

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

**Entwicklung einer Real-Time PCR zur
Detektion Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexandra Werner-Busse

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. MacKenzie
Korreferent: PD Dr. Kobbe

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Enterokokken	3
1.1.2 Pathogenität und Therapie	3
1.2 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)	4
1.2.1 Resistenzmechanismen	4
1.2.2 VRE-Subtypen	6
1.2.3 Non-enterokokkale <i>van</i> -Gene	6
1.2.4 Klinische Bedeutung und Diagnostik	7
1.2.5 Optimierung der Diagnostik durch PCR	7
2. Materialien und Methoden	10
2.1 Materialien	10
2.1.1 Chemikalien, Medien und Puffer	10
2.1.1.1 Chemikalien	10
2.1.1.2 Medien	11
2.1.1.3 Puffer	11
2.1.2 Primer und Sonden	12
2.1.3 Master Mix	13
2.1.4 Enzyme	14
2.1.5 Bakterienstämme für Klonierung	14
2.1.6 Klonierungsvektor	14
2.2 Methoden	14
2.2.1 DNS-Isolation und ihre Vorbereitung für die Klonierung von Positivkontrollen und Interner Kontrolle	14
2.2.1.1 Konventionelle PCR	14

2.2.1.2 Gelelektrophoretische DNS – Auftrennung und Aufreinigung	15
2.2.1.3 Ligation	16
2.2.2 Klonierung	17
2.2.2.1 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	17
2.2.2.2 Lagerung der Bakterien	17
2.2.2.3 Präparation der Plasmid-DNS	17
2.2.2.4 Kontrolle	18
2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung	18
2.2.2.6 Sequenzierung	18
2.2.3 Varianten der Aufbereitung von DNS aus Probenmaterial	19
2.2.3.1 Aufbereitung von DNS I	19
2.2.3.2 Aufbereitung von DNS II	19
2.2.4 Real-Time PCR	19
2.2.5 Bakterienanzucht / Weiterdifferenzierung	20
2.2.5.1 Kultivierung von Enterokokken	20
2.2.5.2 Kultivierung von Anaerobiern	20
2.2.6 Bestimmung der Sensitivität	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Auswahl der Zielsequenzen	23
3.2 Klonierung einer Internen Kontrolle	24
3.3 Ergebnisse der Sensitivitätsüberprüfung	25
3.4 Vorbereitungen des Patientenmaterials	26
3.4.1 Selektivbrühe	26
3.4.2 Thioglykolatbrühen	28
4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung	35
5. Literaturverzeichnis	37
6. Danksagung	42

1. Einleitung

1.1 Enterokokken

Enterokokken sind grampositive, vorwiegend paarweise auftretende Kokken. Ursprünglich wurden als Enterokokken Streptokokken bezeichnet, die folgende Umweltbedingungen überleben: 10°C bis 45°C Außentemperatur, ein pH-Wert von 6,5, 6%ige NaCl-Lösung sowie für 30 Minuten eine Temperatur bis 60°C. Des Weiteren spalten sie Aesculin (Sherman 1937). Dies wird zur klinischen Diagnostik genutzt, da Enterokokken aesculinhaliges Nährmedium schwarz verfärben. 1984 ermöglichte der Einsatz von molekularbiologischen Methoden der Arbeitsgruppe um Schleifer eine weitere Differenzierung, Enterokokken wurden als eigene Gattung akzeptiert (Schleifer und Klipper-Balz 1984).

Bislang wurden über 12 verschiedene Subtypen klassifiziert, von denen zwei physiologische Darmbewohner für den Großteil der Infektionen verantwortlich sind: *Enterococcus faecium* und *E. faecalis*.

1.1.1 Pathogenität und Therapie

Enterokokken sind physiologische Bewohner des menschlichen Gastrointestinaltraktes, des Weiteren können sie Mundhöhle, Urogenitaltrakt und die Haut des Perianalbereiches kolonisieren. Bei hospitalisierten Patienten verteilen sich die Hauptorte enterokokkaler Besiedlung auf Wunden, Ulzera und den Gastrointestinaltrakt (Sood et al. 2008).

Eine Besiedlung ist asymptomatisch und apathogen. Sie kann jahrelang bestehen und einer Infektion vorausgehen; auch stellen Patienten, die mit Enterokokken besiedelt sind, ein ständiges Keimreservoir dar. Sie können die Bakterien auf ihre Umgebung und Mitmenschen übertragen (Chavers et al. 2003).

