	5	0	0
vanB	7	2	5	0	0
vanC1	7	1	6	0	0
vanC2-C3-1	7	0	7	0	0
vanC2-C3-2	7	1	6	0	0
mecA	9	2	7	0	0
femA SA ²⁾	10	3	7	0	0
femA SE ²⁾	10	3	7	0	0
mefA ³⁾	21	11	10	0	0
ermB ³⁾	21	7	14	0	0

¹⁾ Trenngröße des Ct-Wertes (Cut-off-Wert) = 29 Zyklen. ²⁾ Trenngröße des Ct-Wertes (Cut-off-Wert) = 30 Zyklen. ³⁾ Trenngröße des Ct-Wertes (Cut-off-Wert) = 35 Zyklen. Die Assays zur Detektion von VEB, PER-1, PER-2, GES, ACICU_00593 wurden nicht getestet, da keine Referenzstämme vorlagen. Für die Ziel-Gene FOX, MOX/CMY und vanC2-C3-1 fehlt jeweils ein positiv-Kontrollstamm.

Die TaqMan[®] Assays zur Detektion von IMP-1 und IMP-2 ähnlichen Carbapenemase-Genen konnten die *bla* IMP-7 Genvariante in *P. aeruginosa* NRZ-00638 korrekt nachweisen, wohingegen das *bla* IMP-2 Typ Carbapenemase-Gen in *P. aeruginosa* 48/09 und das *bla* IMP-16 Gen in *P. aeruginosa* NRZ-00196 zunächst nicht detektiert werden konnten. Um die Abwesenheit dieser Gene zu bestätigen bzw. etwaige Amplifikationsprodukte zu charakterisieren, wurden die suspekten Reaktionsgemische nach Ablauf der Real-Time PCR mit einer SYBR[®] Green

Schmelzkurvenanalyse und einer Gel-Elektrophorese weitergehend untersucht. Abbildung 11 zeigt, dass Amplifikationsprodukte mit entsprechender Nukleotidlänge im TaqMan® Reaktionsgemisch gebildet wurden, obwohl in der zugrundeliegenden Real-Time PCR keine Amplifikation zu erkennen war. In der zugehörigen Schmelzkurvenanalyse unterscheidet sich der Amplifikat-Schmelzpunkt der *bla* IMP-7 Genvariante deutlich von denen der IMP-2 und IMP-16 Genvarianten. Da die Schmelztemperatur eines doppelsträngigen Nukleotids u.a. von der Basenzusammensetzung abhängt, ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Schmelztemperaturen durch Polymorphismen innerhalb der Zielsequenz verursacht wurden.

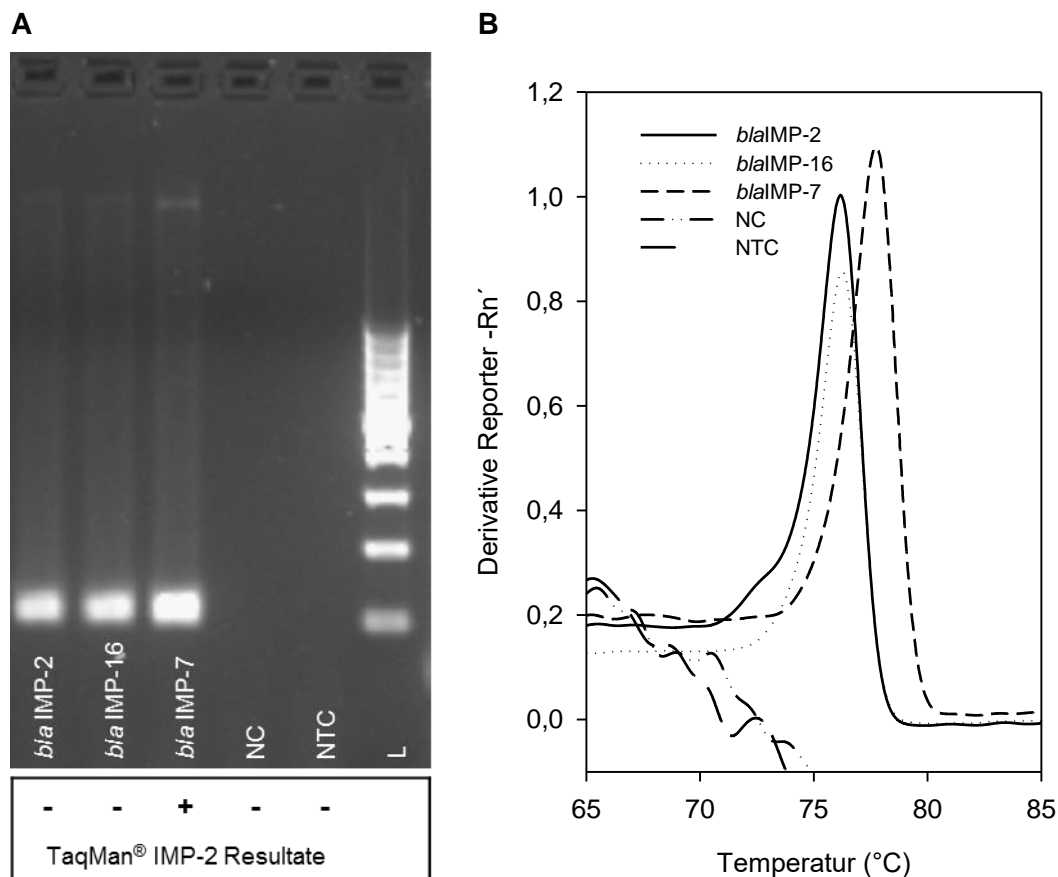


Abbildung 11 Sequenzunterschiede im *bla* IMP Ziel-Gen verhindern die Hybridisierung von IMP-1 und IMP-2 Taqman® Sonden

Die TaqMan® Real-Time PCR Reaktionsgemische von falsch-negativ getesteten Isolaten wurden nach Ablauf der Reaktion elektrophoretisch aufgetrennt und mittels SYBR® Green Schmelzkurvenanalyse untersucht. Abbildung A zeigt das Ergebnis der Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel im Vergleich zu den Ergebnissen des TaqMan® IMP-2 Assays. Abbildung B zeigt die Schmelzkurven derselben Reaktionsgemische. *bla* IMP-7 = *P. aeruginosa* NRZ-00638 *bla* IMP-2 = *P. aeruginosa* 48/09, *bla* IMP-16 Gen = *P. aeruginosa* NRZ-00196, NC = *E. coli* NRZ-02721 als negativ-Kontrolle, NTC = No Template Control, L = 100 bp DNA-Leiter als Größenstandard.

Somit wird deutlich, dass die Primer der verwendeten IMP-1 und IMP-2 Assays zwar spezifisch einen Teil des *bla* IMP Gens amplifizieren, jedoch die dazugehörigen TaqMan® Sonden aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen *bla* IMP Genotypen nicht binden können. Um die Sensitivität für IMP-Typ Carbapenemasen zu erhöhen, wurde deshalb das bestehende Ziel-Gen Portfolio um zwei weitere Assays erweitert, die zusätzlich *bla* IMP-16 und *bla* IMP-7 ähnliche Varianten detektieren

können. Mit Hilfe der neuen TaqMan Primer- und Sondensets konnten das IMP-2 Typ Carbapenemase Gen in *P. aeruginosa* 48/09 und das IMP-16 Gen in *P. aeruginosa* NRZ-00196 korrekt nachgewiesen werden. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der konventionellen Endpunkt PCR mit publizierten Primern für die zusätzliche Bestätigung der IMP-Genotypen in den einzelnen Referenzstämmen.

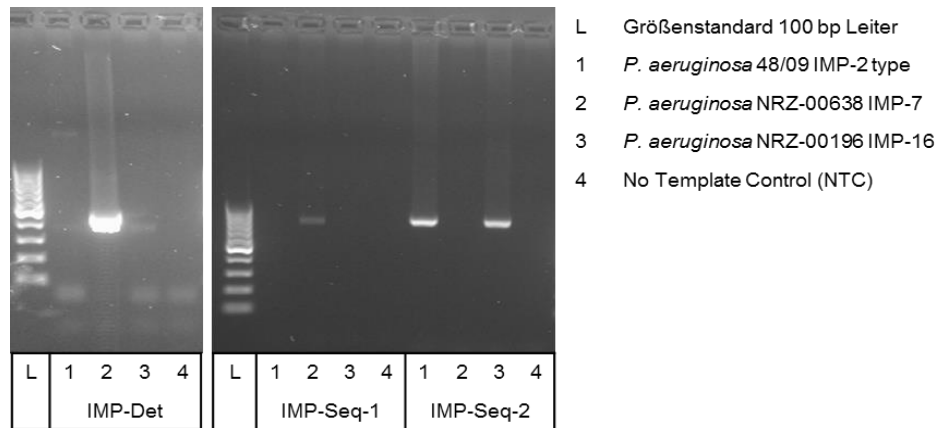


Abbildung 12 Bestätigung der IMP-Genotypen verschiedener Referenzstämmen mittels Endpunkt PCR

Die zugrundeliegende konventionelle PCR wurde mit drei unterschiedlichen Primerpaaren (IMP-Det, IMP-Seq-1, IMP-Seq-2) durchgeführt, die für verschiedene Varianten des *bla* IMP Ziel-Gens spezifisch sind. Das Vorhandensein von IMP-Genvarianten in den Isolaten *P. aeruginosa* 48/09 (Spur 1) und *P. aeruginosa* NRZ-00196 (Spur 3) konnten durch den IMP-Seq-2 Primer bestätigt werden.

In der Spezifitätstestung des VIM Assays konnten zunächst 8 von 9 (89 %) Referenzstämmen identifiziert werden, die die Varianten *bla* VIM-1, *bla* VIM-2 oder eine unsequenzierte VIM-Variante tragen. Lediglich *bla* VIM-1 in *E. cloacae* NRZ-00239 konnte initial nicht mit dem Real-Time PCR System detektiert werden. In der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung und Schmelzkurvenanalyse konnten keine Amplifikate im suspekten Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch in der konventionellen Endpunkt PCR mittels publizierten Primern kein entsprechendes Amplifikat in *E. cloacae* NRZ-00239 nachgewiesen werden, weshalb davon auszugehen ist, dass dieses Isolat weder ein *bla* VIM-1 Gen noch eine andere *bla* VIM Variante trägt (Abbildung 13). Da während der Subkultivierung der einzelnen Referenzstämmen kein Selektionsdruck durch ein entsprechendes Antibiotikum ausgeübt wurde, ist es möglich, dass Plasmid-kodierte Resistenzdeterminanten durch Verlust dieses mobilen genetischen Elements verloren gehen. Dementsprechend konnten durch Anlegen einer frischen Kultur auf LB-Agar mit 1 µg/ml Imipenem, Isolate des *E. cloacae* NRZ-00239 gewonnen werden, die phänotypisch Carbapenem-resistent sind und eine in der TaqMan® Real-Time PCR nachweisbare *bla* VIM Genvariante tragen.

Eine falsch-positive Detektion des *bla* NDM-1 Gens in *K. pneumoniae* NRZ-00002 und *K. pneumoniae* NRZ-00103 ist durch Kontamination während der DNA-Extraktion erklärlich und konnte nach wiederholter Extraktion und erneuter Real-Time PCR Untersuchung als richtig-negativ bewertet werden.

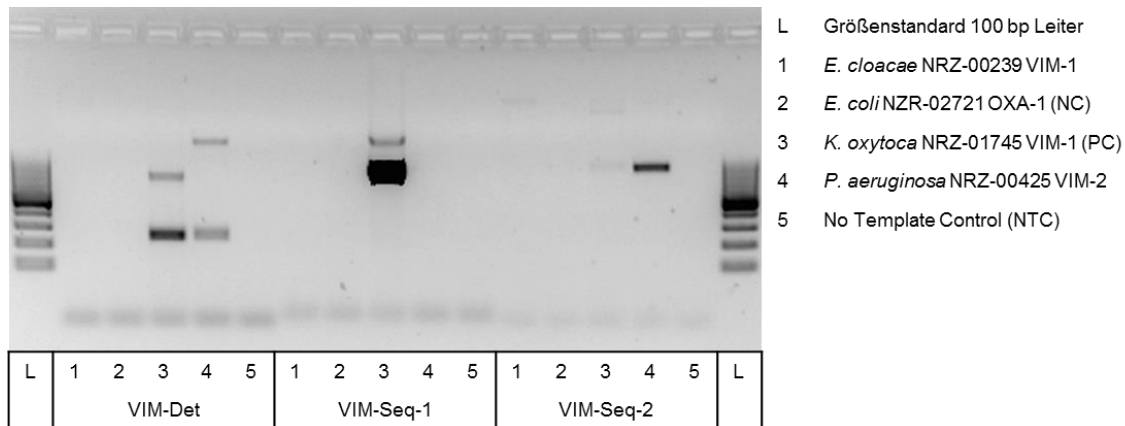


Abbildung 13 Bestätigung der VIM-Genotypen verschiedener Referenzstämme mittels Endpunkt PCR

Die zugrundeliegende konventionelle PCR wurde mit drei unterschiedlichen Primerpaaren (VIM-Det, VIM-Seq-1, VIM-Seq-2) durchgeführt, die für verschiedene Varianten des *bla* VIM Ziel-Gens spezifisch sind. Im untersuchten Isolat des *E. cloacae* NRZ-00239 (Spur 1) Referenzstammes konnte keine Variante des *bla* VIM Gen detektiert werden.

4.2.1.1 Linearität, analytische Sensitivität und Wiederholpräzision

Die Bestimmung der analytischen Sensitivität und damit einhergehend die Berechnung des *Limit of Detection* (LOD) erfolgte anhand 7-stufiger DNA-Verdünnungsreihen des jeweiligen positiv-Kontrollstammes. Mit Hilfe linearer Regression wurden Standardkurven generiert, die durch Ermittlung der Regressionsgleichung eine Beurteilung der zugrundeliegende Real-Time PCR zulassen.

Eine mittlere PCR-Effizienz E der einzelnen Real-Time PCR Assays von 99,2 % (Spannweite: 65,5 % – 114,0 %) belegt, dass ein Großteil der untersuchten Assays unter optimalen Amplifikationsbedingungen ($E = 100$ %) arbeitet. Des Weiteren liegen die ermittelten Linearitätskoeffizienten r^2 in einem Bereich von 0,9992 bis 0,9473 was zeigt, dass die generierten Standardkurven einen linearen Verlauf über den gesamten Bereich der eingesetzten GE-Konzentration aufweisen. Die Abbildung 14 zeigt ein Amplifikationsdiagramm und die daraus resultierende Standardkurve beispielhaft anhand des IMP-2 Assays. Bei näherer Betrachtung der Standardkurve (Abbildung 14 B) wird eine stärker werdende Streuung der Einzelwerte bei Konzentrationen unter 50 GE pro 10 μ l deutlich. Diese Abnahme der Präzision deutet auf die beginnende Grenze des linearen Bereichs hin. Des Weiteren hat eine geringe Präzision im untersten Konzentrationsbereich direkten Einfluss auf die Nachweisgrenze des Real-Time PCR Systems, da durch die größere Streuung auch Ausreißer nach unten wahrscheinlicher werden, was zu falsch-negativen Resultaten führen kann. Um die Nachweisgrenze (LOD) genauer bestimmen zu können, wurden die qualitativen Ergebnisse aller Replikate der einzelnen Verdünnungsstufen einer Probitanalyse unterzogen und die GE-Konzentration berechnet, die mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit richtig-positiv getestet wird (LOD₉₅). Die Nachweisgrenzen der einzelnen Assays liegen demnach in einem Bereich zwischen 1 GE und 29 GE pro 10 μ l PCR-Reaktionsvolumen. Die einzelnen Parameter zur Beurteilung aller untersuchten TaqMan® Real-Time PCR Assays sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

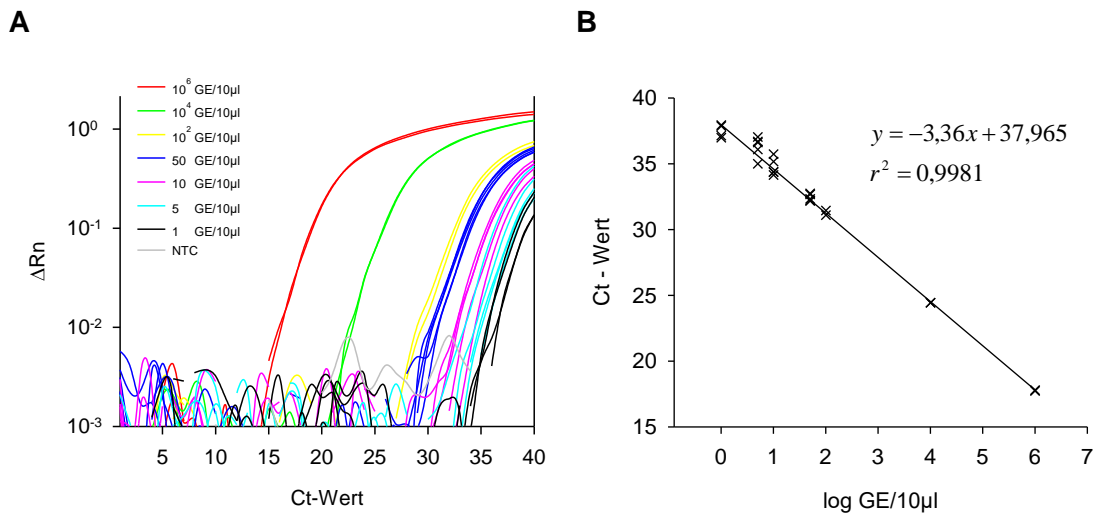


Abbildung 14 Amplifikationskurven und Standardkurve zur Bestimmung der Linearität und analytischen Sensitivität am Beispiel von IMP-2

Amplifikationskurven einer DNA-Standardverdünnungsreihe (A) von *P. aeruginosa* NRZ-00638 IMP-7 und die daraus resultierende Standardkurve (B). Die Amplifikation und Detektion des IMP-7 Gens erfolgte anhand des IMP-2 Assays in einem Vii7 Real-Time PCR System. Zur Ermittlung der Ct-Werte wurde ein delta-Wert des normalisierten Reportersignals (ΔR_n) von 0,04 als *Threshold* gewählt (rote Linie). Für die Generierung der Standardkurve wurden die resultierenden Ct-Einzelwerte über die Konzentrationen der untersuchten Verdünnungsstufen aufgetragen. Angegeben ist die Zahl der Genomäquivalente (GE) pro 10 μ l PCR Reaktionsvolumen.

Um die Präzision im unteren Konzentrationsbereich näher charakterisieren zu können, wurde jeweils eine positiv-Kontrollprobe mit 50 GE/10 μ l (1 log-Stufe über dem LOD) unter Mess- und Wiederholbedingungen vermessen. Die innerhalb eines Real-Time PCR Laufes gemessenen Ct-Werte weisen mit Standardabweichungen zwischen 0,17 und 0,61 Zyklen ($n = 5$; RSD: 0,6 % - 1,9 %) nur eine geringe Variabilität auf. Des Weiteren ergab die Vermessung derselben Probe über sechs aufeinanderfolgende Tage mit Standardabweichungen zwischen 0,31 und 1,65 Zyklen ($n = 6$; RSD: 0,9 % - 5,1 %) eine nur geringfügig größere Variabilität der Ct-Werte. Eine Ausnahme bildet dabei der VIM Assay, dessen Standardabweichung unter Messbedingungen 1,22 Zyklen beträgt. Da die Standardabweichung unter Wiederholbedingungen jedoch mit 0,62 Zyklen wesentlich geringer ist, ist es wahrscheinlich, dass die Variabilität durch Pipettierfehler verursacht wurde.

Geht man davon aus, dass die PCR-Effizienz 100% beträgt bzw. die Steigung der Standardkurve -3,33 ist, dann beträgt die Ct-Wert Differenz zwischen zwei aufeinander folgenden Stufen einer 10-fach Verdünnungsreihe 3,33 Zyklen. In einem normalverteilten Datensatz befinden sich 95 % der Werte im Intervall von $\pm 2 * SD$ des Mittelwertes. Um eine quantitative Unterscheidung beider Konzentrationen in 95 % der Fälle zu ermöglichen, sollte somit die Standardabweichung kleiner als 0,8325 Zyklen ($SD_{soll} \leq 3,33 / 4$) sein. Daraus folgt, dass alle untersuchten TaqMan[®] Assays unter Messbedingungen, aufgrund der hohen Präzision im unteren Konzentrationsbereich in der Lage sind, zwischen 50 GE und 500 GE pro PCR-Reaktion zu unterscheiden.

Tabelle 4-4 Ergebnisse der analytischen Sensitivitätsprüfung in Einzelreaktionen

Ziel-Gen	Linearität r^2 (Effizienz, %)	LOD ¹⁾ [GE]	Präzision SD (RSD, %) ²⁾	
			Mess- bedingungen	Wiederhol- bedingungen
CTX-M group 1	0,9807 (110)	5	0,46 (1,4)	0,74 (2,2)
CTX-M group 2	0,9930 (85)	5	0,61 (1,8)	0,62 (1,9)
CTX-M group 9	0,9992 (105)	1	0,17 (0,6)	0,70 (2,3)
CTX-M group 8/25	0,9988 (65)	3	0,61 (1,8)	0,62 (1,9)
SHV	0,9984 (109)	5	0,22 (0,7)	1,61 (4,9)
TEM	0,9988 (103)	1	0,22 (0,7)	1,61 (4,9)
OXA-1	0,9922 (109)	5	0,50 (1,6)	1,43 (4,3)
ampC	0,9802 (101)	3	0,19 (0,6)	0,34 (1,0)
ACC	0,9950 (103)	2	0,22 (0,7)	0,60 (1,9)
DHA	0,9855 (99)	4	0,30 (0,9)	1,59 (4,8)
BIL/LAT/CMY	0,9950 (88)	5	0,25 (0,8)	0,84 (2,4)
ACT/MIR	0,9954 (104)	2	0,19 (0,6)	0,54 (1,7)
KPC	0,9799 (90)	3	0,34 (0,9)	1,06 (2,6)
VIM	0,9910 (112)	10	1,22 (3,5)	0,62 (1,8)
IMP-1	0,9962 (99)	2	0,26 (0,8)	0,55 (1,7)
IMP-2	0,9974 (114)	29	0,52 (1,4)	0,35 (0,9)
IMP-7	0,9992 (97)	4	0,49 (1,0)	1,52 (3,0)
IMP-16	0,9986 (95)	6	0,26 (0,8)	0,55 (1,7)
NDM	0,9958 (113)	6	0,50 (1,6)	1,43 (4,3)
OXA-48	0,9952 (107)	5	0,62 (1,9)	0,90 (2,7)
ACICU_00593	0,9958 (95)	2	0,24 (0,7)	0,76 (2,8)
OXA-23	0,9966 (98)	3	0,50 (1,6)	1,43 (4,3)
OXA-40	0,9942 (97)	3	0,50 (1,6)	1,43 (4,3)
OXA-72	0,9954 (104)	2	0,37 (1,1)	0,63 (1,9)
OXA-58	0,9950 (103)	2	0,29 (0,9)	1,65 (5,1)
vanA1	0,9553 (98)	2	0,24 (0,8)	0,65 (2,1)
vanA2	0,9473 (99)	1	0,17 (0,6)	0,45 (1,5)
vanB	0,9930 (99)	4	0,28 (0,9)	0,66 (2,1)
vanC1	0,9990 (93)	16	0,26 (0,8)	0,71 (2,2)
vanC2-C3-2	0,9910 (88)	2	0,27 (0,9)	0,31 (1,0)
mecA	0,9964 (93)	5	0,34 (0,9)	1,06 (2,6)
femA SA	0,9968 (97)	2	0,30 (0,9)	1,59 (4,8)
femA SE	0,9992 (97)	5	0,30 (0,9)	1,59 (4,8)
mefA	0,9862 (100)	14	0,34 (0,9)	1,06 (2,6)
ermB	0,9761 (103)	18	0,30 (0,9)	1,59 (4,8)

¹⁾ Die Nachweisgrenze (LOD) wurde anhand 7-stufiger Verdünnungsreihen konzentrierter DNA-Standards getestet und mittels Probit-Analyse berechnet. Sie bezeichnet diejenige Konzentration (GE/10 µl), die in 95 % aller Fälle detektiert werden kann. ²⁾ Die Bestimmung der Präzision erfolgte jeweils durch wiederholtes Testen der Verdünnungsstufe 5a (50 GE/ 10µl) in 5 Replikaten innerhalb eines Laufes und in 6 verschiedenen Läufen an sechs aufeinander folgenden Tagen. Als Maß für die Präzision ist die Standardabweichung SD unter Mess- und Wiederholbedingungen angegeben. Aufgrund fehlender positiv-Kontrollstämmen wurden die Assays FOX, MOX/CMY, VEB, PER-1, PER-2, GES, vanC2-C3-1 nicht in die Sensitivitätstestung einbezogen.

4.2.2 Evaluierung an klinischen Proben von stationären Patienten

In den bisher beschriebenen Untersuchungen erfolgte der Nachweis der technischen Leistungsfähigkeit des vorgestellten TaqMan® Real-Time PCR Systems. Mit Hilfe von aufgereinigter DNA aus Referenzstämmen konnten die PCR-Effizienz, die Linearität und die Präzision des Systems nachgewiesen sowie die analytische Sensitivität und Spezifität überprüft werden. Im Folgenden wurde die diagnostische Eignung des TaqMan® Real-Time PCR Systems zur Detektion von MRSA, VRE, ESBL und CRE anhand klinischer Proben aus einer Kohorte von stationären Patienten evaluiert. Die Überprüfung der Aussagekraft erfolgte dabei im Vergleich zum kulturbasierten Screening auf Selektiv-Nährmedien, das derzeit die Goldstandardmethode zur schnellen Verdachtssuche auf MRSA, VRE, ESBL und CRE darstellt. In einem Zeitraum von sechs Monaten konnten 73 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, wobei 73 korrespondierende Proben zur Untersuchung auf MRSA und 72 Proben zur Untersuchung auf VRE, ESBL und CRE zur Verfügung standen.

Das kulturbasierte Screening ergab, dass insgesamt 27 Patienten (37,0 %) mit mindestens einem multiresistenten Erreger besiedelt waren. In vier Fällen (5,5 %) wurde eine Mischkolonisation beobachtet, wobei die Kombinationen MRSA + ESBL (n = 1), VRE + 3MRGN (n = 2) und VRE + 4MRGN (n = 1) vorkamen. Demnach waren 9 Patienten MRSA-positiv, 13 Patienten VRE-positiv, 8 Patienten ESBL-positiv und 1 Patient CRE-positiv, was jeweils einer Prävalenz von 12,3 %, 18,1 %, 11,1 % und 1,4 % in dieser Studien-Kohorte entspricht. Auf Speziesebene handelt es sich bei den ESBL-produzierenden Erregern um 6 Isolate der Spezies *Escherichia coli* und 2 Isolate der Spezies *Enterobacter cloacae*. Vier der *E. coli* Stämme und beide *E. cloacae* waren zusätzlich resistent gegenüber Fluorchinolon-Antibiotika und somit formal als 3MRGN zu klassifizieren. Das Carbapenem-resistente Isolat eines *Acinetobacter baumannii* war gleichzeitig resistent gegenüber Acylureidopenicillinen, Cephalosporinen (3. + 4. Generation) sowie Fluorchinolonen und ist somit formal ein 4MRGN Erreger. Alle 13 VRE-Isolate gehörten zur Spezies *Enterococcus faecium*.

Die Zeitdauer zwischen Probeneingang und Befundübermittlung war abhängig von der Untersuchungs-Anforderung und betrug im Mittel 50,5 h (42,8 h – 93,1 h). Ein mikrobiologischer VRE-Endbefund war nach 66,2 h (46,4 h – 93,1 h), ein MRGN-Endbefund nach 56,2 h (43,7 h – 93,1 h) und ein MRSA-Endbefund nach 49,4 h (42,8 h – 68,5 h) verfügbar.

In der TaqMan® Real-Time PCR Untersuchung wurden zunächst einzelne Resistenzgene detektiert, die die phänotypische Resistenz in MRSA, VRE, ESBL und CRE vermitteln können. Anschließend wurden die molekularbiologischen Ergebnisse ausgewertet und in eine qualitative Aussage, positives oder negatives Testresultat für MRSA, VRE, ESBL oder CRE übersetzt. Demnach waren 40 Patienten (54,8 %) mit mindestens einem multiresistenten Erreger besiedelt. Eine Mischkolonisation wurde in 11 Patienten (15,1 %) festgestellt, wobei die Kombinationen MRSA + ESBL (n = 4) und VRE + ESBL (n = 7) auftraten. Insgesamt waren in der molekularbiologischen Untersuchung 3 Patienten MRSA-positiv, 15 Patienten VRE-positiv, 32 Patienten ESBL-

positiv und 1 Patient CRE-positiv, was jeweils einer Prävalenz von 4,1 %, 20,8 %, 44,4 % und 1,4 % entspricht.

Auf molekularbiologischer Ebene konnten insgesamt 7 von den 18 untersuchten ESBL-Determinanten detektiert werden. Des Weiteren wurde *bla* OXA-40 als einziges von 12 untersuchten Carbapenemase-Genen nachgewiesen. Von den 6 untersuchten Genen, die eine Vancomycin-Resistenz vermitteln, wurden lediglich die vanC2-C3-1 assoziierten Varianten nicht detektiert. Die Varianten vanC1 und vanC2-C3-2 wurden insgesamt in vier verschiedenen Proben nachgewiesen, jedoch wurden diese nicht als VRE-positive Proben bewertet, da alle vanC-Varianten intrinsisch in verschiedenen Enterokokken vorkommen und lediglich eine *low-level* Vancomycin-Resistenz vermitteln. Eine Zusammenfassung der mittels TaqMan® Real-Time PCR detektierten Resistenzgene ist in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5 Molekularbiologische Detektion von Resistenzgenen in der Kohorte stationäre Patienten

Ziel-Gen	Phänotyp	Häufigkeit	
		absolut	relativ ¹⁾ (%)
CTX-M 1	ESBL	6	8,2
SHV	ESBL	10	13,7
TEM	ESBL	20	27,4
OXA-1	ESBL	1	1,4
ampC	ESBL	7	9,6
DHA	ESBL	1	1,4
BIL/LAT/CMY	ESBL	3	4,1
OXA-40	CR	1	1,4
vanA1	VR	12	16,4
vanA2	VR	10	13,7
vanB	VR	3	4,1
vanC1	VR	1	1,4
vanC2-C3-2	VR	3	4,1
mecA	MR	7	9,6
femA SA	SA	15	20,5
femA SE	SE	53	72,6
mefA	MLS	57	78,1
ermB	MLS	12	16,4

¹⁾ Die relative Häufigkeit bezieht sich auf n = 73 Proben.

Das Real-Time PCR System ermöglicht die parallele Untersuchung von bis zu 8 Proben, die theoretisch innerhalb von 2,5 Stunden nach Probeneingang befundet werden können. Anders als im Betrieb eines Routinelabors war es unter Forschungsbedingungen jedoch nicht möglich genügend Proben für eine optimale Auslastung des PCR-Systems zu akquirieren, wodurch die reine Untersuchungsdauer durch mehrtägiges Sammeln und Lagern der Proben unterbrochen wurde. Des Weiteren müssen Proben, in denen PCR-Inhibition auftrat, nach Verdünnung, erneut untersucht werden.

Um falsch-negative Resultate aufgrund von PCR Inhibition auszuschließen, wurde in jeder Probe eine exogene interne Inhibitionskontrolle mitgeführt und mittels exoIPC Assay überwacht. In den untersuchten Leerextraktionen wurde dabei ein mittlerer Ct - Wert von 30,3 Zyklen (SD = 1,1 Zyklen) beobachtet. Die Analyse einer Probe wurde wiederholt, sobald der Ct-Wert des exoIPC Assays in der Probe den Grenzwert von 33,9 Zyklen (Mittelwert + 3,3-fache der SD) überschritt. Wie in Abbildung 15 dargestellt, trat demzufolge in insgesamt 6 Proben PCR-Inhibition auf, was einer Inhibitionsrate von 8,2 % entspricht. Durch eine 1:10 Verdünnung der jeweiligen Probe konnte die Inhibition in einer wiederholten Untersuchung aufgehoben werden.

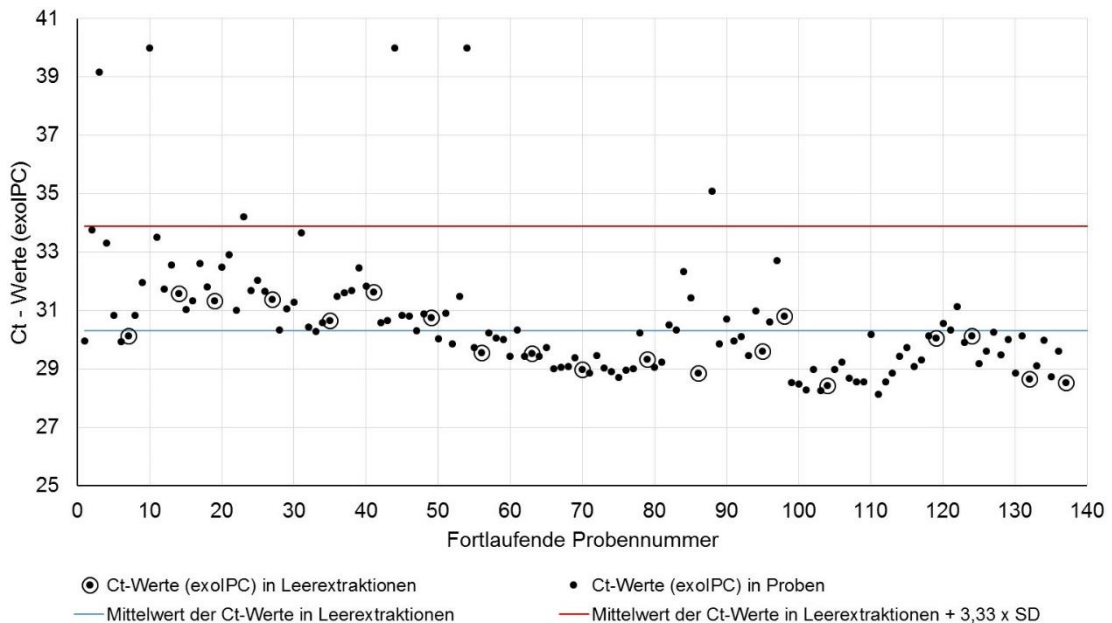


Abbildung 15 Überwachung der PCR-Inhibition in klinischen Proben anhand der exogenen internen Inhibitionskontrolle (exoIPC)

In jeder Real-Time PCR Untersuchung wurde eine exogene interne Inhibitionskontrolle mitgeführt und mittels exoIPC Assay bestimmt. Dargestellt sind die Ct-Werte des exoIPC Assays in allen klinischen Proben und den mitgeführten Leerextraktionen. Die Ct-Werte der Leerextraktionen wurden gemittelt und die Standardabweichung SD wurde bestimmt. Um entscheiden zu können, ob die Untersuchung einer Probe aufgrund von PCR-Inhibition wiederholt werden muss, wurde der Mittelwert (blaue Linie) plus das 3,3-fache der Standardabweichung als Entscheidungsgrenze festgelegt (rote Linie).

Im Folgenden wird die diagnostische Leistungsfähigkeit der TaqMan® Real-Time PCR durch den Vergleich der kulturbasierten und molekularbiologischen Ergebnisse, basierend auf 73 klinischen Abstrich-Proben aus der Kohorte stationäre Patienten, evaluiert (Kapitel 3.6.4). Tabelle 4-6 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse des TaqMan® Real-Time PCR Nachweises von MRSA, VRE, ESBL und CRE im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard.

Die Real-Time PCR zum Nachweis von MRSA konnte 3 von 9 MRSA-positive Proben und 64 von 64 MRSA-negative Proben richtig identifizieren, was einer Sensitivität von 33 % und einer Spezifität von 100 % entspricht. Die Methicillin-Resistenzdeterminante *mecA* wurde in insgesamt 7 Proben detektiert. Die gleichzeitige Detektion des *mecA* Gens und des *S. aureus* spezifischen *femA*-Genabschnittes war ausschließlich in den 3 richtig-positiven Proben zu beobachten. In den 4 übrigen Proben in denen *mecA* detektiert wurde, war jeweils lediglich die *S. epidermidis* spezifische *femA*-Sequenz

nachweisbar, wodurch die Probe richtig als MRSA-negativ gewertet wurde. Da keine falsch-positiven Ergebnisse auftraten, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein positives PCR-Ergebnis auch wirklich stimmt, in dieser Kohorte 100 % (PPV). Allerdings bleiben rund 77 % aller MRSA-Patienten aufgrund der geringen Sensitivität in der Real-Time PCR unerkant.

Des Weiteren konnten 11 von 13 VRE-positiven Patienten und 55 von 59 VRE-negativen Patienten richtig identifiziert und somit eine Sensitivität von 85 % sowie eine Spezifität von 93 % erreicht werden. In allen richtig-positiven Proben ($n = 11$; 100 %) wurden ausschließlich vanA-Varianten nachgewiesen. Insgesamt 4 Proben ergaben falsch-positive und 2 Proben ergaben falsch-negative PCR-Resultate. In 3 von 4 falsch-positiven Proben (75 %) wurde vanB und in 1 von 4 Proben (25 %) die Kombination vanA1/vanA2 detektiert.

Tabelle 4-6 Ergebnisse des MRE Nachweises mittels TaqMan® Real-Time PCR in klinischen Proben stationärer Patienten im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard

MRE	Anzahl der Ergebnisse				Sensitivität (%)		Spezifität (%)		PPV	NPV
	TP	FP	TN	FN	(95% CI)		(95% CI)			
MRSA ¹⁾	3	0	64	6	33	(12 - 65)	100	(94 - 100)	100,0	91,4
VRE ²⁾	11	4	55	2	85	(58 - 96)	93	(84 - 97)	73,3	96,5
ESBL ²⁾	6	26	38	2	75	(41 - 93)	59	(47 - 71)	18,8	95,0
CRE ²⁾	1	0	71	0	100	(21 - 100)	100	(95 - 100)	100,0	100,0
Total ³⁾	21	30	228	10	68	(50 - 81)	88	(84 - 92)	41,2	95,8

¹⁾ Basierend auf einer Probenzahl von $n = 73$. ²⁾ Basierend auf einer Probenzahl von $n = 72$. ³⁾ Die Zeile „Total“ gibt die Leistungsmerkmale des Gesamtsystems wieder. Abkürzungen: TP = richtig positiv, FP = falsch positiv, TN = richtig negativ, FN = falsch negativ, CI = Konfidenzintervall, PPV = positiv prädikativer Wert, NPV = negativ prädikativer Wert.

Die Real-Time PCR zur Detektion von ESBL-Varianten konnte 6 von 8 ESBL-positive Proben und 38 von 64 ESBL-negative Proben richtig identifizieren. Die Sensitivität und Spezifität des Real-Time ESBL-Nachweises beträgt somit 75 % und 59 %. In Tabelle 4-7 sind alle ESBL-Gene aufgeführt, die in den 6 richtig-positiven Proben durch die Real-Time PCR nachgewiesen wurden. Am häufigsten wurden dabei Varianten der *bla* CTX-M 1 Gruppe nachgewiesen ($n = 4$; 67 %). Falsch-positive PCR Resultate ($n = 26$) wurden in 62 % ($n = 16$) der Fälle durch die Detektion einer *bla* TEM- oder einer *bla* SHV-Genvariante verursacht. Des Weiteren beruhten 27 % ($n = 7$) der falsch-positiven Resultate auf dem Nachweis von *bla* TEM und *bla* SHV in Kombination mit *ampC* ($n = 3$), *BIL/LAT/CMY* ($n = 3$) und *CTX-M 1* ($n = 1$). Die restlichen 11 % ($n = 3$) der falsch-positiven Resultate sind auf die alleinige Detektion von *ampC* ($n = 2$) oder *CTX-M 1* ($n = 1$) zurückzuführen.

Tabelle 4-7 Vorkommen von ESBL-Genotypen in Patientenproben, die in der TaqMan® Real-Time PCR richtig-positiv erkannt wurden

Patient	ESBL-Genotyp detektiert durch TaqMan® PCR					
	CTX-M 1	SHV	TEM	OXA-1	ampC	DHA
20150428-004	-	+	-	-	+	-
20150429-002	+	+	-	-	-	-
20150715-001	-	-	-	-	+	-
20150814-003	+	-	+	-	-	-
20150612-003	+	-	-	+	-	-
20150904-001	+	-	+	-	-	+
Summe	4	2	2	1	2	1

Beachtenswert ist, dass keine der richtig-positiven Real-Time PCR Resultate auf der alleinigen Detektion von *bla* TEM oder *bla* SHV beruht. Dieser Befund legt nahe, dass die geringe Sensitivität und Spezifität des ESBL-Nachweises hauptsächlich durch diese beiden Assays verursacht wird. Eine mögliche Erklärung ist, dass sowohl einfache β -Lactamasen als auch β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) durch Varianten der *bla* TEM und *bla* SHV Gene kodiert werden, die sich lediglich durch wenige Einzelnukleotid-Polymorphismen unterscheiden. Die verwendeten TaqMan® Assays sind somit nicht in der Lage zwischen ESBL- und nicht-ESBL-Varianten zu diskriminieren.

Die TaqMan® Real-Time PCR hat erfolgreich die einzig verfügbare CRE-positive Probe richtig erkannt und war in der Lage 100 % (n = 71) der CRE-negativen Proben als solche zu identifizieren. Das CRE-Testsystem zeigt somit eine 100 %ige Sensitivität und Spezifität. In der CRE-positiven Probe konnte ein *bla* OXA-40 ähnliches Carbapenemase-Gen nachgewiesen werden. Allerdings konnte das Vorhandensein des mikrobiologisch nachgewiesenen *Acinetobacter baumannii* nicht durch den speziesspezifischen ACICU_00593 Assay bestätigt werden.

Die Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems, d.h. die Kombination aus MRSA-, VRE-, ESBL- und CRE-Nachweis, ist durch eine Sensitivität von 68 % und eine Spezifität von 88 % gekennzeichnet. Die positiv-prädikativen Werte (PPV) für den Nachweis von MRSA, VRE ESBL, und CRE betragen 100 %, 73 %, 19 % und 100 % und unterscheiden sich somit erheblich zwischen den zu detektierenden MRE-Gruppen. In toto beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein positiv getesteter Patient auch wirklich MRE-positiv ist, 41 %. Die negativ-prädikativen Werte (NPV) betragen im Einzelnen 91 %, 96 %, 95 % und 100%. Auch in Betrachtung des Testsystems als Ganzes ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit von 96 %, dass ein negativ getesteter Patient auch tatsächlich MRE-negativ ist. Einschränkend ist zu beachten, dass prädikative Werte immer a-posteriori Wahrscheinlichkeiten darstellen, die von der Prävalenz der Erkrankung, in diesem Fall der MRE-Besiedelung, in der untersuchten Kohorte abhängig sind.

4.2.3 Etablierung der Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards

Die Integration der entwickelten Real-Time PCR Assays auf TaqMan® Array Cards (TAC) ermöglicht die parallele Untersuchung von bis zu 48 Genen in 8 verschiedenen Proben und somit einen hohen Proben-Durchsatz ohne zusätzliche Automatisierung. Die Mikrofluidik-Architektur reduziert weiterhin die zu handhabenden Volumina und mindert das Risiko einer Kreuzkontamination durch Verschleppung von DNA-Spuren beim Pipettieren. Jedoch verringert sich somit auch das Reaktionsvolumen von 10 µl in den Einzelreaktionen auf ein Reaktionsvolumen von 1 µl in den Kavitäten der TAC. Im Folgenden werden die Ergebnisse der analytischen Sensitivitätstestung nach Integration der TAC vorgestellt (Tabelle 4-8).

Die Real-Time PCR Reaktion verläuft auf dem TAC-System mit einer mittleren PCR-Effizienz aller Assays von 103,5 % (Spannweite: 64,7 % - 177,7 %). Die zugrundeliegenden Standardkurven zeigen dabei mit einem mittleren Linearitätskoeffizienten r^2 von 0,9654 (Spannweite: 0,7140 - 0,9995) einen linearen Verlauf über den gesamten Bereich der eingesetzten GE-Konzentrationen. Die Nachweisgrenze, als Ausdruck der analytischen Sensitivität, orientiert sich an dem unteren Ende des linearen Bereichs eines jeden Assays und ist die niedrigste Konzentrationsstufe eines Konzentrationsbereichs, dessen Standardgerade die geringsten prozentualen Abweichungen zu den zugrundeliegenden Messwerten aufweist. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Assays liegen demnach in einem Bereich zwischen 1 GE und 32 GE pro 1 µl TAC-Reaktionsvolumen. Die Ergebnisse der Sensitivitätstestung zeigen, dass die TaqMan® Real-Time PCR Assays auch nach Integration auf TaqMan® Array Cards in der Lage sind die vorgegebenen Ziel-Gene mit hoher Sensitivität zu detektieren.

Tabelle 4-8 Ergebnisse der analytischen Sensitivitätsprüfung auf TaqMan® Array Cards

Ziel-Gen	Linearität r ² (Effizienz, %)	LOD ¹⁾ [GE]	Verdünnungs- stufe
CTX-M group 1	0,9810 (103)	2	6
CTX-M group 2	0,9332 (127)	8	5
CTX-M group 9	0,9852 (117)	32	4
CTX-M group 8/25	0,9780 (65)	1	7
SHV	0,9923 (127)	1	7
TEM	0,9343 (178)	32	4
OXA-1	0,9995 (95)	2	6
ampC	0,9891 (104)	2	6
ACC	0,9792 (100)	1	7
DHA	0,9170 (118)	8	5
BIL/LAT/CMY	0,9958 (101)	1	7
ACT/MIR	0,9951 (108)	2	6
KPC	0,9606 (124)	2	6
OXA-48	0,9926 (88)	2	6
VIM	0,9907 (121)	2	6
IMP-1	0,9798 (104)	1	7
IMP-2	0,8761 (77)	2	6
IMP-7	0,9840 (116)	1	7
IMP-16	0,9701 (108)	1	7
NDM	0,9958 (98)	2	6
ACICU_00593	0,9412 (134)	2	6
OXA-23	0,9894 (97)	1	7
OXA-40	0,9833 (92)	8	5
OXA-72	0,9672 (78)	1	7
OXA-58	0,9987 (91)	2	6
vanA1	0,9915 (114)	8	5
vanA2	0,9967 (87)	1	7
vanB	0,9614 (118)	1	7
vanC1	0,9937 (90)	2	6
vanC2-C3-2	0,9902 (100)	1	7
mecA	0,9890 (85)	2	6
femA SA	0,9642 (89)	2	6
femA SE	0,9492 (116)	32	4
mefA	0,8787 (79)	2	6
ermB	0,7140 (80)	1	7
ermA	0,9851 (93)	2	6
16S	0,9973 (103)	1	7

¹⁾ Die Nachweisgrenze (LOD) wurde anhand 7-stufiger Verdünnungsreihen von konzentrierten DNA-Standards getestet und bezieht sich auf das TAC-Reaktionsvolumen: GE/1 µl. Aufgrund fehlender positiv-Kontrollstäme wurden die Assays FOX, MOX/CMY, VEB, PER-1, PER-2, GES, vanC2-C3-1, qnrA und qnrB nicht in die Sensitivitätstestung einbezogen.

4.3 Untersuchung zum Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen in der Kohorte Flüchtlinge

Im Oktober 2015 konnte das entwickelte Real-Time PCR System erstmalig in Kombination mit der TaqMan® Array Card in einem Forschungsvorhaben angewendet werden. Im Rahmen einer deskriptiven Studie wurde das Vorkommen multiresistenter Erreger in einer Kohorte von Flüchtlingen untersucht, die nach Ankunft in der Erstaufnahmeeinrichtung Neumünster eine medizinische Erstuntersuchung erhielten. In einem Zeitraum von drei Wochen konnten 360 Stuhl- und 506 zusätzliche, korrespondierende Abstrich-Proben gesammelt werden. Zum Aufbau einer Kontrollkohorte wurden 100 Stuhlproben von der PopGen Biomaterialbank (FoCUS Kohorte) akquiriert, deren Alters- und Geschlechterzusammensetzung auf die Kohorte Flüchtlinge angepasst wurde. In Kapitel 3.1 werden die Probenarten und die jeweiligen Kohorten detailliert beschrieben. Im folgenden Kapitel 4.3.1 werden die Ergebnisse der TaqMan® Real-Time PCR Detektion von Antibiotikaresistenzgenen in Stuhlproben der Kohorte Flüchtlinge und der deutschen Kontrollkohorte vergleichend dargestellt. Des Weiteren wurden anhand der Ergebnisse des *next generation sequencings* des bakteriellen 16S rRNA-Gens Pathogen-Profile beider Kohorten erstellt. Um ein detaillierteres Bild von der Antibiotikaresistenz-Belastung in der Kohorte Flüchtlinge zu erhalten, wurden zusätzlich molekularbiologische Profile der bakteriellen Resistenzen und der Pathogene des inguinalen Hautareals sowie der Nasen/Rachenschleimhäute erstellt (Kapitel 4.3.2). Abschließend konnten alle Abstrich-Proben der Kohorte Flüchtlinge einem kulturbasierten Screening auf MRSA, VRE, und MRGN unterzogen werden (Kapitel 4.3.3). Die Tabelle 4-9 enthält eine Übersicht der verfügbaren molekularbiologischen und kulturbasierten Daten.

Tabelle 4-9 Übersicht der verfügbaren molekularbiologischen und kulturbasierten Daten

Herkunftsland	Anzahl	Verfügbare Daten aus Abstrich-Proben			Verfügbare Daten aus Stuhlproben	
		Kultur	TAC	16S	TAC	16S
Deutschland	100	0	0	0	94	100
Syrien	236	236	235	235	168	168
Irak	115	115	115	115	78	77
Afghanistan	95	95	95	95	70	70
Eritrea	20	20	20	20	16	16
Iran	20	20	20	20	18	18
andere ¹⁾	20	20	20	20	10	10
gesamt	606	506	505	505	454	459

¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

4.3.1 Resistenzgene und Pathogene in Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte

Die mikrobielle Flora des menschlichen Darms umfasst eine große Vielfalt von Mikroorganismen, die in Symbiose mit dem menschlichen Wirt wichtige physiologische Aufgaben übernehmen und beeinflussen. Das sogenannte Mikrobiom bildet dabei die Gesamtheit aller Gene innerhalb der physiologisch vorhandenen Mikroorganismen – Bakterien, Pilze und Archaeen. Bakterielle Gene, die eine phänotypische Resistenz gegenüber Antibiotika vermitteln, kommen dabei nicht nur in humanpathogenen Bakterien, sondern auch in fakultativ pathogenen oder gänzlich apathogenen Kommensalen vor. In diesem Kapitel werden verschiedene Antibiotikaresistenzgene und der bakterielle Teil des menschlichen Darm-Mikrobioms anhand von Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte vergleichend betrachtet. Insgesamt waren 360 und 359 Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge sowie 94 und 100 Stuhlproben aus der Kontrollkohorte einer TaqMan® Real-Time PCR Untersuchung bzw. einer 16S rRNA-Genanalyse zugänglich.

Im Folgenden werden zunächst Determinanten betrachtet, die verschiedene Resistenzen vorwiegend in grampositiven Bakterien vermitteln können. Die Makrolidresistenz-vermittelnden Gene *mefA* und *ermB* waren sowohl in der Kohorte Flüchtlinge als auch in der deutschen Kontrollpopulation hoch prävalent (99,7 % und 99,7 % vs. 95,7 % und 94,7 %). Dagegen wurden die Makrolidresistenz-Determinante *ermA* und die Methicillin-Resistenzdeterminante *mecA* mit Prävalenzen von 6,7 % und 6,1 % nur vereinzelt in den Stuhlproben der Flüchtlinge und in keiner der Stuhlproben aus der Kontrollkohorte detektiert. In Enterokokken wird eine Glycopeptid-Resistenz über verschiedene van-Gen Cluster kodiert. Varianten des vanA – Clusters konnten weder in der Kohorte Flüchtlinge noch in der Kontrollkohorte beobachtet werden. Abbildung 16 macht deutlich, dass sich die Prävalenzen der Varianten des vanB- und vanC – Clusters zum einen zwischen den verschiedenen Herkunftsländern und zum anderen zwischen den Kohorten deutlich unterscheiden. Bemerkenswert ist, dass vanB die einzige Resistenzdeterminante darstellt, die im Vergleich zur Gesamtpopulation der Flüchtlinge signifikant häufiger in der Kontrollkohorte vorkommt (9,2 % vs. 31,9 %; $p < 0,001$). Die in *Enterococcus gallinarum* intrinsisch vorkommende Variante vanC1 tritt dagegen signifikant häufiger in der Kohorte Flüchtlinge auf (15,3 % vs. 3,2 %; $p < 0,001$). Die Prävalenzen der in *Enterococcus casseliflavus* intrinsisch vorkommenden vanC2-C3 Varianten unterscheiden sich dagegen nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen.

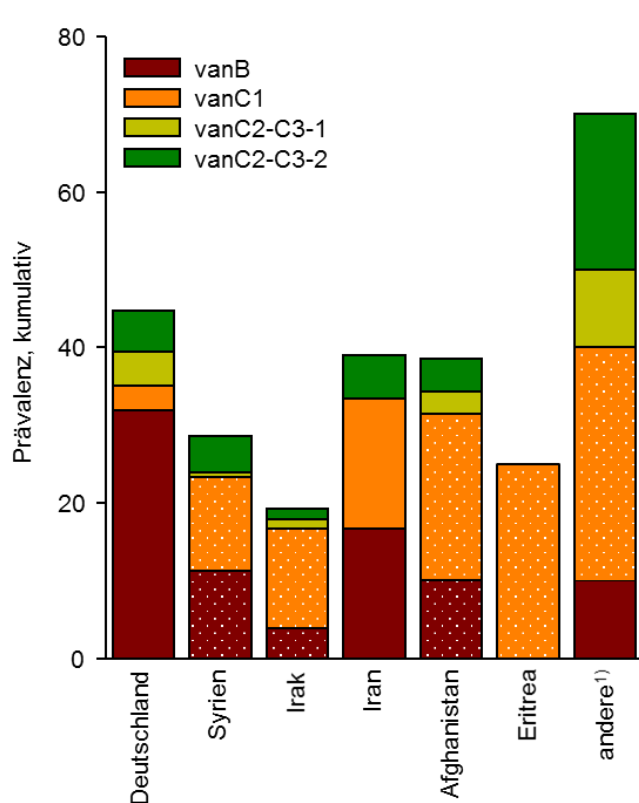


Abbildung 16 Prävalenz der Vancomycin-Resistenzgene

Das Balkendiagramm zeigt die gestapelten Prävalenzen (%) der einzelnen Resistenzgene für das entsprechende Herkunftsland. Die gepunkteten Flächen drücken einen signifikanten Unterschied der zugrundeliegenden Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz in der deutschen Kontrollgruppe aus (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,05$). Die Gene vanA1 und vanA2 wurden in keiner der untersuchten Gruppen gefunden. ¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

Auch in der Betrachtung von Resistenzgenen, die häufig klinisch relevante Antibiotikaresistenzen in gramnegativen Erregern vermitteln, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Art und der Häufigkeit der detektierten Gene zwischen den untersuchten Gruppen. In der Kohorte Flüchtlinge wurden hohe Prävalenzen für β -Lactamase Gene vom Typ *bla* TEM (88,1 %), *bla* CTX-M 1 (43,6 %), *bla* SHV (35,0 %), *bla* OXA-1 (19,4 %) sowie für Ampicillin-Resistenzdeterminanten vom Typ BIL/LAT/CMY (23,3 %), ampC (15,6 %), DHA (9,4 %), ACT/MIR (8,6 %) und ACC (6,4 %) beobachtet. Das Chinolon-resistenzvermittelnde Gen *qnrB* (28,9 %) gehört ebenfalls zu den 10 am häufigsten detektierten Resistenzdeterminanten in dieser Kohorte. In der Kontrollkohorte waren Gene vom Typ *bla* TEM (35,1 %), *bla* SHV (7,5 %) und *bla* CTX-M 1 (2,1 %) sowie BIL/LAT/CMY (16,0 %), ampC (8,5 %), ACC (6,4 %), DHA (4,3 %), und ACT/MIR 1,1 %) am häufigsten zu beobachten. Bemerkenswert ist, dass sowohl OXA-1 als auch *qnrB* in allen Herkunftsgruppen der Kohorte Flüchtlinge, nicht aber in der deutschen Kontrollgruppe auftraten. Die Abbildung 17 verdeutlicht, dass, bis auf BIL/LAT/CMY ($p = 0,08$) und ACC ($p = 0,61$), nahezu jedes dieser ESBL-codierenden Gene und das Chinolon-Resistenz-vermittelnde *qnrB* Gen signifikant häufiger in der Kohorte Flüchtlinge detektiert wurde. Selten detektierte Gene umfassen die Varianten CTX-M 2, CTX-M 9, MOX/CMY, FOX, PER-1 und *qnrA*, wobei sich nur die CTX-M 9 Prävalenzen signifikant zwischen den untersuchten Kohorten unterscheiden (5,3 % vs. 0,0%; $p < 0,05$).

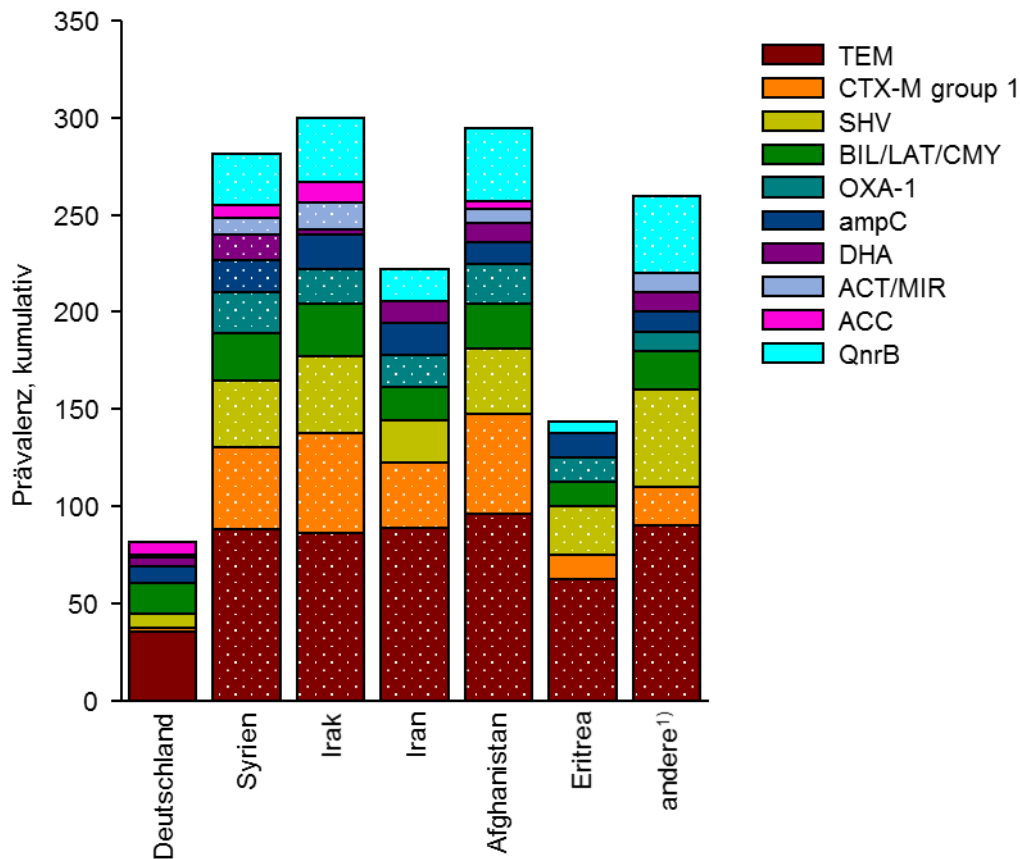


Abbildung 17 Prävalenz der 10 häufigsten Antibiotikaresistenzgene des gram-negativen Erregerspektrums

Das Balkendiagramm zeigt die gestapelten Prävalenzen (%) der einzelnen Resistenzgene für das entsprechende Herkunftsland. Die gepunkteten Flächen drücken einen signifikanten Unterschied der zugrundeliegenden Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz in der deutschen Kontrollgruppe aus (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,05$). Die Gene *qnrB* und *OXA-1* wurden nicht in der deutschen Kontrollgruppe gefunden.

¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

Carbapenemase-Gene sind klinisch hoch relevant, da sie die phänotypische Resistenz gegenüber einem Großteil aller beta-Lactam-Antibiotika inklusive der Carbapeneme vermitteln und häufig in Kombination mit anderen Resistenzen in sogenannten 4MRGN Erregern vorkommen. Sowohl in der Kohorte Flüchtlinge als auch in der Kontrollkohorte waren die Prävalenzen für Carbapenemase-Gene mit insgesamt 4,2 % und 1,1 % sehr niedrig, wobei der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant ist ($p < 0,12$). Ergänzend zu der Erhebung von Prävalenzdaten wurde auch die Zahl der Antibiotikaresistenzgene pro Individuum ermittelt und in Abbildung 18 dargestellt. Dabei wurden in der Kohorte Flüchtlinge im Mittel 6,3 Resistenzgene pro Individuum (SD: 2,30; Spannweite: 1 - 17) identifiziert. Individuen der deutschen Kontrollgruppe waren hingegen im Mittel mit 4,2 (SD: 1,43; Spannweite: 1 – 10) und somit mit signifikant weniger Resistenzgenen belastet ($p < 0,001$). Des Weiteren zeigen die Kreisdiagramme in Abbildung 18 deutlich, dass fast 90 % aller deutschen Individuen weniger als 4 Antibiotikaresistenzgene tragen, wohingegen über 50 % aller Individuen der Kohorte Flüchtlinge 5 oder mehr Antibiotikaresistenzgene tragen.

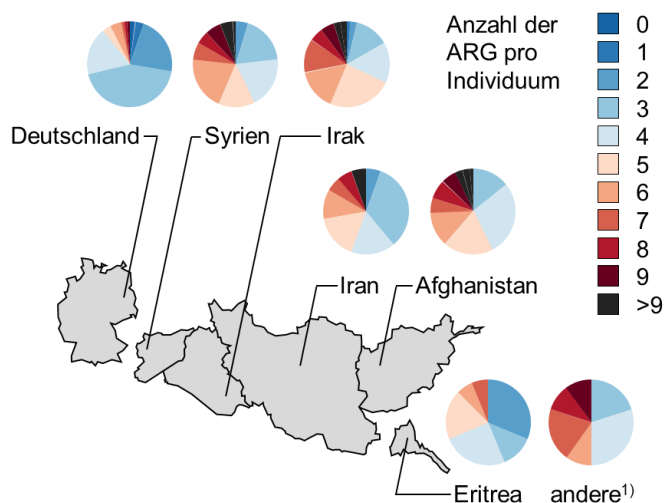


Abbildung 18 Anzahl der in den Stuhlproben detektierten Antibiotikaresistenzgene pro Individuum

Die Kreisdiagramme beschreiben welchen Anteil die Individuen mit einer bestimmten Anzahl von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) im entsprechenden Herkunftsland haben.
¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

Neben der Detektion bestimmter Antibiotikaresistenzgene mittels TaqMan® Real-Time PCR wurde auch das Darm-Mikrobiom mittels Sequenzierung der V3-V4 Region des bakteriellen 16S rRNA-Gens analysiert und ein Profil der identifizierten Pathogene erstellt. Die Abbildung 19 zeigt die Prävalenzen der in den Stuhlproben identifizierten Humanpathogene in Abhängigkeit vom jeweiligen Herkunftsland. Die Spezies *Escherichia coli* stellt das am häufigsten gefundene potentielle Pathogen sowohl in der Kohorte Flüchtlinge als auch in der Kontrollkohorte dar (87,0 % vs. 91,6 %; $p < 0,12$). Dabei ist zu beachten, dass innerhalb der Spezies *E. coli* verschiedene apthogene und pathogene Serotypen existieren, die jedoch nicht mit Hilfe der 16S rRNA-Gen Sequenzierung unterschieden werden können. Des Weiteren konnten die Spezies *Bacteroides fragilis* (Peritonitis, intraabdominelle Abzesse), *Clostridium perfringens* (Gasbrand), *Shigella dysenteriae* (Dysenterie) und *Streptococcus agalactiae* (Neugeborenen-Sepsis) in beiden Kohorten identifiziert werden. Bemerkenswert ist, dass die Spezies *B. fragilis* und *S. agalactiae* drei bzw. fünf Mal häufiger in den Stuhlproben der Kontrollgruppe vorkommen, als in der Kohorte Flüchtlinge ($p < 0,01$). Die Spezies *Klebsiella Pneumoniae* verursacht als opportunistisches Pathogen häufig nosokomiale Pneumonien und wurde in der Kohorte Flüchtlinge mit einer Prävalenz von 0,6 % nur sehr selten detektiert. Die *Staphylococcus*-Spezies *S. epidermidis*, *S. aureus* und *S. saprophyticus* sowie die Spezies *Haemophilus influenzae* wurden als Kommensalen der bakteriellen Haut- und Schleimhaut-Flora nur selten in den untersuchten Stuhlproben identifiziert.