Zwar werden Enterokokken grundsätzlich als niedrig pathogen eingestuft, da sie z.B. keine potenten Exotoxine oder gewebspaltende Enzyme produzieren (Moellering 1998). Jedoch sind immundefiziente Patienten sowie solche, die lange hospitalisiert sind, mit Cephalosporinen der dritten Generation oder Vancomycin therapiert oder chronisch dialysiert wurden (Nelson 1999), besonders anfällig für nosokomiale Infektionen mit Enterokokken. Diese zeichnen sich durch ihre Häufigkeit, Schwere und Hartnäckigkeit

aus: Enterokokken sind die zweithäufigsten Erreger nosokomialer Wund- und Harnwegsinfektionen sowie die dritthäufigsten Erreger nosokomialer Bakteriämien in den USA (Schaberg et al. 1991).

Die häufigsten durch Enterokokken verursachten Infektionen sind Harnwegsinfekte, intraabdominelle sowie intrapelvine Abszesse und postoperative Wundinfektionen (Low et al. 2001). Deutlich seltenere, ebenfalls durch Enterokokken hervorgerufene Infektionen sind Enzephalitis, neonatale und Atemwegsinfektionen sowie Osteomyelitis (Murray 1998).

Bedingt durch die steigende Anzahl Vancomycin-resistenter Subtypen, sogenannte Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE), kommen in der Therapie zunehmend alternative Antibiotika wie Linezolid oder Tigecyclin zum Einsatz (Zirakzadeh und Patel 2006).

Da der Nachweis einer Kolonisation mit einem Vancomycin-resistenten Subtyp im Falle einer Infektion therapeutische Konsequenzen nach sich zieht, ist die frühzeitige Identifikation dieser Patienten besonders wichtig.

1.2 Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE)

1.2.1 Resistenzmechanismen

Neben den oben genannten intrinsischen Resistenzen weisen einige Enterokokken-Stämme erworbene Resistenzen auf. Vor allem bei *E.faecium* tritt eine Ampicillin-Resistenz auf. In den letzten Jahren haben Glykopeptid-resistente Enterokokken an Bedeutung gewonnen. Erstmals wurden diese in den ausgehenden 80er Jahren des letzten Jahrhunderts in Großbritannien beschrieben, seitdem steigen Ausmaß und Anzahl von VRE-Durchseuchung und -Infektion zunehmend (Martone 1998). Als Auslöser dieses Zuwachses wird der Gebrauch von Avoparcin und Gentamycin als Wachstumsbeschleuniger und Antibiotikum in der Futtermittelindustrie diskutiert (Hammerum et al. 2010). 1996 wurde Avoparcin als Leistungsförderer für Schweine, Rinder und Geflügel in der Europäischen Union verboten, seitdem ist die Kolonisation mit VRE unter der gesunden Bevölkerung leicht zurückgegangen (Mascini und Bonten 2005).

Der Mechanismus der Glykopeptidresistenz lässt sich biochemisch erklären. Vancomycin hemmt die Synthese der Bakterienzellwand und wirkt dadurch bakterizid auf proliferierende Erreger. Im Rahmen der Ausbildung der bakteriellen Zellwand entsteht über mehrere Zwischenschritte ein Pentapeptid (*N*-Acetylmuramyl-Pentapeptid), das an die Außenseite der Membran transloziert wird. An das D-Ala-D-Ala-Ende dieses Pentapeptids bindet Vancomycin mit hoher Affinität und verhindert durch Transglykolysation der entstehenden Peptidkette die Anknüpfung weiterer Bausteine. Glykopeptide durchdringen also nicht die Zellmembran, sondern interagieren auf der Oberfläche (Courvalin 2006).

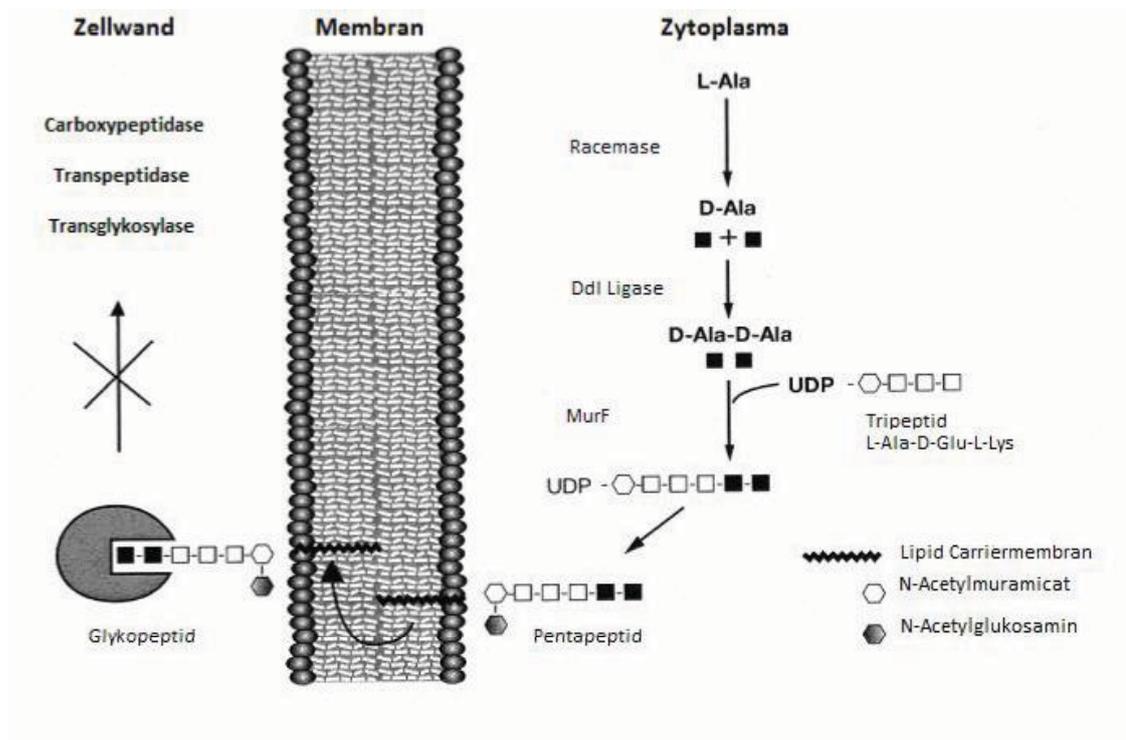


Abb. 1.1: biochemischer Mechanismus der Vancomycinresistenz, modifiziert nach Courvalin 2006

Die extramuralen Pentapeptide der Vancomycin-resistenten Enterokokken weisen nun nicht Alanin, sondern Serin oder Lactat als endständige Aminosäure auf (D-Ala-D-Ser bzw. D-Ala-D-Lac). Dadurch wird die Affinität des Antibiotikums an sein Zielsubstrat gemindert; dies allein unterbindet jedoch nicht dessen bakterizide Wirkung. Die Glykopeptide könnten an andersorts vorhandene D-Ala-D-Ala-Precursoren binden und so

die Synthese von Peptidoglykanen unterbinden. Daher werden in einem weiteren Schritt die vorhandenen, affinen D-Ala-D-Ala Peptidketten durch die Enzyme VanX D,D-dipeptidase und VanY D,D-carboxypeptidase eliminiert (Courvalin 2006).

1.2.2 VRE Subtypen

Vancomycin-resistente Enterokokken können in verschiedene Subtypen unterteilt werden, welche sich wiederum in ihrem Resistenzprofil voneinander unterscheiden.

Die Resistenz ist auf den so genannten *van*-Genen kodiert, man unterscheidet die VRE-Typen *vanA* bis *vanE*.

VanA- positive Enterokokken wurden als erstes beschrieben und verfügen mit minimal inhibition concentrations (MIC) von 64-100 mg/l für Vancomycin bzw. 16-512 mg/l für Teicoplanin über die ausgeprägtesten erworbenen Resistenzen gegenüber Vancomycin und Teicoplanin. Die *vanH* Dehydrogenase und die *vanA* Ligase synthetisieren hier ein D-Ala-D-Lac-Terminus.

VanB- positive Stämme exprimieren eine variable Resistenz gegenüber Vancomycin (MIC 4-1000 mg/l) und sind sensibel gegenüber Teicoplanin.

VanC- Subspezies kodieren eine intrinsische Vancomycin-Resistenz auf niedrigem Niveau (MIC von 2-23 mg/l), sie reagieren jedoch sensibel auf Teicoplanin (Courvalin 2006).

1.2.3 Non-enterokokkale *van*-Gene

Die für eine Vancomycin-Resistenz kodierenden *van*-Gene können nicht nur von Enterokokken exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in zwei kanadischen Krankenhäusern bis zu 6,2% des detektierten *vanB* nicht-enterokokkalen Ursprungs war (Domingo et al. 2005).

Die Arbeitsgruppe um Ballard zeigte, dass gram-positive, anaerobe Darmkeime (*Clostridium hathewayi*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium bolteae* und *Ruminococcus lactaris*) ein *vanB* exprimieren, das dem enterokokkalen Gen identisch ist (Ballard et al. 2005a).

1.2.4 Klinische Bedeutung und Diagnostik

Während VRE auf immunkompetente Träger selten gesundheitsrelevante Auswirkungen haben, können bei immunsupprimierten Patienten ausgehend von einer VRE-Besiedlung lebensbedrohliche Infektionen entstehen (Zirakzadeh und Patel 2006). Sollte ein suszeptibler Patient an einer VRE-induzierten Sepsis erkranken, entscheidet die Geschwindigkeit über die Effizienz der Therapie, es muss schnell ein wirksames Antibiotikum eingesetzt werden. Ist nicht bekannt, dass es sich um Vancomycin-resistente Enterokokken handelt, wird der behandelnde Arzt möglicherweise Vancomycin als Standard-Breitbandantibiotikum einsetzen. In diesem Fall wird wertvolle und lebenswichtige Zeit verschenkt.