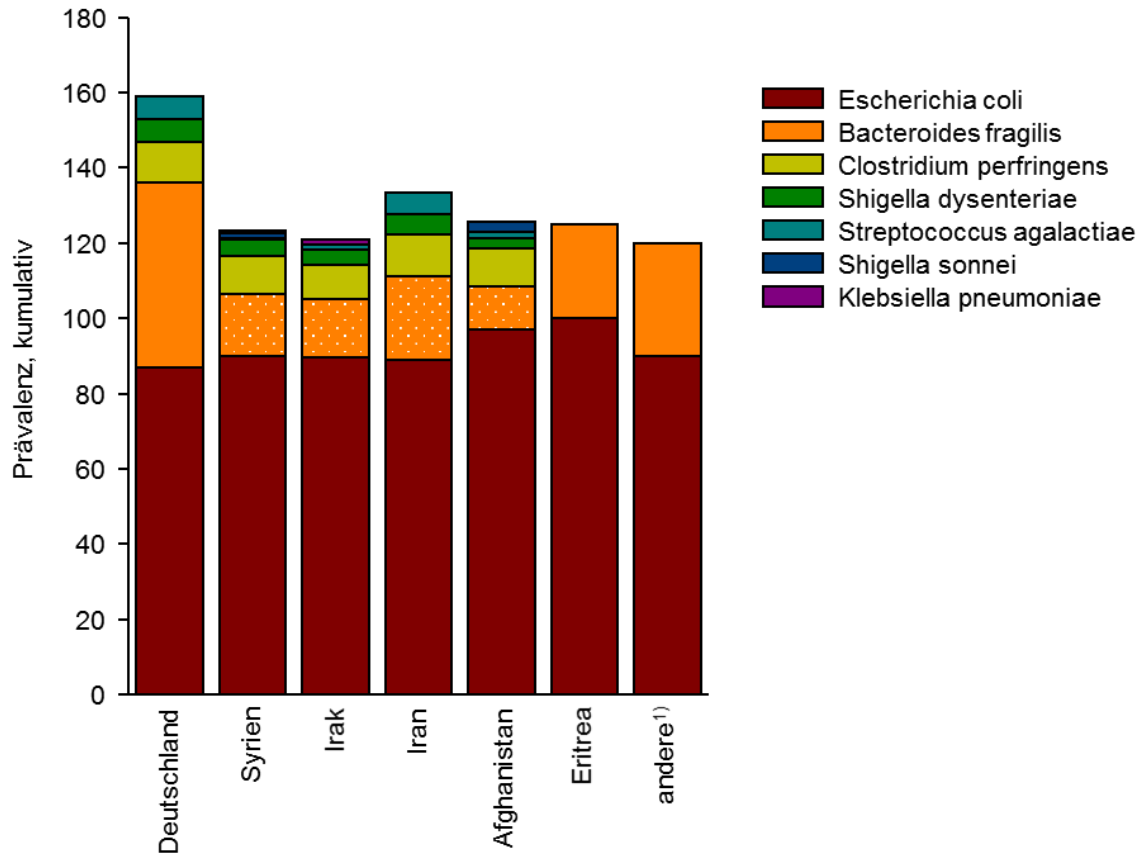
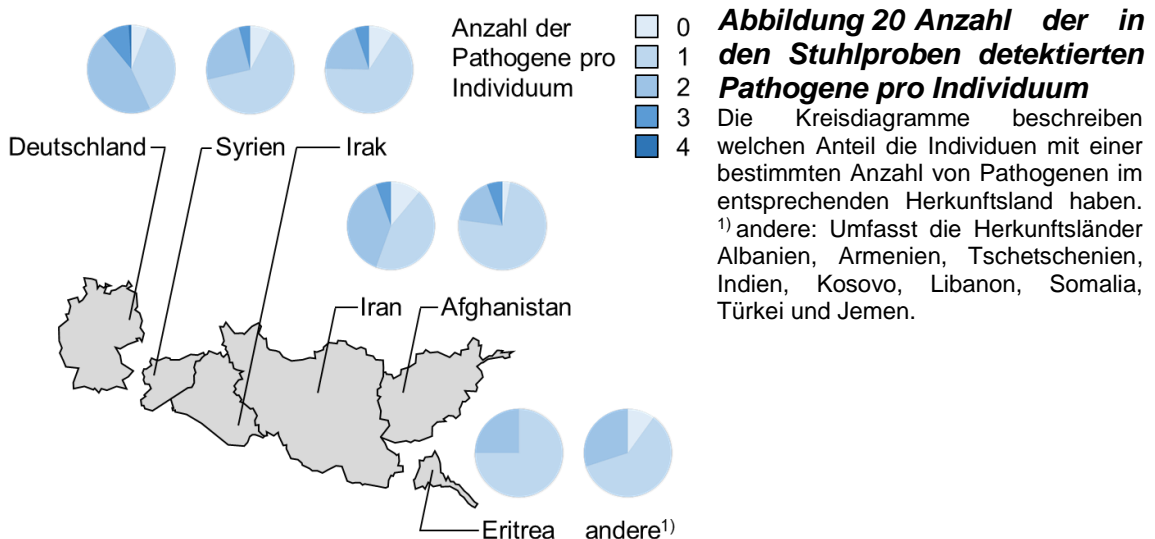


Abbildung 19 Prävalenz pathogener Bakterien in Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte

Das Balkendiagramm zeigt die gestapelten Prävalenzen (%) humanpathogener Bakterien für das entsprechende Herkunftsland. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte mittels Sequenzierung des bakteriellen 16S rRNA-Gens. Die gepunkteten Flächen drücken einen signifikanten Unterschied der zugrundeliegenden Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz in der deutschen Kontrollgruppe aus (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,05$). Die Spezies *Klebsiella pneumoniae* und *Shigella sonnei* wurden nicht in der deutschen Kontrollgruppe gefunden. ¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

In Abbildung 20 wird deutlich, dass 57 % der deutschen Individuen mehr als 1 Pathogen tragen, wohingegen mehr als 73 % der Individuen aus der Kohorte Flüchtlinge höchstens 1 Pathogen tragen.



Zusammenfassend lassen sich die Beobachtungen in 3 Kategorien unterteilen. Erstens, treten die Makrolid-Resistenzgene *mefA* und *ermB* sowie die Ampicillin-Resistenzdeterminante BIL/LAT/CMY in beiden Kohorten ähnlich häufig auf. Zweitens, wurden die Resistenzgene des *vanB* Clusters signifikant häufiger in der deutschen Population beobachtet. Drittens, ein Großteil der detektierten ESBL-vermittelnden Gene sind in der Kohorte Flüchtlinge signifikant häufiger aufgetreten, wobei die beobachteten Prävalenzen bis zu 20-fach über denen der Kontrollkohorte lagen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Determinanten, die Resistenzen gegenüber Carbapenemen vermitteln, insgesamt sehr selten in beiden Gruppen vorkommen. Bemerkenswert ist, dass die Zahl der Resistenzgene pro Individuum in der Kohorte Flüchtlinge signifikant höher ist, wohingegen die Zahl der Pathogene pro Individuum in der deutschen Kohorte größer ist. Dieser Umstand legt nahe, dass sowohl das Vorhandensein als auch die Häufigkeit von Resistenzgenen pathogenunabhängig sind.

4.3.2 Resistenzgene und Pathogene in Abstrich-Proben des inguinalen Hautareals und der nasalen Schleimhäute

Insgesamt waren 505 Abstrich-Proben einer TaqMan® Real-Time PCR Analyse zur Detektion verschiedener Antibiotikaresistenzgene zugänglich. Im Mittel wurden 4,4 Antibiotikaresistenzgene pro Individuum (SD 0,91; Spannweite 1 – 9) in der Kohorte Flüchtlinge detektiert, wobei sich die Zahl der Resistenzgene pro Individuum in den verschiedenen Herkunftsländern nicht signifikant unterscheidet. Die Tabelle 4-10 fasst die Prävalenzen der detektierten Resistenzgene bezogen auf die jeweiligen Herkunftsländer zusammen.

Tabelle 4-10 Prävalenz von Antibiotikaresistenzgenen in kombinierten Abstrich-Proben der Nasenvorhöfe, des Rachens und der Leistenregion

	Prävalenz in % (absolutes Vorkommen)					
	Syrien (235)	Irak (115)	Iran (20)	Afghanistan (95)	Eritrea (20)	andere ¹⁾ (20)
ESBL-Gene						
TEM	29,4 (69)	27,8 (32)	20,0 (4)	16,8 (16)*	20,0 (4)	25,0 (5)
SHV	6,8 (16)	7,0 (8)	-	6,3 (6)	-	10,0 (2)
CTX-M 1	1,3 (3)	6,1 (7)*	5,0 (1)	2,1 (2)	-	-
BIL/LAT/CMY	2,6 (6)	0,9 (1)	-	4,2 (4)	-	5,0 (1)
MOX/CMY	2,6 (6)	0,9 (1)	-	-	-	-
OXA-1	0,9 (2)	0,9 (1)	-	1,1 (1)	-	-
PER-1	1,3 (3)	-	-	-	-	-
ampC	1,3 (3)	-	-	-	-	-
ACC	0,9 (2)	0,9 (1)	-	-	-	-
qnrB	0,4 (1)	-	-	1,1 (1)	-	-
CTX-M 2	0,4 (1)	-	-	-	-	-
DHA	-	0,9 (1)	-	-	-	-
Carbapenem-Resistenzgene						
OXA-58	2,6 (6)	0,9 (1)	-	5,3 (5)	-	-
OXA-48	1,3 (3)	0,9 (1)	-	1,1 (1)	-	-
OXA-40	1,3 (3)	1,7 (2)	-	-	-	-
IMP-2	1,3 (3)	-	-	1,1 (1)	-	5,0 (1)
OXA-23	0,9 (2)	0,9 (1)	-	-	-	-
IMP-1	0,4 (1)	-	-	-	-	-
NDM	-	0,9 (1)	-	-	-	-
Makrolid- und Methicillin-Resistenzgene						
mefA	100,0 (235)	100,0 (115)	100,0 (20)	100,0 (95)	95,0 (19)	95,0 (19)
ermB	99,6 (234)	100,0 (115)	90,0 (18)*	97,9 (93)	80,0 (16)***	85,0 (17)**
mecA	90,2 (212)	93,9 (108)	95,0 (19)	85,3 (81)	90,0 (18)	70,0 (14)*
ermA	3,0 (7)	2,6 (3)	-	6,3 (6)	-	5,0 (1)

¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen. Vancomycin-Resistenzgene sind nicht dargestellt, da keine der untersuchten Varianten detektiert wurde. Signifikante Unterschiede der Prävalenzen in den einzelnen Herkunftsländern im Vergleich zur Prävalenz in Syrischen Flüchtlingen sind mit einem Stern gekennzeichnet. (Exakter Test nach Fisher; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Demnach sind Determinanten wie *mefA*, *ermB* oder *mecA*, die Resistenzen gegenüber Makrolid-Antibiotika bzw. beta-Lactam-Antibiotika in grampositiven, pathogenen oder apathogenen Kommensalen der Haut-Flora vermitteln, die am häufigsten detektierten Gene. Des Weiteren gehören die hauptsächlich in gramnegativen Stäbchen vorkommenden β -Lactamase-Gene *bla* TEM, *bla* SHV, *bla* BIL/LAT/CMY, *bla* MOX/CMY und *bla* CTX-M 1 zu den Resistenzgenen mit der höchsten Prävalenz in den Abstrich-Proben der Kohorte Flüchtlinge. Die chromosomal- oder plasmidisch-kodierten OXA-ähnlichen β -Lactamasen OXA-58, OXA-40 und OXA-23 vermitteln häufig eine phänotypische Carbapenem-Resistenz im gramnegativen, opportunistischen Pathogen *Acinetobacter baumannii* und wurden in 2,4 %, 1,0 % und 0,6 % der Abstrich-Proben gefunden. Weitere Carbapenemase-Gene, wie *bla* OXA-48, *bla* NDM-1, *bla* IMP-2 und *bla* IMP-1, wurden nur sporadisch detektiert.

Zusätzlich zur der Detektion von Resistenzgenen wurde ein Pathogen-Profil der bakteriellen Flora der Haut und der Schleimhäute mittels 16S rRNA-Gen Sequenzierung erstellt (Tabelle 4-11). Demnach wurden die fakultativ pathogenen Spezies *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus epidermidis* als Bestandteile der natürlichen Kolonisationsflora der Haut und der Schleimhäute mit einer Gesamtprävalenz von 91,1 % bzw. 76,8 % am häufigsten identifiziert.

Tabelle 4-11 Prävalenz pathogener Erreger in Abstrich-Proben aus der Kohorte Flüchtlinge basierend auf einer 16S rRNA-Gen Analyse

	Prävalenz in % (absolutes Vorkommen)					
	Syrien (235)	Irak (115)	Iran (20)	Afghanistan (95)	Eritrea (20)	andere ¹⁾ (20)
<i>Haemophilus influenzae</i>	94,9 (223)	84,3 (97)**	85,0 (17)	91,6 (87)	95,0 (19)	85,0 (17)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	80,4 (189)	74,8 (86)	60,0 (12)*	74,7 (71)	80,0 (16)	70,0 (14)
<i>Escherichia coli</i>	14,5 (34)	13,0 (15)	10,0 (2)	21,1 (20)	20,0 (4)	15,0 (3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,6 (25)	13,0 (15)	10,0 (2)	18,9 (18)*	10,0 (2)	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,4 (8)	2,6 (3)	5,0 (1)	5,3 (5)	10,0 (2)	5,0 (1)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,0 (7)	3,5 (4)	20,0 (4)**	3,2 (3)	-	5,0 (1)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4,3 (10)	2,6 (3)	-	1,1 (1)	-	10,0 (2)
<i>Legionella pneumophila</i>	2,6 (6)	0,9 (1)	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	0,9 (1)	-	-	-	-

¹⁾ andere: Umfasst die Herkunftsländer Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen. Die Tabelle zeigt die Prävalenzen (%) von humanpathogenen Bakterien für das entsprechende Herkunftsland. Die Sterne drücken einen signifikanten Unterschied der zugrundeliegenden Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz in der syrischen Population aus (Exakter Test nach Fisher; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Staphylococcus aureus, als potentiell pathogener Kommensale, dessen Isolate Multiresistenz aufweisen können (MRSA), wurde in 12,3 % der Abstrich-Proben identifiziert. Des Weiteren konnten fakultativ pathogene Spezies der normalen Darmflora wie *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* und *Streptococcus agalactiae* in 15,4 %, 4,0 % und 3,8 % der Abstrich-Proben identifiziert werden. Bemerkenswert ist, dass sich die Prävalenzen der verschiedenen Pathogene in den einzelnen Herkunftsländern im Vergleich zur größten Gruppe Syrien nur selten signifikant unterscheiden. Am prominentesten ist zum einen die Spezies *S. aureus*, die in Flüchtlingen afghanischer Herkunft fast doppelt so häufig und die Spezies *S. agalactiae*, die in Flüchtlingen iranischer Herkunft mehr als sechsmal so häufig identifiziert wurden.

4.3.3 Kulturbasierte Detektion resistenter Pathogene

Aus der Kohorte Flüchtlinge konnten insgesamt 506 Abstrich-Proben in das kulturbasierte Screening auf das Vorhandensein von MRSA, VRE, ESBL und CRE einbezogen werden. Tabelle 4-12 fasst die Prävalenzen der untersuchten multiresistenten Erreger in der Kohorte Flüchtlinge zusammen. Von den 506 untersuchten Flüchtlingen waren 6,3 % (n = 32; 95% CI: 3,8 % - 8,8 %) mit MRSA und 1,6 % (n = 8; 95% CI: 0,1 % - 3,1 %) mit ESBL kolonisiert, wohingegen Carbapenem-resistente Enterobakterien oder Vancomycin-resistente Enterokokken nicht beobachtet wurden. Die MRE-Gesamtprävalenz beträgt somit in der untersuchten Kohorte 7,9 % (n = 40; 95% CI: 5,2 % - 10,7 %). Bei den ESBL-produzierenden Enterobakterien handelt es sich um Isolate von *Escherichia coli* (n = 3), *Klebsiella pneumoniae* (n = 3) und *Proteus mirabilis* (n = 2). Des Weiteren ist ein *E. coli* Isolat zusätzlich resistent gegenüber Fluorchinolon-Antibiotika und somit formal als 3MRGN Erreger zu klassifizieren.

Tabelle 4-12 Prävalenz multiresistenten Erreger in der Kohorte Flüchtlinge

	Prävalenz in % (absolutes Vorkommen)				
	gesamt (506)	Syrien (235)	Irak (115)	Afghanistan (95)	andere ¹⁾ (61)
MRSA	6,3 (32)	6,8 (16)	9,6 (11)	3,2 (3)	3,3 (2)
ESBL	1,6 (8)	1,7 (4)	2,6 (3)	1,1 (1)	-
CRE	-	-	-	-	-
VRE	-	-	-	-	-

Die gesammelten Prävalenzdaten basieren auf einen kombinierten Nasen/Rachen-Abstrich und einem separaten Abstrich der linken und rechten Leistenregion. Beide Abstrich-Tupfer wurden zu einer Probe vereinigt. ¹⁾ Die Spalte „andere“ umfasst die Herkunftsländer Eritrea, Iran, Albanien, Armenien, Tschetschenien, Indien, Kosovo, Libanon, Somalia, Türkei und Jemen.

5 Diskussion

5.1 Erforderliche Voraussetzungen zur Detektion von Antibiotikaresistenzgenen im klinischen Umfeld

Ziel eines MRE-Screenings ist es, infizierte oder asymptomatisch besiedelte Patienten möglichst frühzeitig zu identifizieren und anschließend eine gezielte Ergreifung von Hygienemaßnahmen zu ermöglichen, die einer Übertragung auf andere Patienten und einer Ausbreitung in der Klinik entgegenwirken. Neue Real-Time PCR basierte Methoden sind in der Lage, die resistenzvermittelnden Gene der MRE kulturunabhängig, innerhalb kürzester Zeit sowie mit hoher Sensitivität direkt aus Probenmaterial nachzuweisen und bieten somit den Vorteil einer erheblichen Zeitersparnis gegenüber konventionellen kulturbasierten Methoden. Die Leistungsfähigkeit eines molekularbiologischen Tests wird, gemessen an der Sensitivität, im erheblichem Maße durch präanalytische Schritte, wie der Probennahme und der Probenaufbereitung, beeinflusst [107,169,170]. In Abhängigkeit vom bevorzugten Siedlungsort einzelner Bakteriengattungen müssen entsprechende Körperareale ausgewählt und untersucht werden [36,38]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Sensitivität nicht nur von der Durchführung des Abstriches, sondern auch vom verwendeten Tupfermaterial und dessen Transportmedium beeinflusst wird [171–173]. Um das Probenmaterial einer Real-Time PCR Untersuchung zugänglich zu machen, müssen zum einen anhaftende Bakterien abgelöst und zum anderen die bakterielle DNA freigesetzt und isoliert werden. Es existiert eine Vielzahl von verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden, die sich hinsichtlich Arbeits- und Zeitaufwand sowie Kosten und Extraktionseffizienz unterscheiden. Die Auswahl einer geeigneten Methode sollte sich dementsprechend an der Kompatibilität mit der nachfolgenden Real-Time PCR und dem beabsichtigten Einsatzgebiet des Testsystems orientieren. Die Auswahl geeigneter Probenahmeorte (Kapitel 5.1.1), die effiziente Extraktion bakterieller DNA (Kapitel 5.1.2) und die Kompatibilität zur nachgeschalteten TaqMan® Real-Time PCR (Kapitel 5.1.3) beeinflussen folglich die Sensitivität und Spezifität des gesamten Testsystems und sind somit Voraussetzungen für die Anwendung im klinischen Umfeld.

5.1.1 Auswahl geeigneter Probenahmeorte

Das vorgestellte TaqMan® Real-Time PCR System in Kombination mit der entsprechenden Probenahme und Probenaufbereitung ist so konzipiert, dass eine schnelle, direkte und parallele Detektion bakterieller Antibiotikaresistenzgene in den Problemkeimen MRSA, VRE und MRGN möglich ist. Des Weiteren stand die klinische Verwendbarkeit als Screeningtest zur schnellen Identifizierung asymptomatischer MRE-Träger im Mittelpunkt der Entwicklung. Angefangen bei der Probennahme, sollte sich diese an den geltenden Empfehlungen für die schnelle Verdachtsuntersuchung (Screening) von Patienten auf MRE orientieren. Sowohl für kulturbasierte, als auch für molekularbiologische Methoden, werden vorwiegend nicht invasive Abstriche von

Körperoberflächen und Körperhöhlen verwendet. Je nach Bakterienspezies sind dabei verschiedene Areale zu berücksichtigen. Für das MRSA-Screening werden entsprechend der KRINKO-Empfehlungen Abstriche der Nasenvorhöfe und des Rachens, einzeln oder in Kombination, sowie ein Abstrich von vorhandenen Wunden empfohlen [36]. Da Enterokokken und Enterobakterien Bestandteil der intestinalen Flora sind, werden für das Screening auf MRGN und VRE Perianal- oder Rektalabstriche, sowie Abstriche vorhandener Wunden empfohlen [38]. Für den Nachweis der Besiedelung mit resistenten Nonfermentern wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Acinetobacter baumannii* werden zusätzlich großflächige Abstriche der Haut sowie Proben des tieferen Respirationstrakts gefordert. In Orientierung an diesen Vorgaben wurde die Probenahme für das Screening in der Kohorte stationäre Patienten so konzipiert, dass die Nasenvorhöfe und die Rachenschleimhaut sowie das perianale Hautareal abgebildet werden. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die gleichzeitige Beprobung verschiedener anatomischer Areale die Sensitivität für die Detektion einer MRE-Kolonisation erheblich erhöht [173–175]. Sowohl Probenmaterialien des tieferen Respirationstraktes, wie z.B. Sputum oder Trachealsekret, als auch Stuhlproben sind in der Regel im Rahmen eines Screenings nicht uneingeschränkt akquirierbar und konnten daher nicht im Probenumfang berücksichtigt werden. Im Rahmen der Untersuchung zum Vorkommen von MRE in der Kohorte Flüchtlinge wurde aus ethischen Gründen der perianale Abstrich durch einen Abstrich der linken und rechten Leistenregion ersetzt. Obwohl die Kolonisationsdichte von Enterobakterien und Enterokokken im Leistenbereich geringer ist, konnten Stier *et al.* zeigen, dass die Sensitivität für die MRE-Detektion mittels Leistenabstrich im Vergleich zum Perianal-Abstrich 92 % beträgt und somit der Leistenabstrich eine akzeptable Alternative für die Detektion von VRE und MRGN darstellt [172].

5.1.2 Vom Abstrich zur PCR-kompatiblen Untersuchungslösung

Abstrich-Proben zum Screening auf multiresistente Erreger werden in Abhängigkeit von der nachgeschalteten Untersuchungsmethode unterschiedlich aufgearbeitet. Während bei einer klassischen mikrobiologischen Untersuchung Nähr- und Anreicherungsmedien direkt mit dem Tupfer inokuliert werden können, müssen derartige Proben für molekularbiologische Nachweise häufig aufwändig vorbereitet werden, um die DNA der anhaftenden Bakterien freizusetzen, zu reinigen und zu konzentrieren. Sowohl krude Zellyse-Methoden, als auch automatisierte oder nicht automatisierte DNA Extraktionsmethoden, beruhen auf der Freisetzung bakterieller DNA durch thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Zellyse-Verfahren sowie deren Kombinationen [176]. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden vier verschiedene DNA-Extraktionsmethoden vergleichend untersucht. Im Fokus des Vergleichs standen dabei der zeitliche und apparative Aufwand, die Extraktionseffizienz, d.h. die Menge der freigesetzten bakteriellen DNA, und die Kompatibilität mit der nachfolgenden TaqMan® Real-Time PCR.

Das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) ist für die DNA-Isolierung aus verschiedenen Probenmaterialien geeignet und wurde häufig für die Untersuchung diverser Bakterienspezies in klinischen Proben verwendet [65,177,178]. Die Zellyse erfolgt hier durch eine Kombination aus chemischer Aufspaltung in einem Lysepuffer, der laut Hersteller unter anderem chaotrope Salze enthält, und enzymatischem Verdau mittels Lysozym und/oder Lysostaphin. Die freigesetzte DNA wird anschließend mittels verschiedener Puffer an Silica-Membranen gewaschen und konzentriert. Die enzymatische Lyse nutzt ebenfalls eine Kombination aus beiden Enzymen in Gegenwart nicht-ionischer Tenside und EDTA, jedoch wird hier auf die aufwändige DNA-Isolierung verzichtet. Variationen dieser Methode werden ebenfalls häufig für die DNA Extraktion aus unterschiedlichen Bakterienspezies verwendet [179–182]. Die thermische Lysemethode, angelehnt an das von Reischl *et al.* vorgeschlagene Protokoll [183], basiert auf einem thermischen Zellaufschluss in Gegenwart nicht-Ionischer Tenside und EDTA und wurde bereits für die Lyse verschiedener Bakterienspezies verwendet [184,185]. Die mechanische Lysemethode beruht hingegen auf dem Aufbrechen der bakteriellen Zellen mittels *bead beating*, d.h. die Zellen werden durch den Eintrag kinetischer Energie mechanisch zwischen Glas und Keramikperlen unterschiedlicher Größe aufgerieben [150].

Die Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass das QIAamp DNA Mini Kit bei hohen Ausgangskeimzahlen signifikant mehr bakterielle DNA aus *S. aureus* freisetzt, wobei die Überlegenheit mit abnehmender Bakterienkonzentration verloren geht. Die Abnahme der freigesetzten DNA-Menge bei abnehmender Ausgangskeimzahl ist wahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass Extraktionskits in der Regel für die Gewinnung hochreiner DNA in großen Mengen im Mikrogrammbereich und nicht primär für eine Spurenanalytik ausgelegt sind. Sowohl die thermische als auch die enzymatische Lysemethode, als schnell und einfach zu handhabende Protokolle, konnten Mengen an bakterieller DNA aus *S. aureus* und *E. coli* freisetzen, die sich bei Ausgangskeimzahlen

von 10^4 KBE und 10^2 KBE pro Extraktion nicht signifikant von der QIAamp Methode unterscheiden. Frühere Untersuchungen weisen auf speziesabhängige Unterschiede in der Extraktionseffizienz hin, da u.a. grampositive Bakterienspezies aufgrund einer zusätzlichen Mureinhülle in der bakteriellen Zellwand, bestehend aus Peptidoglycanen, schwerer lysierbar sind, als gramnegative Spezies [186]. In dieser vergleichenden Untersuchung konnten jedoch sowohl für den grampositiven als auch für den gramnegativen Modellstamm vergleichbare DNA-Mengen freigesetzt werden, obwohl im Rahmen der enzymatischen Lyse und der QIAamp Methode Lysozym und Lysostaphin zum enzymatischen Verdau der Peptidoglycanschichten grampositiver Bakterien eingesetzt wurden. Bezogen auf die DNA-Extraktionseffizienz war somit keine der 4 Methoden klar den anderen überlegen.

Eine schnelle und unkomplizierte Probenvorbereitung ist Grundlage und Voraussetzung für eine patientennahe Anwendung sowie eine schnelle Befundstellung. Hinsichtlich des Arbeits- und Zeitaufwandes ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede. Bedingt durch die zusätzliche Aufreinigung und Konzentrierung der extrahierten DNA an Silica Membranen und die Verwendung mehrerer Puffer- und Enzym Lösungen ist das QIAamp DNA Mini Kit Protokoll am aufwändigsten. Hier sind die thermische, die enzymatische und die mechanische Lyse klar überlegen, da die Proben in einem Ein-Gefäß-Ansatz lediglich mit einzelnen Bestandteilen des Lyse-Systems versetzt und direkt lysiert werden. Die mechanische Lyse stellt hierbei die Methode mit dem geringsten Arbeits- und Zeitaufwand da, jedoch werden zusätzliche Precellys Kits und ein MagnaLyser zum Eintrag der kinetischen Energie benötigt.

Eine hohe Zahl an Arbeits- und Pipettierschritten im QIAamp Protokoll birgt zudem die Gefahr der DNA-Kontamination durch Verschleppung oder Eintrag von außen. Bei enzymatischen Lysemethoden kommen häufig Enzyme wie Lysozym, Lysostaphin oder Achromopeptidase zum Einsatz, die in erster Linie zum effektiven Aufbrechen der Peptidoglycanschichten in den Zellwänden grampositiver Bakterien, wie z.B. *S. aureus*, dienen [149,187]. Da diese Enzyme selbst bakterielle Produkte darstellen bzw. rekombinant aus Bakterien gewonnen werden, besteht die Gefahr einer Kontamination mit bakterieller DNA und somit einer Beeinflussung einer Mikrobiom-Analyse mittels 16S rRNA-Gen Sequenzierung [188].

5.1.3 Konzeptionierung und Kompatibilität des Probenahmesystems

Die Entscheidung für die thermische Lyse als DNA-Extraktionsmethode der Wahl basiert auf der vergleichenden Untersuchung anhand von Referenzstämmen in Reinkultur und klammerte bisher den inhibitorischen Einfluss der zugrundeliegenden Probenmatrix und somit die Kompatibilität mit der TaqMan® Real-Time PCR aus. Mit jedem Tupfer werden nicht nur die zu detektierenden Bakterien aufgenommen, sondern der überwiegende Teil des anhaftenden Biomaterials besteht aus Körpersekreten und Partikeln des Patienten. Menschliche Probenmaterialien bedingen somit eine komplexe Probenmatrix, die neben den zu detektieren Bakterien viele Stoffe enthält, die die Amplifikation der Ziel-DNA inhibieren und somit den Test stören können.

Anhand der in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Ergebnisse, konnte das Liquid-Stuart Transportmedium des Transystem™ Tupfers als stärkste inhibierende Komponente des Probenahmesystems identifiziert werden, wobei die verschiedenen Abstrichorte, einzeln betrachtet, unterschiedlich stark mit einer PCR-Inhibition assoziiert sind. Problematische Bestandteile der Probenmatrix sind dabei vor allem das Häm im Blut sowie Gallensalze und komplexe Polysaccharide in Faeces [106,107], die mit dem Tupfer vom perianalen Hautareal aufgenommen wird. Da alle Abstriche mit Hilfe des Transsystems™ entnommen wurden, kann nicht explizit unterschieden werden, wie stark das anhaftende Biomaterial der unterschiedlichen Körperareale die PCR inhibiert. Da jedoch die Extrakte mit Biomaterial tendenziell und im Falle des Leistenabstichs sogar signifikant weniger PCR-Inhibition im Vergleich zum sterilen Tupfer allein zeigen, ist davon auszugehen, dass die Inhibition durch anhaftende Körpersekrete zu vernachlässigen ist.