Aus diesem Grund wird jeder Patient der Hämato-Onkologischen Station des Universitätsklinikums Düsseldorf auf VRE gescreent. Sollte er positiv getestet werden, wird er wegen des Übertragungsrisikos von anderen Patienten isoliert und bei dem Verdacht auf eine VRE-induzierte Erkrankung mit Linezolid behandelt.

Aktuell wird das Screening mit kulturellen Methoden durchgeführt. Stuhl oder Rektalabstriche werden in Nährbrühe mit dem Antibiotikum Meropenem zur Unterdrückung der Begleitflora 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dieses Material wird anschließend auf VRE-Agar, der zur Selektion Vancomycin enthält, ausgestrichen und nochmals 24 Stunden bebrütet. Enterokokken hydrolysieren das im Agar enthaltene Äsculin und bilden schwarze Zonen im umgebenen Medium, die aus Komplexen von den Hydrolyseprodukten und Eisenionen herrühren. Von verdächtigen Kolonien wird eine Resistenzbestimmung mittels Agardiffusion auf Vancomycin angelegt. Bei Resistenz wird der behandelnden Station der Verdacht auf VRE-Besiedlung mitgeteilt. Zur Bestätigung werden die biochemische Differenzierung sowie eine weitergehende Resistenztestung durchgeführt.

1.2.5 Optimierung der Diagnostik durch PCR

Der beschriebene kulturelle Nachweis ist zeit- und arbeitsintensiv. Es dauert mindestens zwei Tage, bis der Verdacht an die Station weitergeleitet werden kann. Eine prophylaktische Isolierung in der Zeit bis zum Befund wäre sehr kostenaufwändig. Eine

Isolierung erst bei positivem VRE-Ergebnis bedeutet aber das Risiko einer Übertragung auf Nachbarpatienten in der Zeit bis zum Befund. Um die Diagnostik zu vereinfachen und zu beschleunigen, war es das Ziel dieser Arbeit, eine PCR basierte Screeningmethode zu entwickeln.

Dies ist ein molekulargenetisches Verfahren zur enzymatischen in-vitro Replikation als Nachweis einer oder mehrerer bestimmter Gen-Sequenzen, für dessen Entwicklung dem US-Amerikaner Kary Mullis 1993 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde (Mullis und Faloona F. A. 1987).

Durch Erhitzen bis 95°C werden die Doppelstränge der DNS aufgeschmolzen, so dass sich nach Abkühlung die zugegebenen Oligonukleotidprimer an den die Zielsequenz einrahmenden Abschnitt anlagern können. Eine Polymerase synthetisiert nun die ebenfalls zugegebenen Desoxyribonukleotide in Gegenwart von Mg^{2+} Ionen an die Sequenz zwischen den Primern an. Revolutionär war vor allem der Einsatz der Taq-Polymerase, gewonnen aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, der wesentlich zur Vereinfachung des Procedere beitrug. Die Taq-Polymerase ist bis ca. 97°C hitzestabil und wird während des Erhitzens und der Denaturierung beim PCR-Zyklus nicht zerstört, sie muss also nur einmal zu Beginn der Reaktion hinzugegeben werden.

Die konventionelle PCR konnte den präanalytischen Arbeitsaufwand erheblich verkürzen, durch aufwendige postanalytische Nachbereitung (z.B. gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte) hielt sich die effektive Zeitersparnis jedoch in Grenzen. Um den Prozess weiter zu automatisieren, entwickelte die Arbeitsgruppe um Lee 1993 eine PCR, die parallel die Amplifikation sowie den Nachweis des Genproduktes ermöglichte (Lee et al. 1993).

In dieser Variante wird zur Messung der DNS ein Oligodesoxyribonukleotid als Sonde verwendet, die an ihrem 5' Ende einen fluoreszenten Farbstoff (Reporter), am 3' Ende einen weiteren Farbstoff (Quencher) trägt. In der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporters durch den sich in räumlicher Nähe befindenden Quencher unterdrückt. Im Laufe der PCR trifft die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde und trennt mit ihrer 5' Exonukleasefunktion den Reporter vom Quencher. Dieser kann nun die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr beeinflussen, so dass mit jedem Zyklus der PCR (also steigendem DNS-Produkt) die Fluoreszenz des Reporters ansteigt. Hierbei ist das gemessene Signal streng sequenzspezifisch.

Diese Schritte können mehrfach wiederholt werden, da die Taq-Polymerase bis 97°C hitzebeständig ist. So wird eine nahezu exponentielle Vervielfältigung des gesuchten DNS-Abschnittes erreicht.