Die meisten Tupfersysteme nutzen flüssige oder mit Agarose verfestigte Minimalnährmedien, die die Vermehrungsfähigkeit und Kultivierbarkeit der anhaftenden Bakterien sicherstellen. Das hier verwendete Liquid-Stuart Medium enthält unter anderem Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumsalze, die konzentrationsabhängig die DNA-Amplifikation inhibieren. Da auch alle Agarose-enthaltenden Erhaltungsmedien nicht für den direkten PCR-Einsatz geeignet sind [189] und die Viabilität der anhaftenden Bakterien eine Voraussetzung für die parallele kulturbasierte Untersuchung darstellt, wurden verschiedene Saline Lösungen als alternative Transportmedien [190] auf die PCR-Kompatibilität hin untersucht, wobei sich eine 0,85%ige Natriumchloridlösung allein und in Kombination mit dem Lysepuffer als geeignet für die Real-Time PCR erwies. Zusätzlich können auch bei der eigentlichen Freisetzung und Aufreinigung der DNA PCR-Inhibitoren eingetragen werden. Bestandteile eines Extraktionsprotokolls, wie ionische Tenside (SDS), organische Moleküle (EDTA) und bakteriolytische Enzyme (Proteinase K, Lysozym, Lysostaphin), werden häufig für eine effektive Zellyse eingesetzt und können in Abhängigkeit von der verwendeten *Taq*-Polymerase bereits in geringen Konzentrationen inhibitorischen Einfluss auf die PCR haben [106]. Der hier verwendete Lysepuffer wurde bereits für den direkten PCR-Einsatz erfolgreich verwendet [140,184] und zeigte, separat betrachtet, einen geringen inhibitorischen Einfluss auf die nachgeschaltete Real-Time PCR. Diese grundlegende Kompatibilität mit der TaqMan® Real-Time PCR Chemie im Allgemeinen und im Besonderen die Kompatibilität mit der verwendeten AmpliTaq® DNA Polymerase ermöglicht somit die direkte Verwendung der resultierenden DNA-Extrakte.

In der Zusammenschau der Betrachtungen (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3) erweist sich die thermische Lyse, angelehnt an das Protokoll von Reischl *et al.*, als Methode der Wahl für die schnelle und einfache DNA-Extraktion aus klinischen Proben, die auf Abstriche der Nasenvorhöfe und des Rachens sowie des perianalen Hautareals basieren. Die schnelle und einfache Handhabung, die geringe Kontaminationsgefahr und die vergleichbare DNA-Extraktionseffizienz sowie Kompatibilität mit der nachfolgenden TaqMan® Real-Time PCR bedingen somit eine mögliche Vor-Ort-Anwendung im klinischen Umfeld.

5.2 Entwurf eines molekularbiologischen Tests zur kulturunabhängigen Detektion von Antibiotikaresistenzgenen

Der schnellen und sicheren Detektion einer Besiedelung oder einer Infektion mit multiresistenten Erregern kommt eine Schlüsselrolle in der zukünftigen Diagnostik zu. Je früher die Information über einen Erreger zugänglich ist, desto früher kann eine kalkulierte auf eine gezielte Antibiotikatherapie umgestellt oder eine vorsorgliche Isolierung aufgehoben werden. Kulturbasierte Methoden stellen momentan den Goldstandard für den Nachweis multiresistenter Erreger dar, wobei die Geschwindigkeit dieser Diagnostik durch die Kultivierbarkeit und die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien limitiert ist. In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Erreger sind entsprechende mikrobiologische Befunde frühestens nach 18 h bis 72 h möglich, wobei die vorläufigen Ergebnisse oft durch einen zusätzlichen Test bestätigt werden müssen [92,97]. Neue molekularbiologische Methoden sind kulturunabhängig und haben das Potential, pathogene Erreger und deren Resistenzdeterminanten innerhalb weniger Stunden direkt aus Screening-Proben zu detektieren. Zu den vielversprechendsten molekularbiologischen Methoden zum Nachweis und zur Identifikation von Antibiotikaresistenzen bzw. deren genetischer Determinanten zählen u.a. Hybridisierungs-Mikroarrays, verschiedene PCR-basierte Verfahren, Massenspektroskopische Verfahren wie MALDI-TOF-MS oder ESI-TOF-MS und DNA-Sequenzierungsverfahren wie das *next generation sequencing* [99,108]. Die Vor- und Nachteile einzelner Technologien werden später im Abschnitt 5.4.6, mit Fokus auf die hier ausgewählte PCR-Technologie, diskutiert.

Diese Arbeit hatte zum Ziel ein TaqMan® Real-Time PCR System zu erarbeiten, dass in Kombination mit einer schnellen und einfachen Probenaufarbeitung in der Lage ist, Resistenzdeterminanten der vier wichtigsten Problemkeime direkt aus Screening-Proben zu detektieren. Aktuell existiert eine Vielzahl laborinterner oder kommerzieller Real-Time PCRs, die eine separate Detektion von MRSA [92,93,100], VRE [101] und ESBL bzw. CRE [102–105] mit hohen Sensitivitäten und Spezifitäten im Vergleich zu klassischen mikrobiologischen Methoden ermöglichen und mit Testzeiten von 2 h – 6 h wesentlich schneller sind. Die Detektion von ESBL- oder Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien und Nonfermentern aus Screening-Abstrichen stellt aufgrund der hohen Variabilität der zugrundeliegenden β -Lactamase-Gene weiterhin eine besondere Herausforderung dar, wobei die bisherigen Real-Time und Mikroarray Systeme lediglich wenige, klinisch hochrelevante Varianten der Resistenzgene *bla* KPC, *bla* NDM, *bla* IMP, *bla* VIM und *bla* OXA-48 fokussieren [108,191]. Die gleichzeitige Detektion möglichst vieler Problemkeime, inklusive der wichtigsten ESBL- und CRE-Determinanten, ist jedoch sinnvoll, da die Besiedelung mit verschiedenen MRE mit den gleichen Risikofaktoren assoziiert sind [35]. Die Auswahl und der Umfang der Ziel-Gene und die Möglichkeit der parallelen Detektionen von MRSA, VRE, ESBL und CRE stellen somit die größte Limitierung der bisherigen Real-Time PCR basierten Systeme dar. Bis heute wurde in der wissenschaftlichen Literatur lediglich über einen Mikroarray-basierten NanoChip® ICP Test berichtet, der die simultane Detektion von MRSA, VRE und

Carbapenem-resistenten *Klebsiella* spp. aus einer Probe ermöglicht. In einer prospektiven Studie konnte eine Sensitivität und Spezifität des Gesamttests von 91,1 % und 99,5 % im Vergleich zum kulturbasierten Screening erreicht werden, wobei entsprechende Testresultate nach 5,5 h verfügbar waren [192]. Allerdings ist die Detektion von *bla* KPC als einziges Carbapenemase-Gen eine Limitierung des Nanochips, da andere, häufig in Deutschland vorkommende Gene, wie *bla* OXA-48, *bla* VIM-1 und *bla* NDM-1, unberücksichtigt bleiben [75].

TaqMan® Array Cards, ursprünglich für die Genexpressionsanalyse entwickelt, wurden bereits erfolgreich für die Detektion von Biokampfstoffen sowie respiratorischen und intestinalen Pathogenen verwendet [193–195]. Die Mikrofluidik-Architektur der Array Cards ermöglicht die parallele und quantitative Untersuchung von bis zu 48 Ziel-Genen in acht verschiedenen Untersuchungsproben. Der Einsatz zur Detektion bakterieller Resistenzgene direkt aus klinischen Proben wurde bisher noch nicht beschrieben und birgt das Potential einige der oben genannten Limitierungen zu überwinden. Die Resistenzgen-Auswahl spielt dabei eine Schlüsselrolle und sollte unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz und der lokalen Epidemiologie einzelner Resistenzen erfolgen. In den folgenden Abschnitten werden die Kriterien zur Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ziel-Gene für MRSA, VRE, MRGN und Makrolid-resistente Streptokokken dargelegt und diskutiert.

5.2.1 Der molekularbiologische Nachweis von MRSA

Der PCR-basierte Nachweis des *mecA*-Gens, welches das, für die Methicillin-Resistenz verantwortliche, Penicillin-bindende Protein 2a kodiert, gilt als Goldstandard für die Bestätigung einer kulturell bestimmten phänotypischen Resistenz in Staphylokokken [196]. Weil *mecA* jedoch sowohl in *S. aureus* als auch in Koagulase-negativen Staphylokokken (KONS), wie *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* oder *S. hominis*, häufig vorkommt, ist die alleinige Detektion dieser Resistenzdeterminante in klinischen Proben nicht ausreichend, da Methicillin-resistente KONS falsch-positive Testresultate verursachen würden. Sogenannte *multi-locus* PCRs erfassen aus diesem Grund parallel zum *mecA* Resistenzgen speziesspezifische Gene oder Genabschnitte, wie *nuc*, SA442, 16S rRNA-Gene, *femA* oder *femB*, und zeichnen sich durch hohe Sensitivitäten (92 % - 100 %) und Spezifitäten (90 % - 100 %) für die Detektion von MRSA in Direktmaterial aus [197–199]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *multi-locus* Ansatz verfolgt, der auf der parallelen Detektion von *mecA* als Resistenzdeterminante und eines *S. aureus* spezifischen sowie eines *S. epidermidis* spezifischen Abschnitts des *femA*-Gens beruht. Das *femA*-Gen ist phylogenetisch in Staphylokokken konserviert und kodiert ein Vorläuferprotein, das eine Rolle in der Peptidoglycansynthese spielt und die Methicillin-Resistenz beeinflusst [200]. Da einige Abschnitte der homologen *femA*-Gene in *S. aureus* und verschiedenen KONS durch Sequenzunterschiede gekennzeichnet sind, wurde *femA* bereits in früheren Arbeiten zur Speziesdifferenzierung erfolgreich eingesetzt [200,201]. Allerdings verursacht eine Mischbesiedelung mit Methicillin-sensitivem *S. aureus* und Methicillin-resistenten KONS

eine falsch-positive MRSA Detektion, was eine intrinsische Limitierung von *multi-locus* Systemen darstellt. Becker *et al.* haben 2006 gezeigt, dass derartige falsch-positive Testresultate einen niedrigen positiv-prädikativen Wert von rund 40 % bedingen und somit die Vorhersagekraft des Tests einschränken [202]. Verschiedene Untersuchungen konnten allerdings auch belegen, dass derartige Konstellationen in Abhängigkeit von der Probenart in 0 % - 2,5 % der untersuchten Blutkulturen [149,203,204] und in 3,4 % der untersuchten Nasenabstriche [202] auftraten. Um das Problem der Mischkolonisation zu adressieren, wurden *single-locus* Real-Time PCR Tests entwickelt, die einen Teil der *mecA*-tragenden SSCmec Genkassette (*staphylococcal cassette chromosome*) im Randbereich sowie das daran anschließende *S. aureus* spezifische, chromosomale *orfX*-Gen nachweisen, indem die verwendeten Primer die entsprechende Insertionsstelle umfassen. Derartige Systeme zeigten ebenfalls hohe Sensitivitäten und Spezifitäten für den MRSA-Nachweis direkt aus Abstrich-Proben und überwandern das Problem der falsch-positiven MRSA Nachweise aufgrund einer Mischkolonisation mit MR-KONS. Nichtsdestotrotz konnten auch bei *single-locus* Systemen falsch-positive MRSA Nachweise beobachtet werden, die durch eine Deletion des *mecA*-Gens aus der SCCmec Genkassette bedingt sind und mit Häufigkeiten zwischen 4,6 % - 12,5 % vorkommen [205–207].

Im direkten Vergleich zeigten Real-Time PCRs mit einem *multi-locus* Ansatz höhere Spezifitäten und bewiesen eine höhere Vorhersagekraft für die Abwesenheit von MRSA, als die Real-Time PCRs mit einem *single-locus* Ansatz (100 % vs. 64 %), was eine Anwendung als Ausschlussdiagnostikum nahelegt [201,208].

5.2.2 Der molekularbiologische Nachweis von VRE

Das zu etablierende TaqMan® Real-Time PCR System umfasst sechs Assays zur Detektion verschiedener Varianten der *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2* Gencluster, die phänotypische Glycopeptid- bzw. Vancomycin-Resistenzen in verschiedenen *Enterococcus* spp. vermitteln. Bei den Resistenztypen *vanA* und *vanB* handelt es sich um Plasmid-kodierte, transferable Gene, die eine *high-level* Vancomycin-Resistenz in den klinisch relevanten Spezies *E. faecium* und *E. faecalis* vermitteln können. Diverse laborinterne und kommerzielle Real-Time PCRs erfassen i.d.R. die häufig vorkommenden Typen *vanA* und *vanB* und erlauben eine Detektion von VRE direkt aus Rektalabstrichen oder Stuhlproben mit Sensitivitäten zwischen 93,1 % - 96,4 %. Allerdings kommt das *vanB*-Gen nicht ausschließlich in Enterokokken, sondern auch in anderen Spezies der anaeroben Darmflora vor [209,210], was zu falsch-positiven Testresultaten führt und eine limitierte Spezifität (87,0 % - 93,0 %) bedingt [101,211,212].

Das vorgestellte Testsystem erfasst neben den für die Identifizierung von VRE-Stämmen essentiellen *vanA*- und *vanB*-Genvarianten, zusätzlich chromosomal kodierte *vanC1*- und *vanC2*-Genvarianten, die eine intrinsische *low-level* Vancomycin-Resistenz in *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* vermitteln. Die Detektion dieser nicht-transferablen Varianten hat aus hygienischer Sicht keine Konsequenz, da besiedelte oder infizierte Patienten nicht isolationspflichtig sind [57], jedoch ist eine parallele Erfassung sinnvoll,

um widersprüchliche Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung zu verifizieren [56]. Aktuell sind sechs weitere, teilweise übertragbare Vancomycin-Resistenzgene des Typs vanD, vanE, vanG, vanL, vanM und vanN bekannt. Diese wurden in Deutschland nur vereinzelt in klinischen Isolaten von *Enterococcus spp.* gefunden und haben bisher noch keine klinische Bedeutung erlangt [57]. Aus diesem Grund wurden diese seltenen van-Typen im vorgestellten Testsystem vorerst nicht berücksichtigt.

5.2.3 Der molekularbiologische Nachweis von MRGN

Während die phänotypische Resistenz in MRSA und VRE auf wenigen Resistenzgenen bzw. -genvarianten beruht, sind die ursächlichen Mechanismen für die Multiresistenz in gramnegativen Stäbchen (MRGN) hoch komplex und divers. Allein die Resistenzen, die mit der Produktion von ESBL oder Carbapenemasen assoziiert sind, können durch eine Vielzahl von Plasmid-kodierten und somit transferablen β -Lactamase-Genen verursacht werden, wobei jedes dieser *bla* Gene bis zu 190 Varianten umfassen kann [63]. Aus diesem Grund gilt die PCR-Amplifikation der zugrundeliegenden *bla*-Gene mittels spezifischer Primer und die anschließende Sequenzierung der gebildeten Amplifikate als Goldstandard für die Detektion und Charakterisierung von ESBL und Carbapenemasen in klinischen Isolaten [213]. Allerdings ist dieses Verfahren vergleichsweise zeitaufwändig und wird zumeist nur von Konsiliar- oder Referenzlaboratorien angeboten, sodass ein Einsatz zur schnellen Erregerdiagnostik im klinischen Routinelabor nicht möglich ist.

Um dennoch eine schnelle Detektion, z.B. im Rahmen eines MRE-Screenings, auch in der klinischen Routine zu ermöglichen, wurde im Rahmen der Konzeptionierung dieses Testsystems der Umstand berücksichtigt, dass von den mehr als 1000 bekannten β -Lactamasen lediglich wenige Gen-Familien bzw. -Varianten global und mit einer hohen Prävalenz vorkommen [63]. Folglich wurden sechs Assays zur Erfassung von TEM-, SHV- und CTX-M-ESBL integriert, die sowohl deutschlandweit als auch global die häufigsten Genfamilien darstellen [65,214]. Zusätzlich umfasst das vorgestellte Real-Time PCR System fünf weitere Assays zur Detektion von GES-, VEB- PER- und OXA-1 ähnlichen *bla*-Genen, die in Deutschland zwar sporadisch, jedoch in anderen Ländern mit höherer Prävalenz vorkommen und durch die Globalisierung von außen in die Gesundheitssysteme eingetragen werden könnten [84,215]. In den letzten Jahren wird eine immer größer werdende Zahl von Plasmid-kodierten ampC- β -Lactamasen entdeckt, von denen *bla* CMY-2 global und *bla* DHA sowie *bla* FOX regional hohe Prävalenzen aufweisen [216]. Aus diesem Grund wurden sowohl das parentale chromosomale ampC-Gen als auch die daraus abgeleiteten Plasmid-kodierten Genfamilien ACC, ACT, MIR, BIL, LAT, CMY, DHA, FOX und MOX durch die Integration von sieben TaqMan® Assays adressiert.

Enterobacteriaceae und Nonfermenter, die ESBL produzieren und gegen Fluorchinolone resistent sind (3 MRGN), werden in vielen Fällen mit Reserve-Antibiotika, wie Carbapenemen, behandelt. Mit der zunehmenden Verbreitung von ESBL stieg auch der Carbapenem-Verbrauch, was bereits in den 1990ern zum Auftreten und zur schnellen Verbreitung von Carbapenem-resistenten Spezies führte [67]. Die Carbapenem-

Resistenz wird in den meisten Fällen durch die Bildung spezifischer, transferabler Carbapenemasen hervorgerufen. Mit Hilfe des TaqMan® Real-Time PCR Systems, ist es möglich die in Deutschland bei *Enterobacteriaceae* am häufigsten vorkommenden Carbapenemase-Gene vom Typ OXA-48, VIM, NDM und KPC zu detektieren [75]. Des Weiteren werden seltener IMP-Typen in *Pseudomonas aeruginosa* durch vier weitere Assays erfasst. *Acinetobacter* spp., vor allem aber *A. baumannii*, sind aufgrund einer natürlichen Kompetenz in der Lage, Antibiotikaresistenzgene von anderen gramnegativen Bakterien durch horizontalen Gentransfer zu erwerben und weiter zu geben [155]. Neben den oben genannten ESBL- und Carbapenemase-vermittelnden Resistenzdeterminanten bildet *A. baumannii* verschiedene chromosomal- und Plasmid-kodierte OXA-Carbapenemasen vom Typ OXA-23, OXA-72, OXA-58 und OXA-40, die jeweils durch einen spezifischen Assay erfasst werden. OXA-51-ähnliche Varianten wurden nicht berücksichtigt, da diese intrinsisch in allen *A. baumannii* Stämmen vorkommen und bisher nur in seltenen Fällen durch eine Promoter-assoziierte Überexpression zu einer Carbapenem-Resistenz beitragen, obgleich die zukünftige Integration eines weiteren Assays zur parallelen Detektion des zugrundeliegenden Insertionselements IS_{Aba1} sinnvoll erscheint [73].

Eine *high-level* Fluorchinolon-Resistenz wird gewöhnlich durch *gyrA*-Genmutationen in der QRDR-Region (*quinolone-resistance determining region*) des bakteriellen Chromosoms hervorgerufen, die eine Sequenzierung zur eindeutigen Identifizierung notwendig machen [217]. Bisherige PCR-Verfahren sind daher auf die Detektion von Plasmid-kodierten Resistenzdeterminanten, wie *qnrA*, *qnrB* oder *qnrS*, die ausschließlich eine *low-level* Fluorchinolon-Resistenz vermitteln, limitiert. Andere Plasmid-kodierte Determinanten, wie das Aminoglykosid-Acetyltransferase-kodierende AAC(6')-Ib Gen, unterliegen ebenfalls einer hohen Sequenzvariabilität, die eine sichere Detektion durch TaqMan® Sonden erschwert [218], wobei andere Real-Time PCR basierte Systeme mit anschließendem *pyrosequencing* der generierten Amplifikate vielversprechende Ergebnisse im Rahmen einer schnellen Detektion zeigten [178]. Die Integration von *qnrA* und *qnrB* stellt somit aus klinischer Sicht eine Zusatzinformation dar, die jedoch zur Erforschung des Resistomes mehr als dienlich ist.

5.2.4 Makrolid-Resistenzgene in klinisch relevanten Streptokokken

Eine phänotypische Makrolid-Resistenz in grampositiven *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus* spp. kann durch verschiedenste Mechanismen verursacht werden, wobei die Inaktivierung durch eine *erm*-Gen vermittelte Methylase (erythromycin ribosom methylase) oder das vermehrte Ausschleusen des Antibiotikums durch eine *mef*-Gen vermittelte Efflux Pumpe zu den häufigsten Ursachen zählen [219]. Epidemiologisch tritt die phänotypische Makrolid-Resistenz in geographischer Abhängigkeit mit unterschiedlichen Prävalenzen in klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* auf, wobei die Prävalenz im Mittlerem Osten und in Asien höher ist, als in Europa [220]. Die Integration der zugrundeliegenden *ermA*-, *ermB*- und *mefA*-Gene ermöglicht die epidemiologische Einordnung der zugrundeliegenden Resistenzdeterminanten. Aus klinischer Sicht hat der Nachweis von Makrolid-resistenten

Erregern im Rahmen eines MRE-Screenings keine Relevanz, da in den aktuellen Hygienerichtlinien der KRINKO keine entsprechenden Untersuchungen und auch keine speziellen Hygienemaßnahmen vorgesehen sind.

5.2.5 Integrierte Qualitätskontrollen

Das vorgestellte Real-Time PCR System ermöglicht in Kombination mit einer einfachen Probenaufarbeitung die schnelle Detektion von Resistenzgenen direkt aus klinischen Proben. Die Zusammensetzung der Probenmatrix variiert von Patient zu Patient und hat direkten Einfluss auf den PCR-Nachweis, weshalb drei verschiedene Qualitätskontrollen im System integriert wurden. Die Überwachung einer adäquaten Probenahme und einer vollständigen Probenlyse erfolgt durch eine parallele Detektion des humanen GAPDH-Gens (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) sowie des bakteriellen 16S rRNA-Gens. Beide Gene sind sogenannte *housekeeping* Gene, die von jeder eukaryotischen bzw. jeder bakteriellen Zelle exprimiert werden und somit zur DNA-Extraktionskontrolle geeignet sind [169,194]. Zusätzlich wird die Amplifikation mit Hilfe einer exogenen, d.h. von außen zugefügten, internen positiv-Kontrolle (exoIPC) überwacht. Diese ermöglicht die essentielle Einordnung eines negativen PCR-Testresultates: entweder negativ aufgrund der Abwesenheit eines Ziel-Gens (richtig-negativ) oder negativ aufgrund von PCR-Inhibition (falsch-negativ). Die Verwendung einer exogenen IPC bietet den Vorteil, dass die artifizielle DNA, im Gegensatz zu einem endogenen Ziel-Gen, unabhängig von der Probenaufarbeitung vorliegt und somit ausschließlich durch eine Inhibition der PCR beeinflusst wird. Allerdings wirkt sich ein zusätzlicher Pipettierschritt nachteilig auf den Arbeitsprozess aus.

5.2.6 Limitierungen molekularbiologischer Methoden

Molekularbiologische Detektionsverfahren, inklusive des vorgestellten TaqMan® Real-Time PCR Systems, unterliegen einigen methodischen Einschränkungen, die berücksichtigt werden müssen. Im Gegensatz zu kulturbasierten Methoden ist das vorgestellte System nicht in der Lage Resistenzmechanismen zu detektieren, die auf der Bildung spezieller Effluxpumpen, dem Verlust von Porinen, der gesteigerten Expression von Resistenzgenen oder neuen, unbekanntem Resistenzgenen beruhen. Eine Detektion der zugrundeliegenden Gene bzw. Genmutationen ist prinzipiell möglich, jedoch stoßen die meisten Systeme aufgrund der genetischen Diversität an ihre kapazitären Grenzen. Dennoch repräsentieren die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Resistenzdeterminanten mehrheitlich Gene, die auf hoch transferablen genetischen Elementen, wie Plasmiden oder Transposonen, lokalisiert sind und das größte Potential für eine schnelle Verbreitung durch einen horizontalen, speziesübergreifenden Gentransfer besitzen [66]. Ein Porin-Verlust in der bakteriellen Zellwand ist im Gegensatz zur β -Lactamase-Produktion mit einem „Fitness-Verlust“, d.h. mit einer Effizienzminderung zellulärer Funktionen, assoziiert und verringert die Konkurrenzfähigkeit des resistenten Stammes gegenüber der gesunden Begleitflora, was einer schnellen Verbreitung entgegensteht [221,222]. Um falsch-negativen

Testresultaten, aufgrund von neuen Resistenzgenen vorzubeugen, müssen zielgerichtete molekulare Tests regelmäßig reevaluiert und an die aktuelle Resistenzsituation angepasst werden. Eine vielversprechende Ausnahme bilden dabei Ziel-Gen-unabhängige Sequenzierungs-Verfahren, wie das *next generation sequencing* [178,223]. Jedoch ist ein Einsatz in der klinischen Mikrobiologie bisher nur spezialisierten Laboren vorbehalten. Darüber hinaus erfordern sequenzierbasierte Detektionsverfahren aktuell eine kulturelle Anzucht der Probe, was einerseits zu einem Verlust nicht kultivierbarer Erreger führt und andererseits mit erheblichem Zeitaufwand verbunden ist. Für den Einsatz als schnelles Detektionssystem ist die Sequenzierung daher aktuell noch nicht einsetzbar.

5.3 Technische Leistungsfähigkeit des Systems

Die Untersuchung der technischen Leistungsfähigkeit dient in erster Linie dazu, Kenngrößen der zugrundeliegenden Real-Time PCR zu ermitteln, anhand derer die analytische Validität untersucht werden kann. Diese ist klar von der diagnostischen Leistungsfähigkeit abzugrenzen, die in einem mehrstufigen Vorgehen im Anschluss an dieses Kapitel separat betrachtet wird.

5.3.1 Auswahl der Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der analytischen Sensitivität, der analytischen Spezifität sowie der Präzision unter Mess- und Wiederholbedingungen anhand von eingestellten DNA-Extrakten, isoliert aus Referenzstämmen, deren Resistenzgenotyp durch nationale Referenzzentren (NRZ) oder Konsiliarlaboratorien eindeutig charakterisiert wurde. Die Verwendung von DNA-Extrakten ermöglicht die Analyse aller wichtigen PCR-Parameter unabhängig von den Einflüssen der gewählten DNA-Extraktionsmethode und der vorliegenden Probenmatrix und soll zeigen, dass die entwickelten Assays unter universalen PCR Bedingungen optimal arbeiten, was eine Grundvoraussetzung für die Integration auf *TaqMan® Array Cards* (TAC) darstellt. Des Weiteren konnte so sichergestellt werden, dass der Umgang mit den vermehrungsfähigen Bakterien im Institut für Infektionsmedizin unter S2 Sicherheitsbedingungen erfolgte und ausschließlich nichtinfektiöse DNA-Extrakte im Institut für Klinische Molekularbiologie verwendet wurden. Verschiedene Leitfäden zur Etablierung von Real-Time PCR Systemen empfehlen hingegen die Verwendung von Originalproben oder zumindest klinischen Proben, die mit entsprechenden Bakterien versetzt wurden [224]. Die eingeschränkte Verfügbarkeit derartiger Proben bedingt jedoch die bevorzugte Wahl von DNA-Extrakten. Um diese Limitierung des Versuchsaufbaus zu adressieren, wurde der Einfluss einer repräsentativen Probenmatrix separat im Kapitel 4.1.2. untersucht. Bedingt durch die Verwendung aufgereinigter DNA-Extrakte wird der Einfluss des Probenmaterials und die Kreuzreaktivität mit Hintergrund-DNA in der Spezifitätsuntersuchung nicht berücksichtigt. Allerdings erfolgte im Rahmen der Auswahl der Zielsequenzen und der Entwicklung der *TaqMan®* Assays eine *in-silico* Überprüfung der Kreuzreaktivität, indem

die Primer- und SONDENSEQUENZEN in einem Sequenz-Alignment mittels Nucleotide-Blast mit einer Datenbank bekannter Gensequenzen verglichen wurden [145]. Um eine möglichst hohe Aussagekraft zu gewährleisten, wurde die *Nucleotide Collection* Datenbank (nr/nt) ohne weitere taxonomische Eingrenzungen verwendet, die somit sowohl humane als auch bakterielle Gensequenzen enthält [99].

Das vorgestellte System erfasst neben häufig vorkommenden Resistenzdeterminanten auch seltene, klinisch relevante Genvarianten, so dass für die Gene *bla* FOX, *bla* MOX/CMY, *bla* VEB, *bla* PER-1, *bla* PER-2, *bla* GES und *vanC2-C3-2* keine charakterisierten Referenzstämme zur Verfügung standen und eine Evaluierung der entsprechenden TaqMan Assays sowohl in Einzelreaktionen als auch auf TACs nicht möglich war.

5.3.2 Ergebnisse der Spezifitätstestung

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass das Real-Time PCR System in der Lage ist Resistenzgen-positive und Resistenzgen-negative Stämme voneinander zu unterscheiden. Unter Verwendung von 72 Referenzstämmen, die sowohl resistente Spezies als auch sensible Kommensalen sowie taxonomisch verwandte Bakterien umfassten, wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Testresultate beobachtet. Dabei ist anzumerken, dass die analytische Sensitivität und die analytische Spezifität vor dem Hintergrund gewählter Cut-off Werte betrachtet werden müssen, die als Trenngrößen für resultierende Ct-Werte in schwach-positiven Proben dienen. Ein niedriger Cut-off Wert blendet falsch-positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Reaktionen aus und erhöht die analytische Spezifität, jedoch wird im gleichen Zuge die analytische Sensitivität eingeschränkt. Die aktuelle Spezifität von 100 %, basiert auf der Festlegung individueller Cut-Off Werte für die Ziel-Gene TEM, SHV, ampC, femA, mefA und ermB. Sofern ein universeller Cut-Off Wert festgelegt werden würde, nähme die Zahl falsch-positiver Testergebnisse speziell für diese Ziel-Gene zu und die Spezifität nähme entsprechend ab. TaqMan® Assays zeichnen sich allerdings durch eine hohe Spezifität aus, da die Sonden, im Gegensatz interkalierenden Fluoreszenzmarkern wie SYBR-Green, ausschließlich sequenzspezifisch an Zielsequenz-enthaltende Amplifikationsprodukte binden, wobei unspezifische Nebenprodukte nicht detektiert werden [99].

Die Untersuchung der analytischen Spezifität kann im Allgemeinen entweder im Vergleich zu einer anderen, bereits etablierten „Goldstandard“ Methode oder anhand definierter Referenzmaterialien erfolgen [224]. Um den Einfluss von testabhängigen Limitierungen zu minimieren, wurde im Rahmen dieser Betrachtung auf die Anwendung einer Vergleichsmethode verzichtet und stattdessen eine Auswahl von Referenzstämmen verwendet, die von nationalen Referenzzentren (NRZ) mit Hilfe einer Kombination anerkannter Methoden charakterisiert wurden. Dennoch mussten initial falsch-negative Real-Time PCR-Reaktionen beim Nachweis von *bla* VIM-1 in *E. cloacae* NRZ-00239 und von *bla* IMP Typ 2 bzw. Typ 16 in verschiedenen *P. aeruginosa* mittels veröffentlichter PCR-Primer verifiziert werden.

5.3.3 PCR-Parameter und Sensitivitätstestung der Real-Time PCR in Einzelreaktionen

Die Vermessung 7-stufiger DNA-Verdünnungsreihen ermöglicht über eine lineare Regressionsanalyse die Berechnung wichtiger PCR-Parameter anhand derer das zu etablierende System beurteilt werden kann. Eine mittlere PCR-Effizienz von 99,2 % zeigt, dass die zugrundeliegenden Amplifikationsbedingungen so gewählt wurden, dass eine nahezu optimale Amplifikationseffizienz erreicht wurde, die innerhalb eines PCR-Zyklus exakt eine Verdopplung der vorliegenden Zielsequenzen ermöglicht. Die Effizienzen der Primer- und Sonden Sets CTX-M 2 (85 %), CTX-M 8/25 (65 %), BIL/LAT/CMY (88 %), VIM (112 %), IMP-2 (114 %), NDM (113 %) und vanC2-C3-2 (88 %) liegen außerhalb des in der Literatur angegebenen akzeptablen Bereichs von 90 % bis 110 %, wobei diese mehr eine Orientierungshilfe denn evidenzbasierte Grenzen darstellen. Die PCR-Effizienz kann u.a. durch unspezifische Primer- oder SONDENSEQUENZEN, durch Inhibitoren oder durch Sekundärstrukturen in den Primersequenzen verursacht werden, wobei damit einhergehend auch die Sensitivität negativ beeinflusst wird [225,226]. Dennoch konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der entwickelten Primer- und SONDENSETTS unter universellen PCR-Bedingungen optimal arbeitet, was eine essentielle Voraussetzung für eine parallele Integration auf TaqMan® Array Cards darstellt.

Die analytischen Sensitivitäten, ausgedrückt als Nachweisgrenzen bzw. *Limits of Detection*, lagen in einem Bereich zwischen 1 GE und 29 GE pro 10 µl PCR Reaktionsvolumen. Im Allgemeinen ist ein Real-Time PCR System bei einer Effizienz von 100 % in der Lage eine einzige Ziel-Gen Kopie pro Reaktion zu detektieren. Bei einer mittleren Konzentration von 1 Ziel-Gen je Reaktionsvolumen, ist es statistisch gesehen jedoch nicht gesichert, dass beim Pipettieren genau 1 Kopie in das entsprechende Reaktionsgefäß übertragen wird, sondern die Kopienzahl variiert zwischen 0 und mehreren Kopien im aufgenommenen Aliquot. Ausgehend von einer Poisson-Verteilung und einer angestrebten, 95%igen Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eine Ziel-Gen Kopie im Reaktionsgefäß vorhanden ist, beträgt die niedrigst mögliche Nachweisgrenze 3 Ziel-Gen Kopien [99]. Somit liegen die ermittelten Nachweisgrenzen teilweise unterhalb des theoretisch Möglichen, was im Wesentlichen durch das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer Kopien eines Plasmids bzw. eines Gens in einem einzelnen Bakterium bedingt ist [227]. Für das Gesamtsystem sind somit nicht die Nachweisgrenzen der Real-Time PCR limitierend, sondern die der Prä-Analytik, im Besonderen die DNA-Extraktionseffizienz der Probenaufarbeitung.

Die Aussagekraft der Sensitivitätsbestimmung ist allerdings limitiert, da eine 5-fach Bestimmung pro Verdünnungsstufe zwar einer Probit-Analyse zur Bestimmung der 95%igen Nachweisgrenze zugänglich ist, jedoch genügt die gewählte Zahl der Replikate nicht, um eine statistische Sicherheit in Form von Konfidenzintervallen anzugeben [224]. Es existieren verschiedene Empfehlungen zum Umfang und zur Art der zu bestimmenden analytischen Parameter [224–226]. Die Evaluierung des vorgestellten Systems orientierte sich, unter Berücksichtigung eingeschränkter Ressourcen, an diesen Richtlinien. Die vorgestellten Ergebnisse der technischen Leistungsfähigkeit

dienen folglich dem wissenschaftlichen Nachweis der Machbarkeit, sollten bei einer Einführung in die klinische Routine jedoch umfangreicher untersucht werden.

5.3.4 PCR-Parameter und Sensitivitätstestung der Real-Time PCR nach Integration auf TaqMan® Array Cards

Mit einer mittleren Amplifikations-Effizienz von 103,5 % zeigen die meisten Assays auch nach Integration auf TaqMan® Array Cards (TAC) eine optimale Amplifikations-Effizienz, wobei der angestrebte Referenzbereich von 90 % - 110 % in der Einzelbetrachtung häufiger überschritten wurde. Diese, im Vergleich zu den Einzelreaktionen, größere Varianz der PCR-Effizienzen (Spannweiten: 65,5 % - 114,0 % vs. 64,7 % - 177,7 %) spiegelt sich auch in der insgesamt geringeren Linearität der Standardkurven wider und kann im Wesentlichen dadurch begründet werden, dass die Berechnungen der einzelnen Parameter auf Einzelbestimmungen beruhen.

Im Rahmen der Sensitivitätstestung lagen die resultierenden Nachweisgrenzen in einem Bereich von 1 GE bis 32 GE pro 1 µl Reaktionsvolumen und sind somit mit denen vorhergehender Untersuchungen vergleichbar [193–195]. Da sich das Reaktionsvolumen im Vergleich zu den Einzelreaktionen von 10 µl auf 1 µl und folglich auch die absolute Menge an Ziel-Gen DNA reduziert war, ein Sensitivitätsverlust im Zuge der TAC-Integration zu erwarten [193]. Die analytische Sensitivität scheint jedoch, entgegen den vorhergehenden Erkenntnissen, nicht wesentlich durch die TAC-Integration reduziert worden zu sein. Ein direkter Vergleich mit den Nachweisgrenzen der Assays in Einzelreaktionen ist allerdings nur bedingt möglich, da die Evaluierung der TAC auf die Untersuchung von Verdünnungsreihen in Einzelbestimmung beruht und somit eine Probit-Analyse zur Berechnung der Nachweisgrenze unzulässig war. Um die analytische Sensitivität dennoch beurteilen zu können, orientieren sich die angegebenen Nachweisgrenzen jeweils an dem unteren Ende des linearen Bereichs eines jeden Assays. Da ein qualitativer Nachweis i.d.R. noch in einer Analyt-Konzentration unterhalb des linearen Bereichs möglich ist, stellt dieses Vorgehen eine konservative Betrachtung dar und verhindert eine Überschätzung der analytischen Sensitivität [99].

Trotz dieser methodischen Limitierungen zeigen diese Untersuchungen, dass die PCR-beschreibenden Parameter und die analytische Sensitivität der TAC mit denen der Assays in Einzelreaktionen vergleichbar sind. Zusätzlich ermöglichen TaqMan® Array Cards aufgrund ihrer Mikrofluidik-Architektur die parallele Untersuchung von bis zu 48 Ziel-Genen in maximal acht verschiedenen Proben und reduzieren gleichzeitig die Zahl der nötigen Arbeitsschritte und somit die Gefahr von Kreuzkontaminationen. Des Weiteren umfasst das Reaktionsvolumen in den Kavitäten der Karte lediglich 1 µl, wodurch zum einen der Bedarf an kostenintensiven Reagenzien und zum anderen die benötigte Menge an extrahierter DNA reduziert wird. Die Real-Time PCR auf TaqMan® Array Cards stellt somit eine vielversprechende Technologie zum schnellen und effizienten Screening von 42 bakteriellen Resistenzgenen dar und ist aufgrund der parallelen Erfassung der vier wichtigsten Problemkeime anderen aktuell erhältlichen Testsystemen überlegen. Dennoch sollte im Rahmen einer Einführung ins Routinelabor

die Leistungsfähigkeit der TaqMan® Real-Time PCR auf *Array Cards* anhand von klinischen Proben in einem statistisch gesicherten Umfang evaluiert werden.

5.4 Klinische Leistungsfähigkeit und Aussagekraft des etablierten Systems

Die klinische Leistungsfähigkeit wird im Wesentlichen durch die Sensitivität und Spezifität des TaqMan® Real-Time PCR Systems im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard definiert. Beide Parameter sind ein Ergebnis sowohl der medizinischen Eigenschaften des gewählten Resistenzgens als auch der technischen Leistungsfähigkeit des gesamten, d.h. Probenahme, Probenaufarbeitung und Real-Time PCR umfassenden, Testsystems.

5.4.1 Aussagekraft des MRSA-Nachweises

Das vorgestellte TaqMan® Real-Time PCR System ist in der Lage MRSA mit einer Sensitivität von 33 % und einer Spezifität von 100 % im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard direkt aus Screening-Abstrichen nachzuweisen. Für das betrachtete Patientenkollektiv ergeben sich somit ein positiv-prädikativer Wert von 100 % und ein negativ-prädikativer Wert von 77 %. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass *multi-locus* Real-Time PCRs anfällig für falsch-positive Testresultate aufgrund einer Mischbesiedelung mit MSSA und MR-KONS sind [202,203]. Becker *et al.* haben Nasenabstriche von 235 Patienten während der Krankenhausaufnahme gesammelt und auf die Anwesenheit von *Staphylococcus* Spezies mit einer entsprechenden phänotypischen Methicillin-Resistenz hin untersucht. Eine Mischbesiedelung trat in der untersuchten Patientengruppe in 3,4 % der Fälle auf. Die Autoren weisen darauf hin, dass die *multi-locus* Detektion von *mecA* und eines *S. aureus* spezifischen Gens zwar eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 96 % für den direkten MRSA-Nachweis erreichen könnte, allerdings bedingen falsch-positive Testresultate aufgrund der beobachteten Mischbesiedelung einen niedrigen positiv-prädikativen Wert von 40 % [202]. Diese Erkenntnisse stehen somit im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Sowohl die limitierte klinische Sensitivität als auch die unerwartet hohe Spezifität können im Wesentlichen auf eine geringe analytische Sensitivität des Testsystems zurückgeführt werden. In allen MRSA-positiven Real-Time PCR Reaktionen wurden sowohl für *mecA* als auch für *femA-SA* Ct-Werte ermittelt, deren korrespondierende GE-Zahl nur knapp die Nachweisgrenze von 5 GE bzw. 2 GE pro Reaktionsvolumen überschritt. Mermel *et al.* konnten zeigen, dass ein Nasenabstrichtupfer im Mittel 800 KBE (Spannweite: 3 - 15.000.000 KBE) MRSA trägt [173]. Von dieser Menge ausgehend sind mit der angewendeten Probenahme und Probenaufarbeitung im Mittel 2 KBE von MRSA im PCR-Reaktionsgefäß vorhanden, womit die theoretische Nachweisgrenze nicht erreicht wird. Auf Grundlage dessen wurde die angewandte Probenaufarbeitung um einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt vor der eigentlichen Bakteriolyse erweitert, der letztendlich die detektierbaren GE pro Reaktionsvolumen um das 300-fache erhöhen konnte (Kapitel 4.1.3). Nachfolgende

Arbeiten müssen zeigen, ob durch eine entsprechende Anpassung die klinische Sensitivität substantiell gesteigert werden kann und ob im Zuge dessen die Spezifität aufgrund der Zunahme falsch-positiver Resultate sinkt. Nimmt man eine MRSA-Prävalenz bei Krankenhausaufnahme von 0,62 % an [33], würde das System in der aktuellen Konfiguration durch einen positiv-prädikativen Wert von 100,0 % und einen negativ-prädikativen Wert von 99,6 % charakterisiert sein. Bei einem Einsatz als Suchtest zum universellen Screening aller Patienten bei Hospitalisierung würden zwar alle positiv getesteten Patienten tatsächlich mit MRSA besiedelt oder infiziert sein, allerdings wird unter Berücksichtigung der Sensitivität von 33 % klar, dass 77 % der MRSA-Träger unerkannt blieben.

5.4.2 Aussagekraft des VRE-Nachweises

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der molekularbiologische Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken direkt aus Rektalabstrichen mit einer Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von 93 % im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard möglich ist. In verschiedenen Publikationen konnten vergleichbare Real-Time PCR Systeme zur Detektion von vanA- und vanB-Genen Sensitivitäten zwischen 93,1 % - 96,4 % und Spezifitäten zwischen 87,0 % - 93,0 % erreichen [101,211,212]. Mak *et al.* haben 30.835 Rektalabstriche mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von vanA und vanB untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass der VRE-Nachweis basierend auf der alleinigen Detektion von vanB mit einer hohen Rate falsch-positiver Resultate assoziiert ist und einen positiv-prädikativen Wert von 1,42 % bedingt [228]. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde das vanB-Gen in drei Proben detektiert, wobei mit der kulturbasierten Methode keine Enterokokken mit einer entsprechenden phänotypischen Resistenz detektiert werden konnten. Eine Ursache für die geringe Spezifität des vanB Nachweises liegt darin begründet, dass das vanB-Gen auch in anderen Spezies der physiologischen Darmflora exprimiert wird, die nicht auf einem VRE-Selektivmedium kultiviert werden können [209,210]. Die klinische Relevanz von vanB in anderen Spezies ist unklar, allerdings ist es wahrscheinlich, dass anaerobe Bakterien wie *Clostridium* spp. oder *Eggerthella lenta* ein Reservoir für vanB-Gene im menschlichen Darm darstellen. Howden *et al.* haben 36 Vancomycin-resistente *E. faecium* Isolate mittels *whole genome sequencing* untersucht und konnten zeigen, dass 15 dieser Isolate ihre Resistenz über einen horizontalen Gentransfer des Transposon *Tn1549* kodierten vanB Gens von kommensalen Darmbakterien erworben haben. Die Autoren schließen daraus, dass die Neubildung eines VRE innerhalb der Darmflora des Patienten, besonders unter antibiotischer Therapie, möglich und weit verbreitet ist [229,230]. Des Weiteren wird in Deutschland ein steigender Trend vanB-tragender VRE beobachtet, was auf eine zunehmende klinische Relevanz hindeutet [57]. Die Sensitivität wird durch 2 beobachtete falsch-negative Testresultate limitiert. Diese können entweder durch nicht erfasste van-Varianten oder durch eine geringere analytische Sensitivität der molekularbiologischen Methode erklärt werden. Da van-Varianten, die eine vergleichbare phänotypische Resistenz vermitteln, in Deutschland selten sind bzw. noch nicht beschrieben wurden [57], ist eine zu geringe Nukleotid-

Menge in der vorliegenden Probe die wahrscheinlichere Ursache. Auch in diesem Fall müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, ob die Anpassung der Probenaufbereitung die Nukleotid-Menge in der Probe und somit die analytische Sensitivität erhöht.

Geht man von einer VRE-Aufnahmeprävalenz von 0,05 % in deutschen Krankenhäusern aus [33], ist ein VRE-positiv getesteter Patient mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,6 % tatsächlich VRE-Träger und ein negativ getesteter Patient mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % tatsächlich unbelastet. Die prädikativen Werte legen daher einen Einsatz der neuen molekularbiologischen Methode als Ausschlussdiagnostikum nahe.

VRE kommen allerdings bei hospitalisierten Patienten mit einer Prävalenz zwischen 1,8 % auf Normalstationen und 16,3 % auf Intensivstationen vor [231]. In derartigen Risikobereichen ist im Rahmen eines gezielten Screenings eine zufriedenstellende prädikative Aussagekraft von über 70 % und somit eine Verwendung als Suchtest möglich.

5.4.3 Aussagekraft des Nachweises von ESBL- oder Carbapenemase-produzierenden Erregern

Der molekularbiologische Nachweis von ESBL-tragenden Bakterien stellt aufgrund der großen Anzahl klinisch relevanter β -Lactamase-Gene eine besondere Herausforderung dar. Mit Hilfe von 18 integrierten Primer- und SONDENSSETS zur Detektion von ESBL-vermittelnden Determinanten konnte eine Sensitivität von 75 % und eine Spezifität von 59 % für den ESBL-Nachweis im Vergleich zur kulturbasierten Methode erreicht werden. In 67 % der richtig-positiv getesteten Proben konnten Varianten der CTX-M 1 Gruppe nachgewiesen werden. Varianten dieser Gruppe stellen in Deutschland mehr als zwei Drittel aller im humanmedizinischen Bereich identifizierten ESBL dar [213].

Die weitergehende Auswertung der Ergebnisse hat gezeigt, dass falsch-positive Real-Time PCR Signale überwiegend durch die Detektion von *bla* TEM und *bla* SHV verursacht wurden. Lässt man die zugrundeliegenden Assays in der Auswertung außen vor, kann die Spezifität des ESBL-Nachweises auf 84 % gesteigert werden, ohne dass die Sensitivität reduziert wird. Die niedrige Spezifität des ESBL-Nachweises wird somit im Wesentlichen durch die hohe genetische Variabilität der ESBL-vermittelnden Determinanten bedingt. Derzeit sind mehr als 1000 verschiedene β -Lactamasen bekannt, die durch eine Vielzahl von Genfamilien, u.a. TEM, SHV, CTX-M und OXA, vermittelt werden. Einzelne Familien können dabei mehr als 100 Varianten umfassen, die sich durch wenige Einzelnukleotid-Polymorphismen oder Punkt-Deletionen unterscheiden [63]. Folglich unterscheiden sich Genvarianten, die einfache β -Lactamasen ohne erweitertes Substratspektrum vermitteln, von den Varianten, die *Extended Spectrum* β -Lactamasen vermitteln, lediglich durch Punktmutationen, die mit PCR-basierten Verfahren nicht ohne weiteres differenziert werden können. Verschiedene Methoden zur Differenzierung und Identifizierung von ESBL-Genvarianten wurden entwickelt, darunter PCR-RFLP [232], Real-Time PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse [233] oder Oligonukleotid-Microarrays [234], wobei die Sequenzierung entsprechender Genabschnitte aktuell den Goldstandard darstellt.

Derartige Methoden sind allerdings arbeits- und zeitaufwändig und wurden bisher ausschließlich zur Untersuchung bereits isolierter Bakterien verwendet.

Eine sichere und schnelle Detektion von gramnegativen Bakterien, die Carbapenemasen produzieren, ist von besonderer klinischer Bedeutung, da die verbleibenden Therapieoptionen äußerst limitiert sind und eine Ausbreitung durch die frühe Ergreifung adäquater Hygienemaßnahmen vermieden werden sollte. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass das vorgestellte TaqMan® Real-Time PCR System in der Lage ist ursächliche Resistenzdeterminanten in Carbapenem-resistenten Enterobakterien (CRE) mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % im Vergleich zur kulturbasierten Methode direkt aus Patientenabstrichen nachzuweisen. Cortegiani *et al.* evaluierten das Xpert® Carba-R Real-Time PCR Kit zur Detektion von KPC, VIM, OXA-48, IMP-1 und NDM Carbapenemase-Genen direkt aus Rektalabstrichen und Abdominal-Drainageflüssigkeiten. Es ergaben sich eine Sensitivität von 50,0 % und eine Spezifität von 93,1 % für die Detektion von CRE im Vergleich zur Anreicherungskultur mit anschließendem Nachweis auf Selektivmedien. Die niedrige Sensitivität bedingt einen unzureichenden negativ-prädikativen Wert von 77 % und war durch das Auftreten von Isolaten erklärlich, deren Carbapenem-Resistenz durch nicht berücksichtigte OXA-23, GES und PER Genvarianten vermittelt wurde [104]. Im Gegensatz dazu konnten Antonelli *et al.* mit Hilfe eines ähnlich konzipierten Check-Direct CPE Real-Time PCR Kits anhand von 557 untersuchten Rektalabstrichen zeigen, dass eine Sensitivität und Spezifität von 93,1 % bzw. 97,3 % sowie ein positiv- und negativ-prädikativer Wert von 78,5 % bzw. 99,6 % im Vergleich zur direkten Kultur auf Selektivmedien möglich ist [105]. Die abweichenden Erkenntnisse dieser beiden Untersuchungen zeigen, wie stark die Aussagekraft eines diagnostischen Tests zur MRE-Detektion von der Prävalenz bzw. der lokalen Epidemiologie einzelner Gene abhängig ist. Das vorgestellte TaqMan® Real-Time PCR System inkludiert auch seltene OXA, GES und PER Varianten, ist somit deutlich breiter konzeptioniert und ermöglicht eine hohe diagnostische Aussagekraft. Darüber hinaus erfordern jedoch alle Ziel-Gen-gerichteten molekularbiologischen Methoden eine regelmäßige Aktualisierung der integrierten Assays, um neu auftretende oder häufiger werdende *bla* Genvarianten abzudecken.

5.4.4 PCR-Inhibition beeinflusst die MRE-Detektion nur geringfügig

Das Auftreten von PCR-Inhibition und daraus resultierende falsch-negative Testergebnisse werden in jeder untersuchten Probe mit Hilfe des integrierten exoIPC Assays überwacht. Dieser detektiert ein vor der Reaktion zugesetztes, artifizielles Oligonukleotid. Etwaige inhibitorische Einflüsse können somit anhand einer Verschiebung der *Threshold Cycles* (Ct) hin zu größeren Werten erkannt werden. Insgesamt 8,2 % der Proben konnten aufgrund von PCR-Inhibition initial nicht ausgewertet werden. Die beobachtete Inhibitionsrate von 8,2 % ist vergleichbar mit anderen Untersuchungen, die Inhibitionsraten von 1,5 % für Nasenabstriche, 5,0 % für Leistenabstriche und bis zu 12 % für Perianal- und Rektalabstriche aufwiesen [235,236]. Durch die wiederholte Untersuchung der 1:10 verdünnten Proben konnten sowohl die

inhibitorischen Einflüsse aufgehoben als auch 2 initial falsch-negative Resultate falsifiziert werden. Da der Einfluss von PCR-Inhibitoren mehrheitlich konzentrationsabhängig ist, stellt die Verdünnung der Ausgangsprobe eine verbreitete Methode zur Aufhebung der Inhibition dar [106]. Allerdings ist eine Verdünnung mit einer Minderung der analytischen Sensitivität assoziiert, da auch die enthaltene Nukleotidmenge auf ein Zehntel reduziert wird. Folglich ist der Nutzen für inhibierte Proben, deren GE-Konzentration kleiner als das Zehnfache der entsprechenden Nachweisgrenze ist, begrenzt. Es ist jedoch zu erwarten, dass eine klinisch relevante Besiedlung sich in einer höheren Menge an Kopien des Resistenzgenes manifestiert, somit muss eine Verdünnung nicht zwingend zum Unterschreiten der Nachweisgrenze führen.

5.4.5 Potentieller Zeitgewinn gegenüber kulturbasierten Methoden

Der schnellen Diagnostik kommt eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung der Ausbreitung von MRE zu [77,78,237]. Das vorliegende molekularbiologische Testsystem ist in der Lage die wichtigsten Resistenzdeterminanten in MRSA, VRE, ESBL und CRE innerhalb von 2,5 Stunden direkt aus bis zu acht verschiedenen Screening-Proben nachzuweisen. Diese Testzeit umfasst zum einen die Durchführung der Probenvorbereitung sowie die Beschickung der 384er Mikrotiterplatte, die zusammen 105 Minuten manuelle Arbeitszeit bedingen und zum anderen die 45-minütige Laufzeit der Real-Time PCR. Durch Integration der TaqMan® Array Card ließe sich die Zahl der Arbeitsschritte und somit die manuelle Arbeitszeit weiter minimieren, sodass eine weitere Reduzierung der Testzeit erreichbar wäre.

Im Vergleich dazu lagen die Ergebnisse der kulturbasierten Routinemethode im Durchschnitt nach 50,5 Stunden vor. Vergleichbare Testsysteme konnten ähnliche Untersuchungszeiten zwischen 1,5 Stunden und 3 Stunden erreichen und waren *in puncto* Testzeit den kulturbasierten Screening-Verfahren, die 24 bis 72 Stunden benötigten, ebenfalls deutlich überlegen [103–105]. Die ermittelten Zeiten für das kulturbasierte Screening beziehen sich dabei meist auf eine Zeitdauer, die neben der initialen Detektion auf Selektivmedien noch zusätzliche Bestätigungstests beinhaltet. Dabei ist anzumerken, dass ein Ausschluss der Anwesenheit eines MRE oft schon nach einer Inkubation über Nacht, d.h. nach 18 bis 24 Stunden möglich wäre, allerdings ist dieses Vorgehen mit mehr falsch-positiven Befunden und somit mit niedrigen prädikativen Vorhersagewerten assoziiert [93,94,238]. Der größte Vorteil des molekularbiologischen Screenings liegt somit in der Schnelligkeit, die einen potentiellen Zeitgewinn von 24 bis 72 Stunden und die frühzeitige und gezielte Ergreifung adäquater Hygiene- oder Therapiemaßnahmen ermöglicht. Folglich könnte das hier vorgestellte System auch als Eingangstest im Zuge der Aufnahme von Patienten in eine stationäre Behandlung erfolgen, vorausgesetzt eine Wartezeit von etwa 90 Minuten wird als zumutbar erachtet.

5.4.6 Limitierungen der Evaluierung der klinischen Leistungsfähigkeit

Die Evaluierung der klinischen Leistungsfähigkeit ist durch die begrenzte Zahl von insgesamt 73 klinischen Proben, die für den Methodenvergleich zur Verfügung standen, limitiert. Insbesondere gilt dies für den Nachweis Carbapenem-resistenter *Enterobacteriaceae*, dessen 100%ige Sensitivität auf der richtig-positiven Detektion einer einzelnen Probe beruht. Des Weiteren ist es aufgrund der geringen Prävalenz einiger Resistenzdeterminanten nicht möglich gewesen für jedes der 42 erfassten Ziel-Gene eine oder mehrere Proben zu akquirieren, die Bakterien mit entsprechenden Resistenzgenen enthielten. Um die Aussagekraft der klinischen Sensitivität für bestimmte, selten vorkommende Resistenzgene zu erhöhen, werden häufig mit Referenzstämmen beimpfte Proben verwendet [224], wobei die Vergleichbarkeit mit realen Proben fraglich ist, da die Bakterien-Konzentration durch das Beimpfen vorbestimmt ist. Bevor eine Einführung in die diagnostische Routine möglich ist, sind daher weitergehende Untersuchungen notwendig, die eine genügend hohe Probenzahl für alle nachzuweisenden Problemkeime sicherstellen. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit durch den gezielten Einschluss von bekannt MRE-positiven Patienten bzw. von Patienten mit Risikofaktoren für eine MRE Besiedelung der Anteil der MRE-positiven Proben soweit erhöht werden, dass eine Aussage zur Machbarkeit eines derartigen molekularbiologischen Screenings zulässig ist.

Eine weitere methodische Limitierung ist durch den Umstand gegeben, dass die in der kulturbasierten Untersuchung nachgewiesenen Isolate nicht archiviert wurden und somit nicht für weiterführende Bestätigungstests zur Verifizierung oder Falsifizierung von falsch-negativen oder falsch-positiven Real-Time PCR Resultaten genutzt werden konnten. Somit bleibt unklar, wodurch die fehlende Übereinstimmung zwischen phänotypischer Resistenz und ermitteltem Genotyp in falsch-positiven oder falsch-negativen Real-Time PCR Reaktionen verursacht wurde.

5.4.7 Aussagekraft als Gesamtsystem

Die Betrachtung der klinischen Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems zeigt, dass die positiv-prädikativen Werte für den Nachweis von MRSA, VRE, ESBL und CRE deutliche Unterschiede aufweisen. Die limitierte Aussagekraft eines positiven Testergebnisses wird dabei entscheidend durch falsch-positive Befunde und der einhergehenden niedrigen Spezifität bedingt. Berücksichtigt man zusätzlich die unter real-klinischen Bedingungen geringeren Prävalenzen der einzelnen Problemkeime, werden die positiven Vorhersagewerte weiter reduziert. Allerdings sind niedrige positive Vorhersagewerte typisch für alle diagnostischen Tests, deren zu diagnostizierende Krankheit nur sehr selten, d.h. mit geringer Prävalenz, vorkommt. Am Beispiel der VRE-Aufnahmeprävalenz von 0,05 % wird klar, dass selbst mit einer 99%igen Sensitivität und Spezifität rechnerisch maximal ein positiv-prädikativer Wert von 4,7 % möglich wäre. Das positive Ergebnis eines einzelnen diagnostischen Tests ist somit per se lediglich ein Hinweis auf das Vorliegen einer MRE-Besiedelung und bedarf weiterer Bestätigungstests. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die einzelnen Nachweise selbst bei geringen

Prävalenzen durch einen hohen negativ-prädikativen Wert und somit durch eine hohe Aussagekraft eines negativen Testergebnisses aus. Ein für die Besiedelung mit MRSA, VRE, ESBL oder CRE negativ getesteter Patient ist folglich mit hohen Wahrscheinlichkeiten von 91,4 %, 96,5 %, 95,0 % oder 100,0 % tatsächlich nicht besiedelt.

Kombiniert man die Nachweise zu einer Gesamtaussage, MRE-positiv oder MRE-negativ, dann ist ein Nachweis mit einer Sensitivität von 68 % und einer Spezifität von 88 % möglich, wobei der positive Vorhersagewert 41,2 % und der negative Vorhersagewert 95,8 % beträgt. Das NanoCHIP® Infection Control Panel (ICP) ist das einzige System mit einem vergleichbaren Ansatz zur parallelen Detektion von MRSA, VRE und *bla* KPC exprimierenden Carbapenem-resistenten Enterobakterien. Weiss *et al.* haben diese Microarray Plattform im Jahr 2014 mit Hilfe von 338 kulturell voruntersuchten Screening-Abstrichen evaluiert und fanden eine Sensitivität von 91,1 %, eine Spezifität von 99,5 %, einen positiv-prädikativen Wert von 99,1 % sowie einen negativ-prädikativen Wert von 94,9 % [192]. Die beschriebenen Leistungsmerkmale sind jedoch nur eingeschränkt mit denen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar. Erstens wurde der *bla* KPC Nachweis nicht mit der kulturbasierten Detektion aller phänotypischen CRE verglichen, sondern lediglich mit dem phänotypischen Nachweis von Isolaten, deren KPC-Produktion durch verschiedene Bestätigungstests belegt wurde. Eine 100%ige Sensitivität und Spezifität gilt somit nur für den Nachweis *bla* KPC tragender CRE (n = 168) und schließt somit andere in Deutschland wesentlich häufiger isolierte Varianten wie OXA-48 (n= 441), VIM-1 (n = 189) und NDM-1 (n = 159) aus [75]. Zweitens wurden für die Evaluation des VRE-Nachweises beimpfte und somit simulierte positiv-Proben verwendet, da keiner der 537 akquirierten Screening-Abstriche VRE-positiv war. Eine Übertragbarkeit auf real-klinische Bedingungen ist fraglich, da nur wenige gut charakterisierte VRE-Isolate in einer festen Konzentration verwendet wurden. Drittens beruhen die Vorhersagewerte auf einer relativ hohen MRE-Prävalenz von rund 38 % im zusammengestellten Probenumfang.

5.4.8 Potentielle Einsatzmöglichkeiten

Mögliche Einsatzgebiete des vorgestellten Real-Time PCR Systems sollten sich an den aktuellen Richtlinien zum Screening von und zum Umgang mit MRE-besiedelten Patienten orientieren. Ein MRE-Aufnahme-Screening wird für Patienten empfohlen, die ein erhöhtes Risiko für eine MRE-Besiedelung entsprechend der KRINKO-Richtlinie haben. Eine vorsorgliche Isolierung wird nur in sehr seltenen Fällen, z.B. bei Verdacht auf eine Besiedelung mit Carbapenemase-resistenten Erregern (4MRGN) empfohlen. Die präventive Isolierung ist solange aufrecht zu erhalten bis eine CRE Besiedelung ausgeschlossen werden kann. Für MRSA, VRE und ESBL (3MRGN) wird eine vorsorgliche Isolierung dagegen nicht empfohlen [36,38]. Das bedeutet, dass diese Patienten erst isoliert werden, wenn ein positiver Screening-Befund vorliegt. Unter Verwendung der konventionellen, kulturbasierten Methoden geschieht dies somit frühestens nach 24 bis 72 Stunden. In dieser Zeitspanne werden entsprechende

Isolationsmaßnahmen entweder verzögert ergriffen oder, im Rahmen einer vorsorglichen Isolierung aller Patienten, zu lange aufrechterhalten.

Im erstgenannten Szenario würde das vorgestellte molekularbiologische Testsystem einen positiven MRE-Befund theoretisch bereits nach 2,5 Stunden liefern und somit eine frühe Entscheidung über Isolationsmaßnahmen ermöglichen. Verschiedene Untersuchungen konnten am Beispiel von MRSA belegen, dass eine derartig schnelle Ergreifung notwendiger Isolationsmaßnahmen die Übertragungsrate und somit das Risiko einer Übertragung von Patient zu Patient oder von Patient zu Personal verringert [239,240]. Die limitierte Spezifität des VRE- und des ESBL-Nachweises bedingt jedoch eine hohe Zahl falsch-positiv getesteter und somit unnötig isolierter Patienten. Somit wären PCR-basierte Resultate als vorläufig einzustufen, die einer parallelen kulturbasierten Bestätigung bedürfen. In einem derartigen parallelen Ansatz ermöglicht der „Schnelltest“ eine vorläufige, aber schnelle Isolation, die bis zum endgültigen kulturellen Ergebnis bestehen bleiben muss. Eine Abschätzung, ob die Zahl der unnötig isolierten Patienten den Vorteil der frühen Isolierung positiver Patienten aufhebt, ist nur durch eine weiterführende Studie möglich, die ein breites Spektrum klinischer und gesundheitsökonomischer Parameter erfasst. Eine derartige Studie wird derzeit, als Weiterführung der hier vorgestellten Arbeit, am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein federführend von Prof. S. Schreiber, Prof. S. J. Ott und Dr. R. Häsler in Zusammenarbeit mit Thermo Fisher initiiert.