Da jeder Zyklus nur 1,25 Minuten dauert, liegt ein Ergebnis nach etwa 2,5 Stunden vor. Im Vergleich zur kulturellen Diagnostik mit bis zu drei Tagen bietet die PCR also eine deutliche Zeitersparnis. Des Weiteren kann eine Angabe über die Anzahl der Genomkopien im Patientenmaterial gegeben werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Real-Time PCR für Vancomycin-resistente Enterokokken zu entwickeln und diese mit der kulturellen Routinediagnostik zu vergleichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Medien und Puffer

2.1.1.1 Chemikalien

Trypton	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Ampicillin	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
NaCl, pH 7.0	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
KCl	Biochrom, Berlin, Deutschland
MgCl ₂	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Caseinpepton	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Cystein	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthioglykolat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Resazurin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Riedel-de Hën, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
6 x MassRuler DNA Loading Dye	Fermentas, Burlington, Kanada
1 kb DNA ladder	Gibco, Darmstadt, Deutschland

2.1.1.2 Medien

LB-AMP-Medium (Luria-Bertani-Medium mit Ampicillin)	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 975 ml Aqua dest. 15 g Agar 1 ml Ampicillin
LB-AMP-Platte	LB-AMP-Medium 1,2% Bacto-Agar
SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl, pH 7.0 2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 20mM Glucose
Thioglykolatbrühe	15 g Caseinpepton 0,5 g L Cystein 5 g Glukose 5 g Hefeextrakt 2,5 g NaCl 0,5 g Natriumthioglykolat 0,001 g Resazurin 0,75 g Agar 1000 ml Aqua dest.

2.1.1.3 Puffer

TBE Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0
S1 Puffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase
S2 Puffer	200 mM NaOH
S3 Puffer	2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1

Buffer G	Fermentas, Burlington, Kanada
Dilutionspuffer	Roche, Basel, Schweiz
Elutionspuffer	Roche, Basel, Schweiz

2.1.2 Primer und Sonden

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz Größe	Firma
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> For	5' GCG-GAA-TGG-GAA- AAC-GAC-A 3' 19 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanA</i> Rev	5' CAT-GCA-AAG-CTG- AAA-ATG-CTA-CAT-C 3' 25 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanA</i> TM*	5' TCG-CCG-GAT-AAA- AAA-ATG-CAC-CGA 3' 24 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> For	5' CGG-ATA-GGA-AAA- CGC-ATG-GTC 3' 21 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanB</i> Rev	5' GCC-TCC-GGT-TTG- TCA-CCT-T 3' 19 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanB</i> TM*	5' ACG-TGG-CTT-TCC- CGG-TTT-TGC-A 3' 22 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

<i>vanC</i> ₁	<i>vanC</i> ₁ S	5' TTG-GCT-GCG-GCA-TCT-TAG 3'	18 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanC</i> ₁ A	5' CCG-TCA-ATC-CCA-AGT-TTC-G 3'	19 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanC</i> ₁ TM**	5' TGA-CGA-TTG-GTG-CTT-GTG-ATG-CGA-TT 3'	26 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
<i>vanC</i> _{2,3}	<i>vanC</i> _{2,3} S	5' GAC-AAA-TCA-AGC-CAA-CCA-GC 3'	20 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanC</i> _{2,3} A	5' CGA-TCT-CAA-CAC-CGG-CAA 3'	18 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
	<i>vanC</i> _{2,3} TM**	5' ATC-CAG-ACC-CAT-GGC-TTC-CCA-GT 3'	23 bp	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

* Fam

** Texas Red

2.1.3 Master Mix

2 x MM für Multiplex PCR (HotStarTaq® DNA Polymerase, 6 mM MgCl ₂ , dNTP Mix)	Qiagen, Hilden, Deutschland
2 x MM Supermix (iTaq DNA Polymerase, 6 mM MgCl ₂ , dNTPs)	Biorad, Hercules, USA

2.1.4 Enzyme

Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase (5U / μ l)	Roche, Basel, Schweiz
Ligase (5U / μ l)	Roche, Basel, Schweiz
Pvu 2 Restriktionsenzym	Fermentas, Burlington, Kanada

2.1.5 Bakterienstämme für Klonierung

<i>E.coli</i> – Stamm	Firma
DH5 α	Gibco, Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Klonierungsvektor

Plasmid	Größe (bp)	Resistenzgene	Charakteristika	Firma
pGEM-T Easy	3015	Amp	SP6- und T7 Promotor	Promega, Madison, USA

2.2 Methoden

2.2.1 DNS-Isolation und ihre Vorbereitung für die Klonierung von Positivkontrollen und Interner Kontrolle

2.2.1.1 Konventionelle PCR

Um das gewünschte DNA-Fragment zu vervielfältigen, wurde eine konventionelle PCR mit dem T3 Thermocycler von Biometra durchgeführt.