Das zweitgenannte Szenario beinhaltet die generelle oder an Risikofaktoren orientierte präventive Isolation von Patienten bei Aufnahme in das Klinikum, die solange bestehen bleibt, bis eine Besiedelung mit MRE ausgeschlossen werden kann. Da derartige Isolationsmaßnahmen mit hohen Kosten sowie erhöhtem Pflegeaufwand verbunden und durch die Zahl der zur Verfügung stehenden Einzelzimmer begrenzt sind, ist es wünschenswert die getroffenen Hygienemaßnahmen möglichst schnell zu deeskalieren. Des Weiteren gehen Isolationsmaßnahmen mit einer Stigmatisierung und einer schlechteren Behandlung des betroffenen Patienten einher [95]. Die sehr guten negativen Vorhersagewerte von 91 %, 96 %, 95 % und 100 % für den jeweiligen Einzelnachweis und 96 % für den generellen MRE-Nachweis bedingen eine hohe Verlässlichkeit des negativen Real-Time PCR Resultates. Folglich bietet eine Anwendung als Ausschlusstest die Möglichkeit getroffene Isolationsmaßnahmen frühzeitig nach 2,5 Stunden aufzuheben. Mit Hilfe verschiedener Real-Time PCR basierter Methoden konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Isolationsdauer und die damit einhergehenden Kosten im Vergleich zum kulturbasierten Screening um bis zu 60 % reduzieren lassen [241,242].

Positive Real-Time PCR Befunde sind in jedem Fall ernst zu nehmen, weshalb die vorsorglich getroffenen Hygienemaßnahmen, basierend auf dem vorläufigen MRE-positiven Schnelltest, bestehen bleiben, bis das endgültige Ergebnis der konventionellen mikrobiologischen Untersuchung vorliegt. Wie wichtig eine zeitnahe Identifizierung MRE-besiedelter Patienten im klinischen Alltag ist, wird am Beispiel des schweren Ausbruchs eines *Acinetobacter baumannii* 4MRGN im Kieler Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) deutlich. Als möglicher Index-Patient gilt ein deutscher Türkeurlauber,

der nach einem Unfall zunächst in der Türkei behandelt und anschließend ins UKSH verlegt wurde. Eine präventive Isolation wurde nicht vorgenommen und die Ergebnisse des kulturbasierten Screenings konnten aufgrund der Dringlichkeit einer stationären Behandlung nicht abgewartet werden. Die anschließende Verlegung in ein Dreibett-Zimmer war dann Ausgangspunkt für die folgenschwere Verbreitung in der Klinik [113]. Das vorgestellte Taqman[®] Real-Time PCR System konnte im Rahmen der klinischen Evaluierung die Probe einer vom Ausbruch betroffenen Patientin richtig identifizieren und hätte es ermöglicht den Index-Patienten innerhalb kürzester Zeit zu identifizieren. Auch wenn diese Schlussfolgerung spekulativ ist, verdeutlicht dieses konkrete Beispiel den potentiellen Nutzen dieses molekularbiologischen Testsystems.

Somit könnten schnelle molekularbiologische Verfahren, in Ergänzung zu den beschriebenen Routine-Screenings, einen erheblichen Zusatznutzen im Management einer Ausbruchssituation speziell mit multiresistenten gramnegativen Stäbchenbakterien bringen, da neben der schnellen Detektion des Ausbruchsstammes auch die Kenntnis des zugrundeliegenden, hochmobilen Resistenzgens von entscheidender Bedeutung ist. Darüber hinaus sind nach Anpassung der Präanalytik auch weitere Einsatzgebiete, z.B. die Infektionsdiagnostik denkbar. Avlami *et al.* konnten beispielsweise für das Hyplex[®] MBL ID System zeigen, dass eine verlässliche Detektion von Metallo- β -Lactamase-Genen aus diversen Probenarten, u.a. Blut, Urin und Sputum, möglich ist [243].

Der größte Vorteil des vorgestellten TaqMan[®] Real-Time PCR Systems, im Vergleich zur konventionellen kulturbasierten Untersuchung, liegt in der außerordentlich kurzen Testzeit, die eine Implementierung eines „*same day*“ MRE-Screenings unmittelbar bei Krankenhausaufnahme ermöglichen könnte. In der abschließenden Betrachtung der klinischen Leistungsfähigkeit ist dabei festzuhalten, dass der molekularbiologische Test aufgrund der hohen negativen Vorhersagewerte in der Lage ist die MRE-Besiedelung eines Patienten sicher auszuschließen. Ein zusätzlicher Nutzen gegenüber der konventionellen kulturbasierten Untersuchung ist insbesondere im Rahmen einer präventiven Isolation zu erwarten. Die geringe Spezifität und der damit einhergehende niedrige positive Vorhersagewert des MRE-Nachweises limitieren den Einsatz als MRE-Suchtest, aus dessen positiv-Befunden entsprechende Hygienemaßnahmen abgeleitet werden könnten. Da sich positive Vorhersagewerte jedoch maßgeblich mit zunehmender Prävalenz der zu detektierenden Problemkeime verbessert, ist eine Anwendung immer vor dem Hintergrund der lokalen Epidemiologie zu sehen.

5.5 Resistenzgene und Pathogene in der Kohorte Flüchtlinge und in einer Stichprobe der nicht hospitalisierten deutschen Bevölkerung

Obwohl resistente Bakterien nicht an Staatsgrenzen gebunden sind, ist es offensichtlich, dass die Resistenzraten in nordeuropäischen Staaten sehr viel geringer sind als in den süd- und osteuropäischen Staaten [54]. Als Konsequenz dessen gilt die Einwanderung aus Ländern oder die Reise durch Länder mit endemischen Resistenz-Vorkommen als Risikofaktor für eine Besiedelung mit MRE, insbesondere wenn ein Kontakt zu dortigen Gesundheits-einrichtungen bestand [37,115–117]. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass infizierte oder kolonisierte Personen als Reservoir und Vehikel für die Verbreitung von MRE in den Krankenhäusern der Zielländer dienen [70,83,84]. Diese Umstände haben an Bedeutung gewonnen, da innerhalb der letzten 5 Jahre mehr als 4,2 Millionen Menschen aufgrund des Syrienkonfliktes aus ihrem Heimatland fliehen mussten [121]. Umliegende Staaten, wie die Türkei, Jordanien oder der Libanon, nehmen einen Großteil der syrischen Flüchtlinge auf. Allerdings versuchen viele von ihnen das Mittelmeer zu überqueren, um über Griechenland Asyl in der Europäischen Union zu finden. Derzeit sieht sich vor allem Deutschland mit mehr als 1 Million Asylanträgen seit dem Jahr 2015 einer großen Einwanderungswelle von Flüchtlingen konfrontiert [244], die entweder aus Ländern mit erhöhter MRE-Prävalenz stammen oder deren Flucht durch MRE-Endemieländer führte, wobei die Auswirkungen auf das Gesundheitssystem im Allgemeinen und auf den klinischen Alltag im Speziellen unklar sind. Daten zum Vorkommen von MRE bei hospitalisierten Patienten liegen aus einigen Herkunftsländern vor und deuten auf eine erhöhte Prävalenz insbesondere ESBL- und Carbapenemase-bildender Erreger hin [54,122–127,245]. Infolgedessen stellen Menschen, die aus oder über MRE-Endemiegebiete flohen und Asyl in Deutschland suchen, möglicherweise ein noch nicht identifiziertes Risiko für das Auftauchen und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im Gesundheitssystem des Ziellandes dar. Zukünftig könnte daher eine aktive Resistenz-Surveillance idealerweise mit Hilfe einer schnellen Diagnostik bei Kontakt mit dem lokalen Gesundheitssystem das Wissen um die Resistenzsituation in dieser Gruppe erweitern und die Patientensicherheit erhöhen.

5.5.1 Erhöhte Prävalenzen von Antibiotikaresistenzgenen in der Kohorte Flüchtlinge

Die vergleichende Untersuchung der Art und des Vorkommens von Antibiotikaresistenzgenen in Stuhlproben aus der Kohorte Flüchtlinge und der Kontrollkohorte lässt drei Hauptaussagen zu:

Erstens wurden Makrolid-Resistenz-vermittelnde Gene wie *ermB* und *mefA* sowohl in den einzelnen Herkunftsgruppen der Kohorte Flüchtlinge als auch in der deutschen Kontrollpopulation mit einer äußerst hohen Prävalenz beobachtet. Vorhergehende Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass diese Determinanten in *Bacteroides*, *Enterococcus* und *Streptococcus* Spezies als Kommensalen der normalen Darmflora weit verbreitet sind [134,246].

Zweitens konnten Varianten des vanB-Clusters, als Vancomycin-Resistenz-vermittelnde Determinante in *E. faecium* und *E. faecalis*, signifikant häufiger in den aus Deutschland stammenden Stuhlproben gefunden werden. Neben diesen beiden klinisch relevanten Spezies wird vanB häufig auch in Spezies der anaeroben Darmflora exprimiert, die ein bedeutendes Reservoir für den horizontale Gentransfer zu klinisch relevanten Enterokokken darstellen [247]. In beiden Fällen lassen sich Prävalenzunterschiede möglicherweise durch den bis 1996 deutschlandweit forcierten Einsatz des Glycopeptids Avoparcin als Wachstumsfaktor in der Tiermast und den in Deutschland erhöhten Verbrauch in der Humanmedizin erklären [114]. Untermauert wird dies durch die zwischen allen Herkunftsländern variierenden Prävalenzen der in *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* intrinsisch vorkommenden und somit expositionsunabhängigen vanC-Gencluster.

Drittens wurde eine Vielzahl von Genen, die häufig klinisch relevante Resistenzen in gramnegativen Enterobakterien und Nonfermentern vermitteln, mit drastisch erhöhten Prävalenzen in der Kohorte Flüchtlinge im Vergleich zu den aus Deutschland stammenden Kontrollen nachgewiesen. Einige dieser Gene, wie z.B. OXA-1 und qnrB, konnten darüber hinaus zwar in allen Herkunftsgruppen der Kohorte Flüchtlinge, nicht aber in der Kontrollkohorte, beobachtet werden.

Während die ersten beiden Erkenntnisse die Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen und somit die Validität des verwendeten mikrofluiden TaqMan® Real-Time PCR Systems bestätigen, scheinen die erhöhten Prävalenzen in der Kohorte Flüchtlinge eine Konsequenz der erheblichen Unterschiede im ambulanten Antibiotikaverbrauch in den einzelnen Herkunftsländern zu sein. Der freie Zugang zu Antibiotika, d.h. eine Abgabe ohne ärztliche Verschreibung, wird in Deutschland aufgrund der rigiden Verschreibungspflicht auf 0 % - 3 % aller Antibiotika-Abgaben durch die Apotheke beziffert. Ähnlich wie bei der Epidemiologie von MRE in Europa folgt der Anteil der frei erhältlichen Antibiotika einem Nord-Süd- bzw. einem Nord-Ost-Gefälle beginnend in Griechenland mit 8 % - 15 % [248], über die Türkei mit 44 % [23] bis hin zu Abu Dhabi, Saudi Arabien und Jordanien mit 46 % - 78 % der Antibiotika-Abgaben in örtlichen Apotheken [249–251]. Auch wenn es keine veröffentlichten Daten zum Antibiotikazugang in den untersuchten Herkunftsländern gibt, stellt die Annahme, dass auch dort freiverkäufliche Antibiotika erhältlich sind, eine mögliche Erklärung für die hohen Prävalenzen in der Kohorte Flüchtlinge dar. Bryce *et al.* konnten 2016 in einer Meta-Analyse ebenfalls beobachten, dass die Resistenzraten von *E. coli* aus Stuhlproben asymptomatischer Kinder in nicht-OECD Ländern wesentlich höher sind als in OECD Ländern und benennen den freien, *over the counter* (OTC) Verkauf von Antibiotika in diesen Ländern als mögliche Ursache [252]. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass die Individuen der Kohorte Flüchtlinge mit signifikant mehr Resistenzgenen belastet waren als die Individuen der deutschen Kontrollgruppe. Vor diesem Hintergrund ist es unklar welche Konsequenzen durch die vermehrte Migration von Menschen mit einer höheren Resistenzgenbelastung für die Patientensicherheit in Gesundheitseinrichtungen im Speziellen und für die hier lebenden Menschen im Allgemeinen zu erwarten sind. Einige Studien deuten zumindest darauf

hin, dass Reiserückkehrer und auch Einreisende aus Ländern mit hoher MRE-Prävalenz das Hauptrisiko für das Auftauchen und die Verbreitung neuer Resistenzen in Gesundheitseinrichtungen des Ziellandes darstellen [84,116]. Beispielhaft lässt sich das erste Auftreten einer NDM-Carbapenemase in Schweden auf einen in Indien behandelten Patienten [118] und einer KPC-Carbapenemase in Deutschland auf einen in Griechenland behandelten Patienten zurückführen [119]. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikant höheres Vorkommen von Carbapenemase-Genen in der Kohorte Flüchtlinge festgestellt werden, was aufgrund des geringen Durchschnittalters und der damit einhergehenden geringen Wahrscheinlichkeit einer Hospitalisierung plausibel erscheint. Von Wintersdorff *et al.* konnten zeigen, dass die in den Reiseländern hochprävalenten ESBL-Gene häufig von Reisenden mitgebracht wurden, wohingegen das Vorkommen von Resistenzgenen mit ähnlichen Prävalenzen in beiden Ländern vor und nach der Reise stabil blieb, was unsere Beobachtung zur Verteilung von *ermB* wider spiegelt [116].

5.5.2 Resistenzgene und Pathogene spiegeln die physiologische Standortflora des inguinalen Hautareals und der nasalen Schleimhäute wider

Zusätzlich zu den Stuhlproben wurden im Rahmen der medizinischen Erstuntersuchung kombinierte Abstriche des Rachens und der Nasenvorhöfe sowie Abstriche der linken und rechten Leistengegend genommen und anschließend mit den molekularbiologischen Methoden sowie der kulturbasierten Screening-Methode parallel untersucht. Das Pathogenprofil, basierend auf der 16S rRNA-Gensequenzierung, ist durch eine hohe Prävalenz der Standortflora-typischen potentiellen Pathogene *S. aureus*, *S. epidermidis* (Phylum *Firmicutes*) und *H. Influenzae* (Phylum *Proteobacteria*) gekennzeichnet [253]. Eine Kolonisation mit *S. aureus* konnte bei 12,3 % der Individuen der Kohorte Flüchtlinge festgestellt werden, wobei andere Studien ähnliche Kolonisationsraten von 17,8 % - 36,5 % in der Normalbevölkerung einiger Länder des Mittleren Ostens ergaben [254–256]. Passend zum Vorkommen bestimmter *Staphylococcus* Spezies zählt das Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA*-Gen mit einer Prävalenz von 89,3 % zu den häufigsten Resistenzdeterminanten. In der wissenschaftlichen Literatur ist nur wenig über die Prävalenz aller *mecA*-Gen tragenden Staphylokokken bekannt, allerdings konnte eine finnische Studie zeigen, dass 61 % der Einwohner eines Langzeitpflegeheims mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus* Spezies besiedelt waren [257]. Die klinische Relevanz einer derartig hohen Prävalenz ist unklar. Sicher ist, dass neben *S. aureus* auch andere Koagulase-negative Staphylokokken (KONS) häufige Verursacher Geräte-assoziiertes Infektionen sind, die bei Vorliegen einer Methicillin-Resistenz schwer zu behandeln sind. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass *S. aureus* über einen horizontalen Gentransfer in der Lage ist, eine Methicillin-Resistenz *in vivo* von *mecA*-positiven KONS zu erwerben [138]. Da sich die Prävalenzen einzelner Pathogene und Resistenzdeterminanten nur in wenigen Fällen signifikant zwischen den Herkunftsgruppen innerhalb der Kohorte Flüchtlinge

unterscheiden, ist davon auszugehen, dass keine länderspezifischen Risikofaktoren existieren.

Mit Hilfe des kulturbasierten MRE-Screenings wurden Methicillin-resistente *S. aureus* und ESBL-bildende Enterobakterien mit einer Prävalenz von 6,3 % und 1,6 % in der Kohorte Flüchtlinge beobachtet. Carbapenemase-bildende Enterobakterien oder Vancomycin-resistente Enterokokken wurden hingegen in keiner Probe gefunden. Da Abstrich-Proben aus einer entsprechenden Vergleichsgruppe nicht zugänglich waren, ist die Aussagekraft dieser Beobachtungen limitiert. Dennoch deuten einige Studien zum Vorkommen von MRSA in der nicht-hospitalisierten deutschen Bevölkerung mit Prävalenzen zwischen 0,7 % - 1,3 % daraufhin, dass eine MRSA-Besiedelung um ein Vielfaches häufiger in der Kohorte Flüchtlinge vorkommt [258,259].

Vergleichbare Daten zur Prävalenz von ESBL- oder Carbapenemase-bildenden Bakterien in der deutschen Bevölkerung existieren hingegen mehrheitlich nur für die Untersuchung von Stuhlproben, wobei Besiedelungsraten zwischen 4,1% - 6,3 % bzw. 0,0 % - 0,03 % beobachtet wurden [260,261]. Köck *et al.* haben 1878 Nasenabstriche von freiwilligen, nichthospitalisierten Probanden aus Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen untersucht und konnten keine ESBL- oder Carbapenemase-bildenden Enterobakterien nachweisen [258], wohingegen Ruscher *et al.* anhand von Leistenabstrichen eine ESBL-Prävalenz von rund 4 % in Bewohnern von Langzeitpflegeeinrichtungen beschrieben. Ausgehend von diesen Daten scheint das Risiko für eine ESBL- oder CRE-Besiedelung in der Kohorte Flüchtlinge und somit einem Abbild der gesunden Bevölkerung in den Herkunftsländern, im Vergleich zur deutschen Bevölkerung nicht substantiell erhöht zu sein. Dennoch deutet eine andere kürzlich veröffentlichte Studie darauf hin, dass diese Zahlen das tatsächliche MRE-Vorkommen in der Gruppe der Flüchtlinge unterschätzen. Reinheimer *et al.* haben in einem Zeitraum von Juni bis Dezember 2015 insgesamt 143 Flüchtlinge bei Krankenhausaufnahme auf das Vorhandensein von MRE hin untersucht und mit 1489 Patienten desselben Krankenhauses, ohne Fluchthintergrund, verglichen. Die MRSA-Prävalenz in den mehrheitlich aus Syrien und Afghanistan stammenden Flüchtlingen war mit 5,6 % um ein Vielfaches höher als in der untersuchten Vergleichsgruppe mit 1,2 % und spiegelt die in dieser Arbeit erhobenen Daten wider. ESBL- und CRE-bildende Spezies wurden mit Prävalenzen von 60,8 % vs. 16,7 % und 2,1 % vs. 1,2 % in der Gruppe der Flüchtlinge bzw. in der Vergleichsgruppe beobachtet [129]. Die große Differenz in den erhobenen Daten wird möglicherweise durch die im Vergleich zu Stuhlproben oder Rektalabstrichen geringere Sensitivität der Leistenabstriche für die Detektionen von Enterobakterien und Enterokokken bedingt [172,262]. In der Zusammenschau deuten die differierenden Daten darauf hin, dass die erhöhten MRE-Prävalenzen innerhalb der Flüchtlingspopulation von anderen Risikofaktoren als der bloßen Herkunft, z.B. von Vorerkrankungen oder vorhergehenden Hospitalisierungen, abhängig sind.

5.5.3 Resistenzgene treten unabhängig von Pathogenen auf

Mit Hilfe der Sequenzierung der V3-V4 Region des bakteriellen 16S rRNA-Gens konnten die in den Stuhlproben vorkommenden bakteriellen Phyla bis hin zur Spezies identifiziert werden. Die Analyse hat gezeigt, dass sowohl in der Kohorte Flüchtlinge als auch in der Kontrollkohorte verschiedene obligat oder fakultativ pathogene Spezies vorkommen, wobei *E. coli* das mit Abstand häufigste potentielle Pathogen in beiden Kohorten darstellt. Dies war zu erwarten, da *Escherichia* und andere Enterobakterien-Gattungen, wie *Klebsiella*, zur physiologischen Darmflora des Menschen gehören. Allerdings zählt *E. coli* zu den häufigsten Verursachern von Sepsis, Meningitis, Zystitis und nosokomialen Pneumonien sofern eine Infiltration dieser Körperareale erfolgte [1]. Die opportunistischen Pathogene *B. fragilis* und *S. agalactiae* wurden dagegen signifikant häufiger in den Stuhlproben der deutschen Kontrollgruppe beobachtet. Derartige Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms können neben einer Antibiotikaexposition [263] auch durch den Lebensstil oder verschiedene Umwelteinflüsse verursacht werden [264]. Da bekannt ist, dass *B. fragilis* über die Beeinflussung der Differenzierung von CD4+ T-Zellen eine anti-entzündliche Immunantwort nicht nur lokal in der Darmmukosa sondern auch im systemischen Kreislauf des Wirtes triggert [265], sollten zukünftige Untersuchungen durch eine tiefergehende Analyse der Mikrobiom-Daten die Bedeutung dieses Befundes klären. Dennoch wird durch die singuläre Betrachtung der pathogenen Spezies deutlich, dass der überwiegende Teil der deutschen Kontrollgruppe mehr als 1 pathogenen Erreger trägt, wohingegen in der Kohorte Flüchtlinge mehrheitlich weniger als 1 Pathogen pro Individuum beobachtet werden konnte. Eine inverse Beziehung deutet daraufhin, dass das vermehrte Vorkommen von Resistenzgenen nicht mit der Prävalenz pathogener Spezies assoziiert ist. Diese Erkenntnis wird dadurch unterstrichen, dass Resistenzdeterminanten nicht nur in Pathogenen, sondern mehrheitlich auch in apathogenen Kommensalen der bakteriellen Flora vorkommen und somit ein enorm diverses Resistenzgenreservoir bilden [25]. Besonders die Darmflora bildet aufgrund der großen Bakterienvielfalt und der hohen Bakteriendichte eine hervorragende Umgebung für den horizontalen Austausch von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Spezies und folglich auch zwischen apathogenen Kommensalen und opportunistischen Pathogenen [247]. Tatsächlich konnten in vielen Untersuchungen die Übertragung von Resistenzgenen zwischen Antibiotika-resistenten und initial Antibiotika-sensiblen Bakterien im menschlichen Darm und deren klinische Auswirkungen belegt werden. Crémet *et al.* berichten von einer konjugativen Übertragung eines *bla* OXA-48 tragenden Plasmids von einem *E. cloacae* Stamm zu anderen *Enterobacteriaceae* Stämmen, wie *K. pneumoniae* und *E. coli*, innerhalb der Darmflora des Index-Patienten, die anschließend auch auf andere Patienten übertragen wurden [27]. Andere Beispiele umfassen die intrainestinale Übertragung von *vanA* zwischen einem *E. faecium* Stamm tierischen Ursprungs auf einen Vancomycin-sensiblen *E. faecium* menschlichen Ursprungs [28] und die extensive Transmission von *erm* und *tetQ* Genen innerhalb verschiedener *Bacteroides* Spezies sowie zwischen *Bacteroides* und anderen gram-positiven Spezies, die lediglich passager im menschlichen Darm vorkommen [29]. Dieser

horizontale Gentransfer basiert auf verschiedenen Mechanismen (Konjugation, Transduktion, Transformation) und wird häufig durch eine Antibiotikaexposition getriggert [25]. Unsere Daten lassen keinen Schluss über einen möglichen horizontalen Austausch von Resistenzgenen zu, dennoch sollten aufgrund des Vorhandenseins diverser übertragbarer Resistenzdeterminanten zukünftige Untersuchungen den horizontalen Gentransfer näher beleuchten.

5.6 Einsatzfähigkeit des Detektionssystems in großen Probenzahlen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TaqMan® Array Card (TAC) eine nützliche Plattform für die Hochdurchsatzanalyse von genomischer DNA aus insgesamt 959 klinischen Abstrich- und Stuhlproben darstellt. Gleichzeitig wurde eine TAC Plattform erstmalig zur Detektion von 37 relevanten bakteriellen Resistenzgenen direkt aus klinischen Proben verwendet. Die Einsatzfähigkeit des vorgestellten Systems konnte im Rahmen der Untersuchung zum Vorkommen multiresistenter Erreger in einer Kohorte Flüchtlinge und einer Kohorte deutscher Einwohnermeldeamts-Kontrollen anhand von 3 zentralen Erkenntnissen gezeigt werden. Zum einen konnte das über alle Gruppen weitverbreitete Vorkommen der Makrolid-Resistenzdeterminanten ermB und mefA bestätigt werden. Zum anderen konnte eine Vielzahl von Resistenzdeterminanten, v.a. β -Lactamase-Gene, identifiziert werden, die signifikant häufiger in der Kohorte Flüchtlinge vorkamen, wohingegen das Vancomycin-Resistenz-vermittelnde vanB Gen signifikant häufiger in der Kontrollgruppe zu finden war. Des Weiteren konnten in Abhängigkeit von der untersuchten Probenart Resistenzgene identifiziert werden, die für die jeweilige Standortflora typisch sind, was die Verwendbarkeit diverser Probenmaterialien untermauert.

Im Allgemeinen ermöglicht die Mikrofluidik-Architektur die qualitative und quantitative Analyse von maximal 48 Ziel-Genen in bis zu acht verschiedenen Proben, basierend auf parallelen *singleplex* Real-Time PCR Reaktionen. Da sich die erforderlichen TaqMan® Primer- und SONDENSSETS bereits in getrockneter Form in den einzelnen Kavitäten der TAC befinden, entfallen mehrere Pipettierschritte zur Herstellung des Reaktionsansatzes, was einen wesentlich geringeren Arbeits- und Zeitaufwand sowie damit einhergehend die Minderung des Risikos einer Kreuzkontamination ermöglicht, ohne eine zusätzliche, kostenintensive Automatisierung zu implementieren. Gleichzeitig werden beim Wechsel von einer 384er Mikrotiterplatte auf eine TAC Plattform die Reaktionsvolumina und somit auch die Kosten für den eingesetzten Mastermix auf 1/10tel reduziert. Das minimale Reaktionsvolumen verringert jedoch auch das zur Verfügung stehende Probevolumen, die detektierbare DNA-Menge und somit möglicherweise auch die analytische Sensitivität [193]. Dennoch konnte sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass durch die Optimierung einzelner Komponenten des Testsystems, vor allem aber der Probenaufarbeitung, eine Abnahme der analytische Sensitivität verhindert werden kann [182].

Unter Verwendung des TaqMan® Fast Universal Mastermixes und der beschriebenen Reaktionsparameter konnten mit Hilfe eines ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems acht Proben innerhalb von 50 Minuten und 64 Proben innerhalb eines 8 Stunden Tages untersucht werden. Eine manuelle Tätigkeit, in Form eines Plattenwechsels, ist jeweils erst nach 45 Minuten notwendig, was die parallele Durchführung anderer Labortätigkeiten ermöglicht. Bei einer vollen Auslastung des Gerätes ist eine Auswertung aller 959 Proben theoretisch innerhalb von 15 Tagen denkbar.

Die schnelle und kosteneffiziente Detektion einer großen Bandbreite von Resistenzgenen erlaubt den simultanen Nachweis der vier wichtigsten multiresistenten Problemkeime – MRSA, VRE, ESBL und CRE – aus einer einzelnen klinischen Probe heraus. Die kurze Analysenzeit gepaart mit einem hohen Probendurchsatz ist besonders in Ausbruchssituationen und im Rahmen eines MRE-Aufnahmescreenings nützlich, in denen die Erreger zunächst unbekannt und die Identifizierung der zugrundeliegenden Resistenzdeterminante von enormer Bedeutung sind [109,266]. Nicht zuletzt bietet ein molekularbiologischer Ansatz im Vergleich zu konventionellen mikrobiologischen Methoden die Möglichkeit diverse bakterielle Resistenzgene auch in anspruchsvoll oder nicht kultivierbaren Bakterien und somit in einem größeren Spektrum an Spezies zu identifizieren, was besonders in der Erforschung der Epidemiologie und Dynamik von Antibiotikaresistenzgenen in verschiedenen mikrobiellen Ökosystemen von Nutzen sein kann.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Das übergreifende Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer TaqMan® Real-Time PCR basierten molekularbiologischen Methode, die einen schnellen Nachweis der Antibiotikaresistenz-vermittelnden Gene in den vier klinisch wichtigen Problemkeimen Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN), die β -Lactamasen mit breitem Wirkspektrum (ESBL) und/oder Carbapenemasen (CRE) produzieren, gestattet. In der Zusammenschau der Ergebnisse ermöglicht das Zusammenspiel einer einfachen Probenaufarbeitung, eines breiten Ziel-Gen-Spektrums und einer leistungsfähigen und robusten TaqMan® Real-Time PCR die schnelle und sichere Detektion dieser Problemkeime direkt aus klinischen Abstrich-Proben. Folglich stellt dieses System ein attraktives Werkzeug für das Screening auf multiresistente Erreger im Rahmen einer Krankenhausaufnahme dar. In Ergänzung zu den konventionellen kulturbasierten Screening-Methoden könnte dieses Testsystem innerhalb von 2,5 Stunden die Entscheidung über die Notwendigkeit gezielter Hygienemaßen erlauben. Die Integration des mikrofluiden TaqMan® Array Card (TAC) Formates lässt potentiell eine weitere Verkürzung der Testzeit auf 1,5 Stunden bei gleichzeitiger Reduzierung des Bedarfs an kostenintensiven Reagenzien und der Gefahr potentieller Kreuz-kontaminationen zu. Zukünftige Untersuchungen müssen jedoch in einem weiteren Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard anhand einer hinreichend großen Probenzahl zeigen, ob die Parameter der klinischen Leistungsfähigkeit auf das TAC Format übertragbar sind.

Unter Berücksichtigung der rasant zunehmenden Antibiotika-Resistenzraten, der immer häufiger werdenden Ausbrüche multiresistenter Keime und der erhöhten Morbidität und Mortalität möglicher Infektionen sind durch den Einsatz eines solchen Schnelltests geringere Übertragungsraten und sowohl positive therapeutische als auch positive ökonomische Effekte zu erwarten [92]. Da die parallele, molekularbiologische Detektion von MRSA, VRE, ESBL und CRE einen neuen Ansatz darstellt, müssen diese Effekte allerdings in kontrollierten Studien noch quantifiziert werden. Im Zuge dessen wird eine Pilotstudie zur zukünftigen Implementierung des vorgestellten TaqMan® Real-Time PCR in die Routinediagnostik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein angestrebt und geplant.

Die Einsatzfähigkeit der TAC zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen konnte dagegen bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Die vorgestellten Daten liefern erstmalig wesentliche Erkenntnisse zur Art und der Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen in der bakteriellen Darmflora von Flüchtlingen, die aus Syrien, dem Irak, Afghanistan und den angrenzenden Ländern stammen, im Vergleich zu gesunden, in Deutschland gemeldeten Freiwilligen. Die hohe Prävalenz einiger Resistenzdeterminanten in der Kohorte Flüchtlinge und die Beobachtung, dass diese unabhängig von potentiellen Pathogenen auftreten, deuten darauf hin, dass nicht nur die phänotypische Resistenz in Problemkeimen, sondern auch die zugrundeliegenden Resistenzgene in apathogenen Kommensalen der mikrobiellen Flora größerer Aufmerksamkeit bedürfen. Die Bedeutung dieser ersten Erkenntnisse muss vor dem Hintergrund eines möglichen horizontalen Gentransfers innerhalb mikrobieller Ökosysteme untersucht werden. Zukünftige Studien sollten daher durch periodische Nachfolgeuntersuchungen klären, wie lange diese mehrheitlich erworbenen Resistenzgene in der mikrobiellen Flora verbleiben und ob die Persistenz oder der horizontale Gentransfer durch eine Antibiotikatherapie getriggert wird.

Im Hinblick auf eine zukünftige Routine-Anwendung ist die regelmäßige Reevaluierung und Aktualisierung des bestehenden Ziel-Gen Portfolios von entscheidender Bedeutung um für die Bedrohung durch neue Determinanten wie z.B. das erst kürzlich entdeckte Plasmid-kodierte Colistin-Resistenzgen *mcr-1* gewappnet zu sein [267].

6 Zusammenfassung

Multiresistente Erreger, die gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent sind, stellen eine der größten Gesundheitsgefahren für den Menschen im 21. Jahrhundert dar [44,46,76]. Problemkeime wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN), die β -Lactamasen mit erweitertem Wirkspektrum (ESBL) produzieren und/oder Carbapenem-resistent (CRE) sind, verursachen immer häufiger nosokomial und ambulant erworbene Infektionen, deren Therapieoptionen aufgrund des Fehlens wirksamer Antibiotika limitiert sind [41] und mit höheren Mortalitäts- und Morbiditätsraten sowie enormen ökonomischen Belastungen für die Gesellschaft einhergehen [30,42–44]. Ein Großteil der in deutschen Krankenhäusern registrierten MRE-Fälle kann auf Patienten zurückgeführt werden, die bereits bei Krankenhausaufnahme asymptomatisch besiedelt waren [33,34] und somit als Reservoir und Vehikel für die Verbreitung innerhalb der Klinik dienen [70,83–86]. Zu den Risikofaktoren einer MRE-Besiedelung zählt u.a. der Kontakt zu Gesundheitseinrichtungen in Ländern mit endemischen MRE-Vorkommen [37,115–117]. Gleichzeitig sieht sich Deutschland mit einer großen Zahl von Flüchtlingen konfrontiert, die aus oder über Länder flohen, in denen MRE endemisch vorkommen [122–128]. Auch wenn einige Studien auf eine vielfach höhere MRE-Prävalenz bei hospitalisierten Flüchtlingen hinweisen, ist die MRE-Belastung bei gesunden, nicht-hospitalisierten und somit den meisten Flüchtlingen unbekannt [129–131]. Vor diesem Hintergrund ist es essentiell, dass MRE-tragende Patienten frühzeitig durch ein aktives Screening identifiziert und adäquate Hygienemaßnahmen zur Vermeidung einer nosokomialen Transmission ergriffen werden.

In der mikrobiologischen Routinediagnostik ist der kulturbasierte Nachweis mittels chromogener Selektivmedien i.d.R. erst nach 18 – 72 Stunden möglich. Bedingt durch die lange Testzeit werden gezielte Hygienemaßnahmen sowohl verzögert ergriffen als auch, im Falle einer vorsorglichen Isolierung, unnötig lange aufrechterhalten, wodurch entweder das Transmissionsrisiko steigt oder das Patientenbefinden und die Behandlungsqualität leiden [95,96]. Neue Real-Time PCR basierte Methoden sind in der Lage die resistenzvermittelnden Gene kulturunabhängig direkt aus Patientenproben innerhalb von 2 – 6 Stunden nachzuweisen und haben das Potential Transmissionsraten zu senken, Isolationszeiten zu verkürzen und Kosten zu sparen [110,111]. Bisherige Testsysteme fokussieren sich jedoch auf den Nachweis weniger Resistenzdeterminanten in MRSA, VRE und CRE, bedürfen einer separaten Probe je Erreger und beinhalten eine aufwendige Probenaufarbeitung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein TaqMan® Real-Time PCR System in Kombination mit einer einfachen Probenaufbereitung zu etablieren, das den parallelen Nachweis klinisch relevanter Resistenzgene in MRSA, VRE, ESBL und CRE direkt aus Screening-Abstrichen ermöglicht. Um das vorgestellte System zu validieren, sollte zum einen die technische Leistungsfähigkeit anhand von Referenzstämmen und zum anderen die diagnostische Leistungsfähigkeit anhand von klinischen Abstrich-Proben im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard untersucht werden. Darüber hinaus sollten die in

Einzelreaktionen etablierten TaqMan® Real-Time PCR Assays in das TaqMan® Array Card Format, als mikrofluide Plattform zur Hochdurchsatzgenanalyse, integriert und anschließend in einem Forschungsvorhaben zum Vorkommen von MRE und der zugrundeliegenden Resistenzgene in einer Kohorte Flüchtlinge angewendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in einer Konzeptionierungsphase zunächst 37 Primer- und Sondensets in Kooperation mit Thermo Fisher Scientific entwickelt und ausgewählt, die die wichtigsten Resistenzgene in den betreffenden MRE erfassen. Zusätzlich wurden drei Makrolid-resistenzvermittelnde und zwei Chinolon-resistenzvermittelnde Ziel-Gene adressiert. Darüber hinaus umfasst das vorgestellte System drei speziesspezifische Assays zur Identifizierung von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *A. baumannii* sowie drei Assays zur Kontrolle einer adäquaten DNA-Extraktion und -Amplifikation.

In der anschließenden Etablierungsphase wurde die technische Leistungsfähigkeit der zugrundeliegenden TaqMan® Real-Time PCR mit Hilfe von 72 Referenzstämmen mit definiertem Resistenzgenotyp hinsichtlich analytischer Sensitivität und Spezifität, sowie Linearität und Robustheit untersucht, wobei die Ergebnisse durch SYBR-Green Schmelzkurvenanalysen und Endpunkt-PCRs mittels veröffentlichter Primer gesichert wurden. Da weder falsch-positive noch falsch-negative Resultate beobachtet wurden, zeichnen sich die einzelnen Primer- und Sondensets durch eine hohe analytische Spezifität aus und sind somit in der Lage Ziel-Gene auch in komplexen Proben richtig zu identifizieren. Anhand von DNA-Verdünnungsreihen konnte zudem gezeigt werden, dass die einzelnen Assays unter den gewählten universellen Amplifikationsbedingungen hohe PCR-Effizienzen (Spannweite: 65,5 % – 114,0 %) aufweisen und somit über eine hohe analytische Sensitivität verfügen, die es ermöglicht noch bis zu 1 GE pro 10 µl Reaktionsvolumen (Spannweite: 1 GE – 29 GE) zu detektieren. Die Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass die Integration des TaqMan® Array Card Formates, trotz des reduzierten Reaktionsvolumens von 1 µl, keinen Sensitivitätsverlust zur Folge hat und Nachweisgrenzen zwischen 1 GE und 32 GE möglich sind.

Um eine schnelle und unkomplizierte Probenaufarbeitung zu ermöglichen, wurden parallel zur Etablierung der Real-Time PCR vier verschiedene DNA-Extraktionsmethoden anhand zweier Modelstämmen in unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen untersucht und verglichen. Die thermische Lyse, angelehnt an das Protokoll von Reischl *et al.*, ermöglicht auch bei niedrigen Ausgangskeimzahlen eine hohe Extraktionseffizienz, ist mit der nachfolgenden Real-Time PCR kompatibel, zeichnet sich zudem durch einen geringen zeitlichen und apparativen Aufwand aus und bildete folglich die Methode der Wahl.

Die klinische Leistungsfähigkeit des TaqMan® Real-Time PCR Systems wurde in Kombination mit der schnellen und unkomplizierten Probenaufarbeitung anhand von 73 Screening-Proben aus einer Kohorte von stationären Patienten evaluiert. Die Überprüfung der Aussagekraft des molekularbiologischen MRE-Nachweises erfolgte dabei im Vergleich zum kulturbasierten Screening mittels chromogener Selektivmedien, das derzeit den Goldstandard für die schnelle MRE-Verdachtssuche darstellt. Die vergleichende Untersuchung hat gezeigt, dass der Nachweis von MRSA, VRE, ESBL

und CRE, separat betrachtet, mit Sensitivitäten von 33 %, 85 %, 75 % und 100 % sowie mit Spezifitäten von 100 %, 93 %, 59 % und 100 % möglich ist. Die prädikativen Werte für positive (PPV) und negative Testresultate (NPV) betragen in der untersuchten Kohorte 100 %, 73 %, 19 % und 100 % sowie 91 %, 96 %, 95 % und 100%. In der Betrachtung des Testsystems als Ganzes ist ein MRE-Nachweis mit einer Sensitivität und Spezifität von 68 % und 88 % sowie einem PPV und NPV von 41 % und 96 % möglich. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der molekularbiologische MRE-Nachweis mit einer Testzeit von 2,5 Stunden um ein Vielfaches schneller möglich ist, als mit der kulturbasierten Routinemethode, bei der Screening-Ergebnisse im Mittel frühestens nach 50,5 Stunden vorliegen.

Die Evaluierung des Testsystems in der Kohorte stationäre Patienten sowie die anschließende Integration des TaqMan® Array Card Formates bildeten die Grundlage für die erstmalige Anwendung in einem Forschungsvorhaben zum Vorkommen von MRE in einer Kohorte Flüchtlinge. Unter Verwendung des vorgestellten TaqMan® Real-Time PCR Systems und der 16S rRNA-Genanalyse als molekularbiologische Methoden konnten erstmals Antibiotikaresistenzgene und der bakterielle Teil des menschlichen Darm-Mikrobioms aus insgesamt 460 Stuhlproben in einer Kohorte von Flüchtlingen und in einer Kohorte von deutschen Kontrollen anhand kulturunabhängiger Daten vergleichend untersucht werden. Darüber hinaus konnten insgesamt 506 Screening-Abstriche akquiriert und sowohl mit den beiden molekularbiologischen Verfahren als auch mit der kulturbasierten Routinemethode untersucht werden. Die resultierenden Erkenntnisse münden in drei Hauptaussagen: 1) Makrolid-resistenzvermittelnde Gene, wie *ermB* und *mefA* kommen unabhängig vom jeweiligen Herkunftsland mit einer hohen Prävalenz vor. 2) Varianten des *vanB*-Genclusters, die eine Vancomycin-Resistenz in VRE vermitteln können, kommen signifikant häufiger in den aus Deutschland stammenden Kontrollen vor. 3) Determinanten, wie TEM, SHV, OXA-1, CTX-M 1 und *qnrB*, die klinisch relevante Resistenzen in MRGN vermitteln, wurden hingegen mit einer teils drastisch erhöhten Prävalenz in der Kohorte Flüchtlinge nachgewiesen. Bemerkenswert ist zudem, dass Antibiotikaresistenzgene unabhängig von Pathogenen auftreten und möglicherweise als Reservoir für eine Verbreitung via horizontalem Gentransfer zur Verfügung stehen.

Der schnellen Diagnostik kommt eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung der Ausbreitung von MRE zu. Das vorliegende molekularbiologische Testsystem ist in der Lage die wichtigsten Resistenzdeterminanten in MRSA, VRE, ESBL und CRE innerhalb weniger Stunden direkt aus Screening-Proben nachzuweisen. Es ermöglicht im Vergleich zum kulturbasiertem Screening einen enormen Zeitgewinn und könnte somit potentiell als „same day“ MRE-Screeningtest unmittelbar bei Krankenhausaufnahme eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Aussagekraft eines negativen Testergebnisses sind insbesondere im Rahmen einer präventiven Isolation kürzere Isolationszeiten und somit positive therapeutische und ökonomische Effekte zu erwarten. Darüber hinaus konnten erstmals molekularbiologische Daten über die Art und Häufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen und Problemkeimen, wie MRSA, VRE und MRGN, in einer Gruppe von Flüchtlingen erhoben und somit die Einsatzfähigkeit des vorgestellten

TaqMan® Real-Time PCR Systems belegt werden. Da Resistenzdeterminanten, die häufig eine Multiresistenz in gramnegativen Erregern vermitteln mit stark erhöhten Prävalenzen in der Kohorte Flüchtlinge vorkommen, sollten Antibiotikaresistenzgene, vor dem Hintergrund eines möglichen horizontalen Gentransfers, stärker in Gesundheitseinrichtungen berücksichtigt und potentielle Risiken für Betroffene erforscht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, Herausgeber. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. 954 S. (Springer-Lehrbuch).
2. Best M, Neuhauser D. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Health Care*. Juni 2004;13(3):233–4.
3. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol* [Internet]. 2010 [zitiert 21. Oktober 2016];1. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00134/abstract>
4. Domagk G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. Februar 1935;61(07):250–3.
5. Nobel Media. Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin [Internet]. 2014 [zitiert 12. Januar 2017]. Verfügbar unter: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html
6. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 9. Januar 2010;74(3):417–33.
7. Chen LF. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a superbug. *Am J Infect Control*. Mai 2013;41(5):448–51.
8. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. Juli 2007;20(3):440–58.
9. Petković H, Cullum J, Hranueli D, Hunter IS, Perić-Concha N, Pigac J, u. a. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiol Mol Biol Rev*. September 2006;70(3):704–28.
10. Barlow M, Hall BG. Phylogenetic Analysis Shows That the OXA β -Lactamase Genes Have Been on Plasmids for Millions of Years. *J Mol Evol*. 1. September 2002;55(3):314–21.
11. Hall BG, Barlow M. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*. 1. April 2004;7(2):111–23.
12. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*. Oktober 2014;21:45–50.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services; 2014 Juli [zitiert 1. März 2016] S. 114. Verfügbar unter: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
14. Aarestrup FM. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents*. August 1999;12(4):279–85.
15. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*

- [Internet]. 5. Juni 2015 [zitiert 11. Juli 2016];370(1670). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424433/>
16. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem.* 1. Dezember 2009;28(12):2522–7.
 17. Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature.* 8. August 2002;418(6898):671–7.
 18. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, u. a. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet.* 15. Januar 2016;387(10014):176–87.
 19. Robinson TP, Wertheim HFL, Kakkar M, Kariuki S, Bu D, Price LB. Animal production and antimicrobial resistance in the clinic. *The Lancet.* 15. Januar 2016;387(10014):e1–3.
 20. Harris G. Antibiotics for Livestock Will Require Prescription, F.D.A. Says. *The New York Times* [Internet]. 11. April 2012 [zitiert 21. Oktober 2016]; Verfügbar unter: <http://www.nytimes.com/2012/04/12/us/antibiotics-for-livestock-will-require-prescription-fda-says.html>
 21. World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance [Internet]. Geneva: WHO; 2014. Verfügbar unter: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
 22. Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V, Abteilung für Infektiologie an der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg. GERMAP 2015 - Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland [Internet]. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2016. Verfügbar unter: <http://www.p-e-g.org/econtext/germap>
 23. Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, Weisenberg S. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* September 2011;11(9):692–701.
 24. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet.* 18. Februar 2005;365(9459):579–87.
 25. Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist.* 2014;7:167–76.
 26. Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, Mejía-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete KM, u. a. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature.* 12. Mai 2016;533(7602):212–6.
 27. Crémet L, Bourigault C, Lepelletier D, Guillouzouic A, Juvin M-E, Reynaud A, u. a. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* highlighting the interspecies transferability of the blaOXA-48 gene in the gut flora. *J Antimicrob Chemother.* 4. Januar 2012;67(4):1041–3.

28. Lester CH, Frimodt-Møller N, Sørensen TL, Monnet DL, Hammerum AM. In Vivo Transfer of the vanA Resistance Gene from an *Enterococcus faecium* Isolate of Animal Origin to an *E. faecium* Isolate of Human Origin in the Intestines of Human Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* Februar 2006;50(2):596–9.
29. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol.* Februar 2001;67(2):561–8.
30. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, u. a. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* Dezember 2013;13(12):1057–98.
31. SARI. Surveillance der Antibiotika-Anwendung und bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen [Internet]. 2015 [zitiert 19. Januar 2017]. Verfügbar unter: <http://sari.eu-burden.info/>
32. Gastmeier P, Geffers C. Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? *DMW - Dtsch Med Wochenschr.* Mai 2008;133(21):1111–5.
33. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. Erreger-Surveillance im Modul STATIONS-KISS [Internet]. 2015 [zitiert 28. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.nrz-hygiene.de/surveillance/kiss/stations-kiss/erreger/>
34. Schulz-Stübner S, Dettenkofer M, Mattner F, Meyer E, Mahlberg R, Herausgeber. *Multiresistente Erreger: Diagnostik - Epidemiologie - Hygiene - Antibiotika-„Stewardship“.* Berlin Heidelberg: Springer; 2016. 104 S.
35. Safdar N, Maki DG. The Commonality of Risk Factors for Nosocomial Colonization and Infection with Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, Gram-Negative Bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med.* 4. Juni 2002;136(11):834–44.
36. Ruscher C. Erratum zu: Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 5. Mai 2015;58(6):654–654.
37. Lepelletier D, Andremont A, Grandbastien B, Group the NW. Risk of Highly Resistant Bacteria Importation from Repatriates and Travelers Hospitalized in Foreign Countries: About the French Recommendations to Limit Their Spread. *J Travel Med.* 1. September 2011;18(5):344–51.
38. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO). Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 27. September 2012;55(10):1311–54.
39. Salgado CD, Farr BM. What proportion of hospital patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are identified by clinical microbiological cultures? *Infect Control Hosp Epidemiol.* Februar 2006;27(2):116–21.
40. Vos MC, Behrendt MD, Melles DC, Mollema FPN, de Groot W, Parlevliet G, u. a. 5 years of experience implementing a methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus search and destroy policy at the largest university medical center in the Netherlands. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Oktober 2009;30(10):977–84.
41. Schulz-Stübner S, Mattner F, Meyer E, Mahlberg R, Springer-Verlag GmbH, Herausgeber. *Antibiotika bei Infektionen mit multiresistenten Erregern.* Berlin Heidelberg: Springer; 2016. 152 S.
 42. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* März 2008;52(3):813–21.
 43. Schwaber MJ, Carmeli Y. The effect of antimicrobial resistance on patient outcomes: importance of proper evaluation of appropriate therapy. *Crit Care.* 2009;13(1):106.
 44. European Centre for Disease Prevention and Control, Herausgeber. *The bacterial challenge, time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents.* Stockholm: ECDC; 2009. 42 S. (ECDC/ EMEA joint technical report).
 45. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.* 2014.
 46. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 [Internet]. WHO. 2014 [zitiert 21. November 2014]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
 47. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ.* 11. März 2013;346:f1493.
 48. Cornelissen CN, Fisher BD, Harvey RA. *Microbiology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Health, a Wolters Kluwer Company; 2013.
 49. Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol.* August 2013;303(6–7):350–9.
 50. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* Oktober 2014;27(4):870–926.
 51. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet.* 26. Juli 2013;382(9888):205.
 52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 23. April 2004;53(15):322–3.
 53. Shore AC, Lazaris A, Kinnevey PM, Brennan OM, Brennan GI, O'Connell B, u. a. First Report of cfr-Carrying Plasmids in the Pandemic Sequence Type 22 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type IV Clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 22. April 2016;60(5):3007–15.
 54. European Centre for Disease Prevention and Control, Herausgeber. *Annual epidemiological report 2014 - Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections [Internet].* Stockholm: ECDC; 2015. Verfügbar unter: http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/Pages/index.aspx

55. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2009. Stockholm: ECDC; 2010.
56. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* Oktober 2000;13(4):686–707.
57. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 21. Oktober 2012;55(11–12):1387–400.
58. Leclercq R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin Microbiol Infect.* März 2009;15(3):224–31.
59. Cho S-Y, Lee D-G, Choi S-M, Kwon J-C, Kim S-H, Choi J-K, u. a. Impact of vancomycin resistance on mortality in neutropenic patients with enterococcal bloodstream infection: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 29. Oktober 2013;13:504.
60. Prematunge C, MacDougall C, Johnstone J, Adomako K, Lam F, Robertson J, u. a. VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Januar 2016;37(1):26–35.
61. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, u. a. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* Mai 2007;13(5):615–21.
62. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V, Infectiology, Infectiology Freiburg. GERMAP 2012 – Report on the consumption of antimicrobials and the spread of antimicrobial resistance in human and veterinary medicine in Germany. [Internet]. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2014. Verfügbar unter: <http://www.p-e-g.org/econtext/germap>
63. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65(1):455–78.
64. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* August 2010;300(6):371–9.
65. Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, u. a. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: a snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* Mai 2012;50(5):1632–9.
66. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Antimicrob Resist Chemother.* 2011;2:203.
67. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P. Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units:

- secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care*. 2010;14(3):R113.
68. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. April 2009;63(4):659–67.
 69. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1. Juli 2011;53(1):60–7.
 70. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, u. a. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. September 2013;13(9):785–96.
 71. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 3. Januar 2006;57(3):373–83.
 72. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 7. Januar 2012;67(7):1597–606.
 73. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. September 2006;12(9):826–36.
 74. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Stockholm: ECDC; 2016 Apr.
 75. Robert Koch-Institut (RKI). Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bull*. 27. Juni 2016;(25).
 76. United Nations News Service Section. UN News - At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance [Internet]. UN News Service Section. 2016 [zitiert 20. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=55011#.WAIifySYn5z>
 77. World Health Organization. WHO - Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Internet]. 2015 [zitiert 29. Februar 2016]. Verfügbar unter: http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/
 78. Bundesministerium für Gesundheit. Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie DART 2020. 2015.
 79. Verband forschender Pharma-Unternehmen. Neue Antibiotika: Den Vorsprung gegenüber resistenten Bakterien wahren [Internet]. 2017 [zitiert 30. Januar 2017]. Verfügbar unter: <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/neue-antibiotika-den-vorsprung-wahren.html>
 80. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med*. November 2003;115(7):529–35.
 81. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, u. a. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. *Chest*. November 2009;136(5):1237–48.

82. Carlet J, Collignon P, Goldmann D, Goossens H, Gyssens IC, Harbarth S, u. a. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet*. 29. Juli 2011;378(9788):369–71.
83. Nemeth J, Ledergerber B, Preiswerk B, Nobile A, Karrer S, Ruef C, u. a. Multidrug-resistant bacteria in travellers hospitalized abroad: prevalence, characteristics, and influence on clinical outcome. *J Hosp Infect*. Dezember 2012;82(4):254–9.
84. Fournier S, Lepointeur M, Kassis-Chikhani N, Huang M, Brun-Buisson C, Jarlier V, u. a. Link Between Carbapenemase-Producing Enterobacteria Carriage and Cross-Border Exchanges: Eight-Year Surveillance in a Large French Multihospitals Institution. *J Travel Med*. 1. September 2012;19(5):320–3.
85. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, u. a. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the „menace“ arrives in the new world. *J Clin Microbiol*. Februar 2013;51(2):680–3.
86. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. Dezember 2011;17(12):E24–6.
87. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen J, Harbarth S, Kluytmans J, u. a. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eurosurveillance*. 24. Juli 2014;19(29):20860.
88. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control*. 1. Dezember 2007;35(10):S165–93.
89. Verhoef J, Beaujean D, Blok H, Baars A, Meyler A, van der Werken C, u. a. A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. Juli 1999;18(7):461–6.
90. European Centre for Disease Prevention and Control, Herausgeber. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015 [Internet]. Stockholm: ECDC; 2017. (Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Verfügbar unter: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1637
91. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, u. a. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev*. 1. Januar 2016;29(1):1–27.
92. Harbarth S, Hawkey PM, Tenover F, Stefani S, Pantosti A, Struelens MJ. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. Februar 2011;37(2):110–7.
93. Danial J, Noel M, Templeton KE, Cameron F, Mathewson F, Smith M, u. a. Real-time evaluation of an optimized real-time PCR assay versus Brilliance chromogenic MRSA agar for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *J Med Microbiol*. 3. Januar 2011;60(3):323–8.

94. Asir K, Wilkinson K, Perry J d., Reed R h., Gould F k. Evaluation of chromogenic media for the isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool samples. *Lett Appl Microbiol.* 1. Februar 2009;48(2):230–3.
95. Morgan DJ, Diekema DJ, Sepkowitz K, Perencevich EN. Adverse outcomes associated with contact precautions: A review of the literature. *Am J Infect Control.* März 2009;37(2):85–93.
96. Kirkland KB, Weinstein JM. Adverse effects of contact isolation. *The Lancet.* 2. Oktober 1999;354(9185):1177–8.
97. Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Karam Sarkis D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods.* Dezember 2014;107:106–18.
98. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnol Nat Publ Co.* September 1993;11(9):1026–30.
99. Persing DH, Tenover FC, Tang Y-W, Nolte FS, Hayden RT, Belkum AV, Herausgeber. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice.* 2. edition. Washington, DC: ASM Press; 2010. 960 S.
100. Wolk DM, Marx JL, Dominguez L, Driscoll D, Schifman RB. Comparison of MRSAselect Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for Detection of MRSA in Nares: Diagnostic Accuracy for Surveillance Samples with Various Bacterial Densities. *J Clin Microbiol.* 12. Januar 2009;47(12):3933–6.
101. Werner G, Serr A, Schütt S, Schneider C, Klare I, Witte W, u. a. Comparison of direct cultivation on a selective solid medium, polymerase chain reaction from an enrichment broth, and the BD GeneOhm™ VanR Assay for identification of vancomycin-resistant enterococci in screening specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* August 2011;70(4):512–21.
102. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, u. a. Rapid and Direct Real-Time Detection of blaKPC and blaNDM from Surveillance Samples. *J Clin Microbiol.* 11. Januar 2013;51(11):3609–15.
103. Nijhuis R, Samuelsen Ø, Savelkoul P, van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Dezember 2013;77(4):316–20.
104. Cortegiani A, Russotto V, Graziano G, Geraci D, Saporito L, Cocorullo G, u. a. Use of Cepheid Xpert Carba-R® for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria in Abdominal Septic Patients Admitted to Intensive Care Unit. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160643.
105. Antonelli A, Arena F, Giani T, Colavecchio OL, Valeva SV, Paule S, u. a. Performance of the BD MAX™ instrument with Check-Direct CPE real-time PCR for the detection of carbapenemase genes from rectal swabs, in a setting with endemic dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* September 2016;86(1):30–4.
106. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 1. November 2012;113(5):1014–26.

107. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Lofström C. Pre-PCR processing. *Mol Biotechnol*. Februar 2004;26(2):133–46.
108. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. November 2013;77(3):179–94.
109. Diekema DJ, Pfaller MA. Rapid Detection of Antibiotic-Resistant Organism Carriage for Infection Prevention. *Clin Infect Dis*. 6. Januar 2013;56(11):1614–20.
110. Polisená J, Chen S, Cimon K, McGill S, Forward K, Gardam M. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 12. Dezember 2011;11:336.
111. Cunningham R, Jenks P, Northwood J, Wallis M, Ferguson S, Hunt S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. *J Hosp Infect*. Januar 2007;65(1):24–8.
112. Carlesse F, Cappellano P, Quiles MG, Menezes LC, Petrilli AS, Pignatari AC. Clinical relevance of molecular identification of microorganisms and detection of antimicrobial resistance genes in bloodstream infections of paediatric cancer patients. *BMC Infect Dis*. 2016;16:462.
113. Doelfs G. Tödliche Keime. *Kma - Gesundheitswirtschaftsmagazin*. Februar 2015;20(02):6–7.
114. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, u. a. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 20. November 2008;13(47).
115. Hassing RJ, Alisma J, Arcilla MS, van Genderen PJ, Stricker BH, Verbon A. International travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 26. November 2015;20(47).
116. von Wintersdorff CJH, Penders J, Stobberingh EE, Lashof AMLO, Hoebe CJPA, Savelkoul PHM, u. a. High Rates of Antimicrobial Drug Resistance Gene Acquisition after International Travel, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. April 2014;20(4):649–57.
117. Weisenberg SA, Mediavilla JR, Chen L, Alexander EL, Rhee KY, Kreiswirth BN, u. a. Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in International Travelers and Non-Travelers in New York City. *PLoS ONE* [Internet]. 20. September 2012 [zitiert 12. Juli 2016];7(9). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3447858/>
118. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, u. a. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. Dezember 2009;53(12):5046–54.
119. Wendt C, Schütt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke B, u. a. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing K.

- pneumoniae in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1. Mai 2010;29(5):563–70.
120. Levast M, Poirel L, Carrër A, Deiber M, Decroisette E, Mallaval F-O, u. a. Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *J Antimicrob Chemother*. 1. April 2011;66(4):944–5.
121. United Nations High Commissioner for Refugees. UNHCR Mid-Year Trends 2015. UNHCR [Internet]. [zitiert 14. März 2016]; Verfügbar unter: <http://www.unhcr.org/statistics>
122. Al-Assil B, Mahfoud M, Hamzeh AR. Resistance trends and risk factors of extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* infections in Aleppo, Syria. *Am J Infect Control*. Juli 2013;41(7):597–600.
123. Al-Mayahie S, Al Kuriashy JJ. Distribution of ESBLs among *Escherichia coli* isolates from outpatients with recurrent UTIs and their antimicrobial resistance. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(6):575–83.
124. Ganjo AR, Maghdid DM, Mansoor IY, Kok DJ, Severin JA, Verbrugh HA, u. a. OXA-Carbapenemases Present in Clinical *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Isolates from Patients in Kurdistan, Region, Iraq. *Microb Drug Resist* Larchmt N. 22. März 2016;
125. Hamzeh AR, Al Najjar M, Mahfoud M. Prevalence of antibiotic resistance among *Acinetobacter baumannii* isolates from Aleppo, Syria. *Am J Infect Control*. Oktober 2012;40(8):776–7.
126. Mahfoud M, Al Najjar M, Hamzeh AR. Multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from nosocomial respiratory and urinary infections in Aleppo, Syria. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 19. Februar 2015 [zitiert 4. Mai 2016];9(02). Verfügbar unter: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/5643>
127. Tariq TM. Occurrence of extended-spectrum β -lactamase producers among enterobacteriaceae in a paediatric tertiary care facility in Kabul. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP*. Juli 2014;24(7):530–1.
128. Teicher CL, Ronat J-B, Fakhri RM, Basel M, Labar AS, Herard P, u. a. Antimicrobial Drug-Resistant Bacteria Isolated from Syrian War-Injured Patients, August 2011–March 2013. *Emerg Infect Dis*. November 2014;20(11):1949–51.
129. Reinheimer C, Kempf VAJ, Göttig S, Hogardt M, Wichelhaus TA, O'Rourke F, u. a. Multidrug-resistant organisms detected in refugee patients admitted to a University Hospital, Germany June–December 2015. *Euro Surveill*. 14. Januar 2016;21(2).
130. Heudorf U, Krackhardt B, Karathana M, Kleinkauf N, Zinn C. Multidrug-resistant bacteria in unaccompanied refugee minors arriving in Frankfurt am Main, Germany, October to November 2015. *Euro Surveill*. 14. Januar 2016;21(2).
131. Tenenbaum T, Becker K-P, Lange B, Martin A, Schäfer P, Weichert S, u. a. Prevalence of Multidrug-Resistant Organisms in Hospitalized Pediatric Refugees in an University Children's Hospital in Germany 2015–2016. *Infect Control Hosp Epidemiol*. August 2016;FirstView:1–5.