Der verwendete Ansatz lautet wie folgt:

van Forward Primer	1,5 µl
van Reverse Primer	1,5 µl
dNTP 10 mM Mix	3 µl (je 10 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP)
Puffer 15 mmol MgCl ₂	15 µl
Taq Polymerase	3 µl
Aqua dest.	123 µl
Template	1 µl

Die PCR gliedert sich in folgende Schritte:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	95°C	5 Minuten
2. Denaturierung (Auftrennung der DNS-Doppelstränge)	95°C	15 Sekunden
3. Annealing (Hybridisierung von Primern und Template) und Verlängern	72°C	1 Minute

Die Schritte 2 und 3 wurden 45mal zyklisch wiederholt. Die gewonnene DNS wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.2 Gelelektrophoretische DNS – Auftrennung und Aufreinigung

Um die gewünschte vervielfältigte DNS von störenden Primerresten zu trennen, wurde die amplifizierte DNS in 1 bis 2%igen Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgereinigt. Hierzu wurden je 5 Volumen DNS-Probe mit 1 Volumen 6 x MassRuler DNA Loading Dye gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter einer Stromstärke von 85mA. Durch vorherige Inkubation des Gels mit 1%iger Ethidiumbromidlösung konnte sich das Ethidiumbromid an die DNA-Fragmente anlagern und diese dann unter UV-Licht bei 320nm sichtbar machen. Das Bandmuster wurde

anhand des BioDoc Analyse von Biometra dokumentiert und die Bande in der Höhe des erwarteten DNS-Fragmentes herausgeschnitten.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte Sequenz wurde mit dem High Pure PCR Product Isolation Kit von Roche Applied Science nach Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in ca. 100 mg schwere Segmente unterteilt, wovon jedes mit je 300 µl Binding Buffer versetzt und für 10 Minuten bei 56°C inkubiert wurde.

Nachdem das Gel vollständig gelöst war, wurden 150 µl Isopropanol pro Segment hinzugefügt und vermischt. Nun wurde der gesamte Inhalt in das High Pure Filter Tube System überführt und für 60 Sekunden bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter durch zweimalige Applikation von Washing Buffer und anschließender Zentrifugation gereinigt. Danach wurde die Filtersäule mit 15 µl TE-Puffer versetzt, um die reine DNS zu eluieren.

2.2.1.3 Ligation

Das extrahierte Genmaterial wurde in das Vektorplasmid pGEM-T Easy, das ein Gen für Ampicillin-Resistenz trägt, durch Ligation integriert. Verwendet wurde das Rapid DNA Ligation Kit von Roche mit folgendem Ansatz:

Dilutionspuffer	1 µl
Ligationspuffer	5 µl
Ligase	0,5 µl
pGEM-T Easy Vektor	0,5 µl
Zu integrierendes Genmaterial	3 µl

Das Gemisch wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2 Klonierung

2.2.2.1 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

1µl der präparierten Plasmid-DNA wurden mit 100µl kompetenten *E.coli* DH5α versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 90 Sekunden bei 42°C erhitzt und erneut auf Eis gestellt.

Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension eineinhalb Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100µl dieser Kultur wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (LB-Amp-Platten) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. So können die Bakterien, die das Plasmid und somit die Ampicillinresistenz aufgenommen haben, selektiert werden. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt und in 2ml LB-Amp Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 100µg/µl Ampicillin, pH 7,5) über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

2.2.2.2 Lagerung der Bakterien

500µl der Bakteriensuspension wurden mit 500µl 87%igem Glycerin versetzt, um sie dauerhaft bei -80 °C lagern zu können.

2.2.2.3 Präparation der Plasmid-DNS

Die Präparation der Plasmid-DNS aus den transformierten Bakterien erfolgte mit dem NucleoBond Kit von BD Biosciences nach Herstellerangaben. Zunächst wurden die Bakterien 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300µl S1 Puffer resuspendiert. Nun wurde zur Lyse des Pellets 300µl Puffer S2 hinzugefügt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 300µl S3 Puffer gefällt. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis wurde für 15 Minuten bei 12.682 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (750–800µl) wurde abpipettiert und mit 640µl Isopropanol versetzt. Nach erneuter 15 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und mit 500µl 70%igem, kalten Ethanol gewaschen. Die so isolierte DNS wurde mit 20µl 10 mM Tris HCl, pH 8,0 eluiert und bei 37°C 30 Minuten gelöst.

2.2.2.4 Kontrolle

Um zu überprüfen, ob der pGEMt-Easy Vektor das gewünschte DNS-Fragment internalisiert hat, wurde ein Kontrollverdau mit PVU II durchgeführt. Das Enzym schneidet an bekannten Stellen das Vektorplasmid aus. Der Ansatz lautete wie folgt:

Restriktionsenzym PVU II	0,5µl
Puffer G	2µl
Aqua dest.	12,5µl
Plasmid-DNS	5µl

Der Ansatz wurde schüttelnd eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung unter der UV-Lampe die Größe des verdauten DNS-Fragmentes abgelesen und mit dem gewünschten Ergebnis verglichen werden.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung

Um bestimmen zu können, wie hoch die DNS-Konzentration einer Probe ist, wurde eine spektralphotometrische Messung durchgeführt. Hierzu wurde eine Probe mit Aqua dest. 1:100 verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert. Die Menge der UV Strahlung, die von der DNS bei 260 nm resorbiert wird, ist dem DNS-Gehalt direkt proportional.

$$A_{260} \times 100 \times 50 = x \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Hierbei steht 100 für die Verdünnung, 50 ist der Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNS.

2.2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Kontrolle des Inserts wurde bei der Firma GATC in Konstanz durchgeführt.

2.2.3 Varianten der Aufbereitung von DNS aus Probenmaterial

2.2.3.1 Aufbereitung von DNS I

Das Bakterienmaterial einer kulturellen Kolonie wurde mit 200µl Lysepuffer 10 Minuten bei 95 °C mit dem Ziel der bakteriellen Zellwandlyse inkubiert. Nach 2 minütiger Zentrifugation bei 13.000 x g wurde der Überstand abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Aufbereitung von DNS II

Die Bakterien wurden in 290µl G2-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 10µl von Proteinase K (600 mAU/ml) wurde die Probe bei 56°C 15 Minuten inkubiert und anschließend 200µl in ein 2ml Eppi pipettiert.

Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben durch den EZ-1 BioRobot von Qiagen.

2.2.4 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde folgender Ansatz pipettiert:

2fach Mastermix (dNTP, TaqPolymerase, Puffer)	12,5µl
Forward Primer (50µM)	5 x 0,1µl
Reverse Primer (50µM)	5 x 0,1µl
Sonde (je 5µM)	4 x 0,1µl (für <i>vanA,B,C₁,C_{2,3}</i>), 1 x 0,5µl für <i>esp</i>), 1 x 1µl für IK
Aqua dest.	6,1µl
Template	2,5µl
Interne Kontrolle (IK)	1µl

Es wurde der iCycler von BioRad und das Programm Taq.Man 1.2 tmo sowie Primer und Sonden von TIB Molbiol. verwendet:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	95°C	10 Minuten
2. Denaturierung (Auftrennung der DNS-Doppelstränge)	95°C	15 Sekunden
3. Annealing (Hybridisierung von Primern und Template) und Elongation	60°C	1 Minute

Die Schritte 2 und 3 wurden 45 x zyklisch wiederholt.

2.2.5 Bakterienanzucht / Weiterdifferenzierung

2.2.5.1 Kultivierung von Enterokokken

Wurde durch die Real-Time PCR ein *van*-Gen detektiert, stellt sich die Frage nach dessen Ursprung (s. 1.2.5). Die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen, verursacht durch nicht-enterokokkale *van*-Gene, sollte durch Kultivierung des Patientenmaterials in VRE-Selektivmedien minimiert werden.

Die Proben, die laut PCR *van*-positiv waren, wurden über Nacht in VRE Selektivbrühe bebrütet. Es wurde jeweils eine VRE- sowie eine Blutagarplatte mit einer Öse Brühe beimpft und 24 Stunden bebrütet. Bildeten sich Kolonien auf den beimpften Blutagar- und VRE-Selektivplatten, wurden diese nach einer wie oben beschrieben Aufreinigung via EZ-1 Robot per PCR auf die *van*-Resistenzgene überprüft.

Auch wurde die Selektivbrühe zentrifugiert, das Sediment per EZ-1 Robot aufgereinigt und einer Real-Time PCR zugeführt.

Zusätzlich wurde eine biochemische Differenzierung und Resistenzbestimmung der Kolonien durchgeführt.

2.2.5.2 Kultivierung von Anaerobiern

Um speziell die anaerobe Stuhlflora zu selektieren, wurden Thioglykolatbrühen mit dem Nährmedium der Rektalabstriche versetzt und 42 bis 78 Stunden bebrütet. Daraufhin

wurden Anaerobier-Nähragarplatten mit der bebrüteten Thioglykolatbrühe beimpft und nochmals 42 Stunden unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

2.2.6 Bestimmung der Sensitivität

Um die untere Nachweisgrenze der verschiedenen Zielgene, bei der noch ein positives Fluoreszenz-Signal angezeigt wird, detektieren zu können, wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt.

Hierzu wurden positiv getestete Isolate aus der Mikrobank des hiesigen Instituts 6 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert, so dass sich die Bakterien im Maximum ihrer Vermehrungsphase befanden. Die Bakteriensuspension wurde auf McFarland 1 verdünnt. Die Sensitivität der PCR wurde nun durch eine serielle Verdünnung der oben genannten Bakteriensuspension ermittelt, wobei parallel die Bakterienkonzentration mittels Koloniebildender Einheiten (KBE) kulturell bestimmt wurde.