132. Robert Koch-Institut (RKI). Stellungnahme des Robert Koch-Instituts zur Frage des Screenings von Asylsuchenden auf Multiresistente Erreger (MRE) [Statement of the Robert Koch Institute regarding screening of asylum seekers for multidrug resistant bacteria.]. 28. Januar 2016 [zitiert 3. März 2016]; Verfügbar unter:
http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesundAZ/Content/A/Asylsuchende/Inhalt/MRE-Screening_Asylsuchende.pdf?__blob=publicationFile
133. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PHM, Wolffs P. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Antimicrob Resist Chemother.* 2013;4:87.
134. Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* 28. August 2009;325(5944):1128–31.
135. Trobos M, Lester CH, Olsen JE, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J Antimicrob Chemother.* Januar 2009;63(1):80–6.
136. Karami N, Martner A, Enne VI, Swerkersson S, Adlerberth I, Wold AE. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 11. Januar 2007;60(5):1142–5.
137. Goren MG, Carmeli Y, Schwaber MJ, Chmelnitsky I, Schechner V, Navon-Venezia S. Transfer of Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. *Emerg Infect Dis.* Juni 2010;16(6):1014–7.
138. Wielders C, Vriens M, Brisse S, de Graaf-Miltenburg L, Troelstra A, Fleer A, u. a. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* 26. Mai 2001;357(9269):1674–5.
139. NCBI Genome Database [Internet]. [zitiert 11. August 2015]. Verfügbar unter:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>
140. Reischl U, Linde H-J, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* Juni 2000;38(6):2429–33.
141. Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BRK, Schmidt TM. *rrnDB*: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 28. Januar 2015;43(Database issue):D593–8.
142. Home - Nucleotide - NCBI [Internet]. [zitiert 10. November 2016]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
143. Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific. Primer Express Software 3.0 - Getting started guide. P/N 4362460 Rev. C [Internet]. 2015. Verfügbar unter: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041902.pdf

144. Kwok P-Y. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. 1. Aufl. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002. 269 S.
145. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [zitiert 10. November 2016]. Verfügbar unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
146. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 18. Juni 2012;13:134.
147. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a Triplex PCR Assay To Discriminate *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci and Determine Methicillin Resistance from Blood Cultures. J Clin Microbiol. April 2002;40(4):1514–7.
148. Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Cultures by Real-Time Fluorescence PCR. J Clin Microbiol. Dezember 2001;39(12):4529–31.
149. Jukes L, Mikhail J, Bome-Mannathoko N, Hadfield SJ, Harris LG, El-Bouri K, u. a. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci and methicillin susceptibility testing directly from growth-positive blood cultures by multiplex real-time PCR. J Med Microbiol. 1. Dezember 2010;59(12):1456–61.
150. Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, u. a. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. J Clin Microbiol. 1. Januar 2003;41(1):254–60.
151. Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strässle A, Kayser FH. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. Mol Gen Genet MGG. Oktober 1989;219(1–2):263–9.
152. Robert Koch-Institut (RKI). Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger. Epidemiologisches Bull. 27. Oktober 2014;(43).
153. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J-D, u. a. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. Antimicrob Agents Chemother. 4. Januar 2000;44(4):891–7.
154. Bush K, Jacoby G. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. [Internet]. 2015. Verfügbar unter: <http://www.lahey.org/Studies/>
155. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 10. Januar 2007;51(10):3471–84.
156. Robert Koch-Institut (RKI). *Acinetobacter baumannii* – ein Krankenhauskeim mit beunruhigendem Entwicklungspotenzial. Epidemiologisches Bull. 12. August 2013;(32).

157. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 4. Januar 2014;27(2):241–63.
158. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* Dezember 2011;19(12):588–95.
159. Finney D. *Probit Analysis*. Reissue. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. 272 S.
160. Finney DJ, Stevens WL. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika.* Mai 1948;35(Pts 1-2):191–201.
161. CLSI. *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline EP12-A*. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.
162. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouveleki LS. Escherichia coli with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- β -Lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* Januar 2003;47(1):395–7.
163. Yan J-J, Hsueh P-R, Ko W-C, Luh K-T, Tsai S-H, Wu H-M, u. a. Metallo- β -Lactamases in Clinical Pseudomonas Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* August 2001;45(8):2224–8.
164. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated Acinetobacter baumannii clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 1. Dezember 2007;13(12):1192–8.
165. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* Dezember 2003;55(3):541–55.
166. Aden K, Rehman A, Falk-Paulsen M, Secher T, Kuiper J, Tran F, u. a. Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation. *Cell Rep.* 10. August 2016;
167. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, u. a. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 1. Dezember 2009;75(23):7537–41.
168. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, u. a. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* Juli 2006;72(7):5069–72.
169. Hoorfar J, Wolffs P, Rådström P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *APMIS.* 1. Dezember 2004;112(11–12):808–14.
170. Warnke P, Johanna Pohl FP, Kundt G, Podbielski A. Screening for Gram-negative bacteria: Impact of preanalytical parameters. *Sci Rep [Internet].* 27. Juli 2016 [zitiert 28. Oktober 2016];6. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961960/>
171. Warnke P, Frickmann H, Ottl P, Podbielski A. Nasal Screening for MRSA: Different Swabs – Different Results! *PLoS ONE.* 29. Oktober 2014;9(10):e111627.

172. Stier CJN, Paganini MC, de Souza HHM, Costa LMD, dos Santos GS, Cruz EDA. Active surveillance cultures: comparison of inguinal and rectal sites for detection of multidrug-resistant bacteria. *J Hosp Infect.* Februar 2016;92(2):178–82.
173. Mermel LA, Cartony JM, Covington P, Maxey G, Morse D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization at Different Body Sites: a Prospective, Quantitative Analysis ∇ . *J Clin Microbiol.* März 2011;49(3):1119–21.
174. Weintrob AC, Roediger MP, Barber M, Summers A, Fieberg AM, Dunn J, u. a. Natural history of colonization with gram-negative multidrug-resistant organisms among hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* April 2010;31(4):330–7.
175. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, u. a. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 5. Januar 2007;45(5):1551–5.
176. Moore E, Arnscheidt A, Krüger A, Strömpl C, Mau M. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In: Kowalchuk GA, Bruijn FJ de, Head IM, Akkermans AD, Elsas JD van, Herausgeber. *Molecular Microbial Ecology Manual* [Internet]. Springer Netherlands; 2008 [zitiert 31. Oktober 2016]. S. 1905–19. Verfügbar unter: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4020-2177-0_101
177. Hindiyeh M, Smollan G, Grossman Z, Ram D, Robinov J, Belausov N, u. a. Rapid Detection of blaKPC Carbapenemase Genes by Internally Controlled Real-Time PCR Assay Using Bactec Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 7. Januar 2011;49(7):2480–4.
178. Guillard T, Duval V, Moret H, Brasme L, Vernet-Garnier V, de Champs C. Rapid Detection of aac(6')-Ib-cr Quinolone Resistance Gene by Pyrosequencing. *J Clin Microbiol.* Januar 2010;48(1):286–9.
179. Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, Li J, Petrosino JF, Schloss PD, u. a. Impact of Enhanced *Staphylococcus* DNA Extraction on Microbial Community Measures in Cystic Fibrosis Sputum. *PLoS ONE* [Internet]. 8. März 2012 [zitiert 1. November 2016];7(3). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297625/>
180. Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, u. a. Real-Time Quantitative Broad-Range PCR Assay for Detection of the 16S rRNA Gene Followed by Sequencing for Species Identification. *J Clin Microbiol.* 1. August 2006;44(8):2750–9.
181. Lecouvet F, Irengue L, Vandercam B, Nzeusseu A, Hamels S, Gala J-L. The etiologic diagnosis of infectious discitis is improved by amplification-based DNA analysis. *Arthritis Rheum.* September 2004;50(9):2985–94.
182. Diaz MH, Waller JL, Napoliello RA, Islam MS, Wolff BJ, Burken DJ, u. a. Optimization of Multiple Pathogen Detection Using the TaqMan Array Card: Application for a Population-Based Study of Neonatal Infection. *PloS One.* 2013;8(6):e66183.

183. Reischl U, Pulz M, Ehret W, Wolf H. PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *BioTechniques*. November 1994;17(5):844–5.
184. Hagen RM, Seegmüller I, Navai J, Kappstein I, Lehn N, Miethke T. Development of a real-time PCR assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *Int J Med Microbiol IJMM*. Juni 2005;295(2):77–86.
185. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. Juni 2002;40(6):2153–62.
186. Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J. Clinically Applicable Multiplex PCR for Four Middle Ear Pathogens. *J Clin Microbiol*. Januar 2000;38(1):125–32.
187. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, u. a. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. Oktober 1994;113(2):259–66.
188. Willner D, Daly J, Whiley D, Grimwood K, Wainwright CE, Hugenholtz P. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. *PLoS ONE* [Internet]. 13. April 2012 [zitiert 3. November 2016];7(4). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3326054/>
189. Gibb AP, Wong S. Inhibition of PCR by Agar from Bacteriological Transport Media. *J Clin Microbiol*. Januar 1998;36(1):275–6.
190. Hindler JA, Gonzalez AH, Drake TA. Stability of viable-bacterium counts in liquid media used for preparation of inocula and subsequent impact on antimicrobial susceptibility test results. *J Clin Microbiol*. Juni 1990;28(6):1271–5.
191. Diekema DJ, Dodgson KJ, Sigurdardottir B, Pfaller MA. Rapid Detection of Antimicrobial-Resistant Organism Carriage: an Unmet Clinical Need. *J Clin Microbiol*. Juli 2004;42(7):2879–83.
192. Weiss J, Arielly H, Ganor N, Paitan Y. Evaluation of the NanoCHIP® Infection Control Panel test for direct detection and screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). *Infection*. 1. Juni 2015;43(3):331–8.
193. Rachwal PA, Rose HL, Cox V, Lukaszewski RA, Murch AL, Weller SA. The Potential of TaqMan Array Cards for Detection of Multiple Biological Agents by Real-Time PCR. *PLoS ONE* [Internet]. 23. April 2012 [zitiert 8. Dezember 2014];7(4). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334355/>
194. Kodani M, Yang G, Conklin LM, Travis TC, Whitney CG, Anderson LJ, u. a. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *J Clin Microbiol*. Juni 2011;49(6):2175–82.
195. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, u. a. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol*. Februar 2013;51(2):472–80.

196. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* Oktober 1991;29(10):2240–4.
197. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. *J Clin Microbiol.* Mai 2002;40(5):1821–3.
198. Daeschlein G, Assadian O, Daxboeck F, Kramer A. Multiplex PCR-ELISA for direct detection of MRSA in nasal swabs advantageous for rapid identification of non-MRSA carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. Mai 2006;25(5):328–30.
199. Paule SM, Pasquariello AC, Thomson RB, Kaul KL, Peterson LR. Real-Time PCR Can Rapidly Detect Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly From Positive Blood Culture Bottles. *Am J Clin Pathol.* 1. September 2005;124(3):404–7.
200. Vannuffel P, Heusterspreute M, Bouyer M, Vandercam B, Philippe M, Gala J-L. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Res Microbiol.* März 1999;150(2):129–41.
201. Francois P, Bento M, Renzi G, Harbarth S, Pittet D, Schrenzel J. Evaluation of Three Molecular Assays for Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 6. Januar 2007;45(6):2011–3.
202. Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, u. a. Does Nasal Cocolonization by Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains Occur Frequently Enough To Represent a Risk of False-Positive Methicillin-Resistant *S. aureus* Determinations by Molecular Methods? *J Clin Microbiol.* Januar 2006;44(1):229–31.
203. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Res Microbiol.* Dezember 2011;162(10):1060–6.
204. Kilic A, Muldrew KL, Tang Y-W, Basustaoglu AC. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis.* April 2010;66(4):349–55.
205. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, u. a. New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci. *J Clin Microbiol.* Mai 2004;42(5):1875–84.
206. Desjardins M, Guibord C, Lalonde B, Toye B, Ramotar K. Evaluation of the IDI-MRSA Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Nasal and Rectal Specimens Pooled in a Selective Broth. *J Clin Microbiol.* April 2006;44(4):1219–23.
207. Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, Morgan PM, O'Connell B. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the

- GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens. *J Clin Microbiol.* Oktober 2008;46(10):3285–90.
208. Gröbner S, Dion M, Plante M, Kempf VAJ. Evaluation of the BD GeneOhm StaphSR Assay for Detection of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Spiked Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* Juni 2009;47(6):1689–94.
209. Ballard SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PDR, Grayson ML. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother.* Mai 2005;49(5):1688–94.
210. Graham M, Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PDR, Grayson ML. High Rates of Fecal Carriage of Nonenterococcal vanB in both Children and Adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 3. Januar 2008;52(3):1195–7.
211. Marner ES, Wolk DM, Carr J, Hewitt C, Dominguez LL, Kovacs T, u. a. Diagnostic accuracy of the Cepheid GeneXpert vanA/vanB assay ver. 1.0 to detect the vanA and vanB vancomycin resistance genes in *Enterococcus* from perianal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* April 2011;69(4):382–9.
212. Palladino S, Kay ID, Costa AM, Lambert EJ, Flexman JP. Real-time PCR for the rapid detection of vanA and vanB genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Januar 2003;45(1):81–4.
213. Pfeifer Y. ESBL, AmpC und Carbapenemase: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik β -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger / ESBL, AmpC and carbapenemases: emergence, dissemination and diagnostics of β -lactamase-producing Gram-negative pathogens. *LaboratoriumsMedizin.* 1. Januar 2010;34(4):205–15.
214. Pfeifer Y, Eller C. Aktuelle Daten und Trends zur β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 1. November 2012;55(11–12):1405–9.
215. Akinci E, Vahaboglu H. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther.* November 2010;8(11):1251–8.
216. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* Januar 2009;22(1):161–82.
217. Weigel LM, Steward CD, Tenover FC. gyrA Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Eight Species of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* Oktober 1998;42(10):2661–7.
218. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C-J, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 8. Januar 2007;60(2):394–7.
219. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin Infect Dis.* 15. Februar 2002;34(4):482–92.
220. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* April 2009;15, Supplement 3:7–11.

221. Cottell JL, Webber MA, Piddock LJV. Persistence of Transferable Extended-Spectrum- β -Lactamase Resistance in the Absence of Antibiotic Pressure. *Antimicrob Agents Chemother.* September 2012;56(9):4703–6.
222. Knopp M, Andersson DI. Amelioration of the Fitness Costs of Antibiotic Resistance Due To Reduced Outer Membrane Permeability by Upregulation of Alternative Porins. *Mol Biol Evol.* 12. Januar 2015;32(12):3252–63.
223. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes Using Real-Time PCR and Pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 1. Januar 2007;51(1):223–30.
224. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* Juli 2010;23(3):550–76.
225. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal.* 2009;23(3):145–51.
226. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, u. a. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* April 2009;55(4):611–22.
227. Smith MA, Bidochka MJ. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can J Microbiol.* April 1998;44(4):351–5.
228. Mak A, Miller MA, Chong G, Monczak Y. Comparison of PCR and Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enterococci: Highly Disparate Results for vanA and vanB. *J Clin Microbiol.* Dezember 2009;47(12):4136–7.
229. 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.
230. Howden BP, Holt KE, Lam MMC, Seemann T, Ballard S, Coombs GW, u. a. Genomic Insights to Control the Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. *mBio.* 30. August 2013;4(4):e00412-13.
231. Wendt C, Krause C, Xander LU, Löffler D, Floss H. Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. *J Hosp Infect.* Juli 1999;42(3):193–200.
232. Arlet G, Brami G, Décrè D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, u. a. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett.* 15. Dezember 1995;134(2–3):203–8.
233. Randegger CC, Hächler H. Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* Juni 2001;45(6):1730–6.
234. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schröppel K, Wichelhaus TA, u. a. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol.* Februar 2010;48(2):460–71.
235. Jeyaratnam D, Gottlieb A, Ajoku U, French GL. Validation of the IDI-MRSA™ system for use on pooled nose, axilla, and groin swabs and single swabs from other screening sites. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Mai 2008;61(1):1–5.

236. Drews SJ, Willey BM, Kreiswirth N, Wang M, Ianes T, Mitchell J, u. a. Verification of the IDI-MRSA Assay for Detecting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Diverse Specimen Types in a Core Clinical Laboratory Setting. *J Clin Microbiol.* Oktober 2006;44(10):3794–6.
237. German Federal Ministry of Health. Combating Antimicrobial Resistance - Examples of Best-Practices of the G7 Countries. Elmau, Germany: G7-summit; 2015 Sep.
238. Vasoo S, Lolans K, Li H, Prabaker K, Hayden MK. Comparison of the CHROMagar™ KPC, Remel Spectra™ CRE, and a direct ertapenem disk method for the detection of KPC-producing Enterobacteriaceae from perirectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* April 2014;78(4):356–9.
239. Hardy K, Price C, Szczepura A, Gossain S, Davies R, Stallard N, u. a. Reduction in the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in surgical wards by rapid screening for colonization: a prospective, cross-over study. *Clin Microbiol Infect.* April 2010;16(4):333–9.
240. Schulz M, Nonnenmacher C, Mutters R. Cost-effectiveness of rapid MRSA screening in surgical patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. November 2009;28(11):1291.
241. Wassenberg MWM, Kluytmans JAJW, Box ATA, Bosboom RW, Buiting AGM, van Elzakker EPM, u. a. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. *Clin Microbiol Infect.* Dezember 2010;16(12):1754–61.
242. Uçkay I, Sax H, Iten A, Camus V, Renzi G, Schrenzel J, u. a. Effect of screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage by polymerase chain reaction on the duration of unnecessary preemptive contact isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* November 2008;29(11):1077–9.
243. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, u. a. Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods.* November 2010;83(2):185–7.
244. Bundesamt für Migration und Flüchtlinge. Aktuelle Zahlen zu Asyl (09/2016) [Internet]. 2016 [zitiert 27. Dezember 2016]. Verfügbar unter: <http://www.bamf.de/SharedDocs/Anlagen/DE/Downloads/Infothek/Statistik/Asyl/aktuelle-zahlen-zu-asyl-september-2016.html?nn=1364454>
245. Hammerum AM, Larsen AR, Hansen F, Justesen US, Friis-Møller A, Lemming LE, u. a. Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* August 2012;40(2):191–2.
246. Seville LA, Patterson AJ, Scott KP, Mullany P, Quail MA, Parkhill J, u. a. Distribution of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes Among Human Oral and Fecal Metagenomic DNA. *Microb Drug Resist.* 1. September 2009;15(3):159–66.
247. Stinear TP, Olden DC, Johnson PD, Davies JK, Grayson ML. Enterococcal vanB resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *The Lancet.* 17. März 2001;357(9259):855–6.

248. Safrany N, Monnet DL. Antibiotics obtained without a prescription in Europe. *Lancet Infect Dis*. März 2012;12(3):182–3.
249. Dameh M, Green J, Norris P. Over-the-counter sales of antibiotics from community pharmacies in Abu Dhabi. *Pharm World Sci PWS*. Oktober 2010;32(5):643–50.
250. Bin Abdulhak AA, Al Tannir MA, Almansor MA, Almohaya MS, Onazi AS, Marei MA, u. a. Non prescribed sale of antibiotics in Riyadh, Saudi Arabia: A Cross Sectional Study. *BMC Public Health*. 2011;11:538.
251. Al-Bakri AG, Bustanji Y, Yousef A-M. Community consumption of antibacterial drugs within the Jordanian population: sources, patterns and appropriateness. *Int J Antimicrob Agents*. November 2005;26(5):389–95.
252. Bryce A, Costelloe C, Hawcroft C, Wootton M, Hay AD. Faecal carriage of antibiotic resistant *Escherichia coli* in asymptomatic children and associations with primary care antibiotic prescribing: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis [Internet]*. 25. Juli 2016 [zitiert 9. August 2016];16. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960702/>
253. Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx. *mBio [Internet]*. 22. Juni 2010 [zitiert 2. Januar 2017];1(3). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2925076/>
254. Hussein NR, Basharat Z, Muhammed AH, Al-Dabbagh SA. Comparative Evaluation of MRSA Nasal Colonization Epidemiology in the Urban and Rural Secondary School Community of Kurdistan, Iraq. *PLoS ONE [Internet]*. 1. Mai 2015 [zitiert 17. März 2016];10(5). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4416827/>
255. Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA. Molecular analysis and susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in emergency department patients and related risk factors in Iran. *J Hosp Infect*. März 2015;89(3):186–91.
256. Japoni-Nejad A, Rezazadeh M, Kazemian H, Fardmousavi N, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Molecular characterization of the first community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Central Iran. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. November 2013;17(11):e949-954.
257. Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula A-M, Lyytikäinen O, Jägerroos H, u. a. Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococci* and Their SCCmec Types in a Long-Term-Care Facility. *J Clin Microbiol*. Januar 2009;47(1):32–7.
258. Köck R, Werner P, Friedrich AW, Fegeler C, Becker K. Persistence of nasal colonization with human pathogenic bacteria and associated antimicrobial resistance in the German general population. *New Microbes New Infect*. 1. Dezember 2015;9:24–34.
259. Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, u. a. Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage in a Random Sample of Non-Hospitalized Adult Population in Northern Germany. *PLoS ONE [Internet]*. 24. September 2014 [zitiert 17. März 2016];9(9). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176714/>

260. Belmar Campos C, Fenner I, Wiese N, Lensing C, Christner M, Rohde H, u. a. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. *Int J Med Microbiol IJMM*. Juli 2014;304(5–6):678–84.
261. Valenza G, Nickel S, Pfeifer Y, Eller C, Krupa E, Lehner-Reindl V, u. a. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* as Intestinal Colonizers in the German Community. *Antimicrob Agents Chemother*. Februar 2014;58(2):1228–30.
262. Mahida N, Boswell T. Improving the detection rate of vancomycin-resistant enterococci colonisation using groin swabs. *J Clin Pathol*. 6. Januar 2014;67(6):544–5.
263. Card RM, Mafura M, Hunt T, Kirchner M, Weile J, Rashid M-U, u. a. Impact of Ciprofloxacin and Clindamycin Administration on Gram-Negative Bacteria Isolated from Healthy Volunteers and Characterization of the Resistance Genes They Harbor. *Antimicrob Agents Chemother*. 18. Mai 2015;59(8):4410–6.
264. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, u. a. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol*. 2014;15:R89.
265. C nit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. Oktober 2014;1842(10):1981–92.
266. Waller JL, Diaz MH, Petrone BL, Benitez AJ, Wolff BJ, Edison L, u. a. Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. *J Clin Microbiol*. März 2014;52(3):849–53.
267. European Centre for Disease Prevention and Control. Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. Stockholm: ECDC; 2016.

8 Anhang

Tabelle 8-1 Übersicht über die verwendeten TaqMan® Real-Time Assays

Ziel-Gen	Resistenz	Assay ID	Kontext Sequenz	Position	Quelle
16S	IC	Pa04230899_s1	CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGT	B24	TF
TEM	ESBL	Pa04646128_s1	GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA	A13	TF
SHV	ESBL	Pa04646134_s1	CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTA	A18	TF
CTX-M group 1	ESBL	Pa04646149_s1	AATGGGACGATGTCACTGGCTGAGC	B08	TF
CTX-M group 2	ESBL	Pa04646142_s1	GACGCTACCCCTGCTATTTAGCAGC	B02	TF
CTX-M group 8	ESBL	Pa04646154_s1	CCCGCGGATACCACCACGCCATTA	B13	TF
CTX-M group 9	ESBL	Pa04646127_s1	GCTTAATCAGCCTGTCGAGATCAAG	A12	TF
PER-1	ESBL	Pa04646140_s1	AACAGTGGGGATTGCGCTGAGGTTT	A24	TF
PER-2	ESBL	Pa04646157_s1	GGTTGAAACCACCACAGGACCACAG	B16	TF
GES	ESBL	Pa04646151_s1	ACGTGACGAATTAGTTGCCTCTGTC	B10	TF
VEB	ESBL	Pa04646153_s1	ACCGATTAAGGACAATTACCAA	B12	TF
OXA-1	ESBL	Pa04646133_s1	TCATACACCAAAGACGTGGATGCAA	A17	TF
ampC	AmpC	Pa04646117_s1	GCCGAAAGCGGAAGAGGCGCATTAC	A02	TF
ACC	AmpC	Pa04646144_s1	CTGTTATCCGTGATTACCTGTCTGG	B04	TF
ACT/MIR	AmpC	Pa04646124_s1	ACCGTTACGCCGTGATGAAAGCGC	A09	TF
BIL/LAT/CMY	AmpC	Pa04646135_s1	TAAGACGTTTAACGGCGTGTGGGC	A19	TF
DHA	AmpC	Pa04646120_s1	CGCTGATAATGTGCGGGCGGTGGTG	A05	TF
FOX	AmpC	Pa04646126_s1	CTGGGCCAGCCATTTGAGCAACTGA	A10	TF
MOX/CMY	AmpC	Pa04646156_s1	CATCCAGCCGTGCTCAAGGAGCAC	B15	TF
KPC	CR	Pa04646152_s1	CCTCGTCGCGGAACCATTGCTAAA	B11	TF
OXA-48	CR	Pa04646138_s1	TACCCGCATCTACCTTTAAAATTCC	A22	CK
OXA-23	CR	Pa04646139_s1	TCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAA	A23	TF
OXA-40	CR	Pa04646143_s1	GGATGGGTTGTTTCAGCCTCAAGGGA	B03	TF
OXA-58	CR	Pa04646136_s1	TGGGATGGAAGCCACGTTTTTTTA	A20	TF
OXA-72	CR	Pa04646118_s1	CCGATGACCTTGACATAACCGATT	A03	TF
VIM	CR	Pa04646155_s1	GATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTG	B14	TF
IMP-1 group	CR	Pa04646131_s1	ACTCCATTTACGGCTAAAGATACTG	A16	TF
IMP-2 group	CR	Pa04646119_s1	TCACATTTCCATAGCGACAGCACGG	A04	TF
IMP-7	CR	Pa04646158_s1	TTAATATCCAAATATGGTAAGGCAA	B17	TF
IMP-16	CR	Pa04646116_s1	AGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAAC	A01	TF
NDM	CR	Pa04646121_s1	GATTGCCGAGCGACTTGGCCTTGCT	A06	CK
qnrA	ChR	Pa04646160_s1	AAGCGGCGCCGTTGAAGGGTGCCA	B19	TF
qnrB	ChR	Pa04646145_s1	N/A	B05	TF
mecA	MR	Pa04230908_s1	N/A	B21	TF
mefA	MLS	Pa04230904_s1	AAAACAGGATCTGCGATGGTCTTGT	B22	TF
ermA	MLS	Pa04646137_s1	ATTCTAAAATTTTCTTCCCAAAC	A21	TF

Ziel-Gen	Resistenz	Assay ID	Kontext Sequenz	Position	Quelle
ermB	MLS	Pa04230913_s1	AACTTACCCGCCATACCACAGATG	B23	TF
vanA1	VR	Pa04646159_s1	GACTACGCAATTGAATCGGCAAGAC	B18	TF
vanA2	VR	Pa04646147_s1	AGCTACTCCCGCCTTTTGGGTATT	B06	TF
vanB	VR	Pa04646150_s1	AACTTAACGCTGCGATAGAAGCGGC	B09	TF
vanC1	VR	Pa04646130_s1	CAATTGACGATTGGTGCTTGTGATG	A15	TF
vanC2-C3-1	VR	Pa04646129_s1	TCACAAAAGTAACTTGTGTTGAAGA	A14	TF
vanC2-C3-2	VR	Pa04646122_s1	TTGAGATCGGTTGCGGTATTTTGGG	A07	TF
ACICU_00593	AB	Pa04646148_s1	N/A	B07	DH
femA SA	SA	Pa04646123_s1	GCAGTGCAATGGGAAATGATTAATT	A08	CK
femA SE	SE	Pa04646141_s1	TTCAAATCGTTATCGCCATTTTGA	B01	CK
GAPDH	IC	Hs99999905_m1	N/A	A11	TF
exoIPC	exo IC	Ac04646146_a1	TCTCGTTGATCTTCCGTTGATAGTG	B20	TF

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Christian Kautz
Geburtsdatum	3. Januar 1985
Geburtsort	Pritzwalk
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Aug. 1991 bis Juli 1994	Gesamtschule Pritzwalk
Aug. 1994 bis Juli 1997	Herbert-Quandt-Schule Pritzwalk
Aug. 1997 bis Juni 2004	Johann-Wolfgang-von-Goethe Gymnasium Pritzwalk
Juni 2004	Allgemeine Hochschulreife
Aug. 2004 bis Juli 2007	Ausbildung zum Chemielaboranten im Landeslabor Schleswig-Holstein, Lübeck (Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt)
Okt. 2007 bis Nov. 2011	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Sept. 2009	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dez. 2011	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dez. 2011 bis Mai 2012	Pharmaziepraktikum, Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Juni 2012 bis Dez. 2012	Pharmaziepraktikum, Belvedere Apotheke, Kiel
Januar 2013	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erhalt der Approbation als Apotheker

Beruflicher Werdegang, Promotion und Weiterbildung

Juli 2007 bis Aug. 2007	Chemielaborant im Landeslabor Schleswig-Holstein, Lübeck (Lebensmittel-, Veterinär- und Umweltuntersuchungsamt)
Feb. 2013 bis Okt. 2016	Apotheker in der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
seit März 2013	Promotionsvorhaben und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Kunze am Pharmazeutischen Institut sowie am Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
seit Juni 2013	Weiterbildung zum Fachapotheker für Klinische Pharmazie
seit Nov. 2016	Apotheker in der Krankenhausapotheke des Städtischen Krankenhauses Kiel

10 Erklärung nach § 8 Absatz 1 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 8 Absatz 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig und ohne fremde Hilfe nach Inhalt und Form verfasst habe. Ich habe keine anderen, als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im April 2017

Christian Kautz

11 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Thomas Kunze und Dr. Robert Häsler für die intensive Betreuung, für die steten Diskussionen und Anregungen, für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit und der Publikation sowie für den wertvollen Erfahrungsaustausch unter Familienvätern.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Stefan Schreiber, Prof. Dr. Stefan J. Ott und Dr. Swantje Eisend für das Vertrauen beim Überlassen des sehr interessanten Themas und für die Möglichkeit am Kieler Universitätsklinikum Schleswig-Holstein forschen und arbeiten zu dürfen. Herrn Prof. Dr. Philip Rosenstiel möchte ich ebenfalls für die Unterstützung danken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Rainer Podschun, Dr. Sabine Schubert und Prof. Dr. Helmut Fickenscher für die Bereitstellung des mikrobiologischen Labors, für die Durchführung der mikrobiologischen Untersuchung klinischer Proben sowie für die durchaus kritischen, aber hilfreichen Anregungen. Ebenso möchte ich mich bei Andrea Hölzgen und Corinna Wriedt für die lehrreiche und tatkräftige Unterstützung im mikrobiologischen Labor herzlich bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Molekularbiologie für die inspirierende wissenschaftliche Zusammenarbeit. Besonders hervorzuheben sind Dr. Ateequr Rehman und Dr. Femke-Anouska Heinsen, die die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung durchgeführt und ausgewertet haben. Weiterhin bin ich Karina Greve und Dorina Oelsner für Rat und Tat in allen Belangen des Laborlebens dankbar, besonders aber für die Aufarbeitung von 506 Stuhlproben.

Mein weiterer Dank gilt der Firma Thermo Fisher Scientific, die als Industriepartner diese Arbeit mit der Bereitstellung von Materialien, Reagenzien und technischem Gerät unterstützt hat. Besonders danke ich Pius Brzoska, Jon Sherlock und Astrid Ferlinz für den hilfreichen und motivierenden wissenschaftlichen Austausch.

Ich danke Prof. Dr. Jan-Thorsten Gräsner und Prof. Dr. Jens Scholz für die Mitwirkung an dem Forschungsvorhaben zum Vorkommen von multiresistenten Erregern in der Kohorte Flüchtlinge. Im Speziellen danke ich Dr. Volker Gassling für die Organisation und die uneingeschränkte Unterstützung vor Ort in der Erstaufnahmeeinrichtung für Flüchtlinge. Gesine Hoppenstedt danke ich für die unerlässliche Hilfe im Rahmen dieses Projektes.

Prof. Dr. Wolfgang Lieb und Prof. Dr. Matthias Laudes danke ich für die Bereitstellung von Stuhlproben einer geeigneten Kontrollgruppe.

Besonderer Dank gilt dem Team der Krankenhausapotheke des UKSH Kiel, das mich zu jederzeit motiviert, unterstützt und wenn nötig abgelenkt hat. Mein spezieller Dank gilt Lena Knudsen und Birgit Jandok für das Korrekturlesen, die konstruktive Kritik und für die aufmunternden Worte.

Till, Josch und Linda sowie Richard, Stefan und Alex danke ich für ihre Freundschaft und die befreienden Abende in Pubs, in Konzerten, an der Förde und unter freiem Himmel.

Meinen Eltern Kerstin und Axel Kautz danke ich für den immerwährenden Rückhalt, das Vertrauen und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung von ganzem Herzen.

Mein allergrößter Dank gilt meiner kleinen Familie. Juliane, ohne deine Liebe, Zuversicht und Geduld in allen Lebenslagen wäre ich nie so weit gekommen. Leonard und Lilia, danke, dass ihr euren Papa auch in Gedanken nach Hause geholt habt.