5µl der gewonnenen McFarland 1 Bakterienbrühe wurden hierzu mit 45µl Nährbouillon versetzt und weiter in 10er Schritten bis 10⁻⁷ verdünnt. Von jedem Konzentrationsschritt wurden parallel im Vierfachansatz Blutagarplatten beimpft und 24 Stunden bebrütet. Die gebildeten Kolonien wurden gezählt.

30µl der Bakterienbrühe wurden im Vierfachansatz mit 270µl G2-Puffer aus dem EZ-1 BioRobot Kit von Qiagen lysiert und in 10er Schritten bis 10⁻⁷ verdünnt. Nach Zugabe von Proteinase K erfolgte die Real-Time PCR.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der Zielsequenzen

Da der menschliche Darmtrakt physiologisch in hohem Maße mit Enterokokken besiedelt ist, muss die PCR über Detektion von Resistenzgenen eine Differenzierung zwischen sensiblen Enterokokken und Vancomycin-resistenten Subtypen ermöglichen. Es sollten Positivkontrollen entwickelt werden, die spezifisches Genmaterial der VRE enthalten und somit eine Inhibition der PCR erkennen helfen. Würden in der PCR die Positivkontrollen nicht detektiert, wäre eine Auswertung der Patientenproben nicht möglich, da sie z.B. aufgrund von Inhibitoren falsch negativ sein könnten.

Unter diesem Blickpunkt wurden als Zielsequenzen für Glycopeptid-Resistenzen kodierende Genabschnitte ausgewählt: *vanA*, *vanB*, *vanC₁* sowie *vanC_{2,3}*.

VanA ist das am häufigsten exprimierte Resistenzgen und kodiert für eine Unempfindlichkeit gegen Vancomycin und Teicoplanin. *VanB* kodiert ebenfalls für eine Vancomycinresistenz, jedoch auf einem niedrigeren Level, gegenüber Teicoplanin sind diese Subtypen suszeptibel. *Van C₁* und *vanC_{2,3}* kodieren im Gegensatz zu den erstgenannten Sequenzen für eine intrinsische, nicht für eine erworbene Resistenz gegen Vancomycin, jedoch auf dem insgesamt niedrigsten Level (Courvalin 2006).

Zwar gibt es weitere *van* Subtypen, diese wurden jedoch aufgrund ihres sehr seltenen Vorkommens im Rahmen unseres klinischen Screenings vernachlässigt.

Für die Positivkontrollen wurden die entsprechenden Amplifikate des *vanA* bzw. *vanB* Gens in das pGEM-T Easy Vektor System von Promega kloniert und in kompetente DH5α *E. coli* transformiert (s. Kap. 2.2.2).

In die Klonierungsstelle des pGEM-T Easy Vektors kann ein PCR-generiertes Amplikon inseriert werden, da konventionelle TaqPolymerasen an die 3' Enden der Sequenzen ein Adenyl synthetisieren. Zu beiden Seiten der Klonierungsstelle schneidet die Restriktionsendonuklease PVU II das Insert heraus (Abb. 3.1).

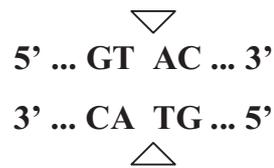


Abbildung 3.1: Schnittstellen der PVU II

Anschließend an die Transformation der Bakterien mit pGEM-T Easy samt Insert erfolgte der Kontrollverdau mit PVU II und eine Kontrolle der Insertgröße mittels Gelelektrophorese (Abb. 3.2).

Die Klone, die unter UV-Licht die gewünschte Bandenzahl zeigten, wurden sequenziert. So konnten spontane Mutationen ausgeschlossen werden, die zu einer Verfälschung der PCR hätten führen können.



Abb. 3.2: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Doppelansatz nach Amplifikation der *van*-Gene, die 130 bp (*vanA*) bzw. 200 bp (*vanC1* und *vanC2,3*) umfassen. 2%iges Agarose-Gel.

M = Molekulargewichtsmarker 1kb DNA Leiter

Aq. = Negativkontrolle

3.2 Klonierung einer Internen Kontrolle

Fällt eine Patientenprobe in der PCR negativ aus, gibt es drei Möglichkeiten:

1. Die PCR ist für die Detektion des gesuchten Genmaterials nicht geeignet.
2. Es besteht ein methodischer Fehler.
3. Die Patientenprobe enthält das zu detektierende Genmaterial nicht.

Punkt 1 kann durch eine Positivkontrolle ausgeschlossen werden, wird diese detektiert, wird die PCR auch das ggf. enthaltene bakterielle Genmaterial detektieren.

Ein methodischer Fehler, wie z.B. die fehlende Zugabe eines Reagens, kann dahingegen durch die Zugabe einer Internen Kontrolle (IK) ausgeschlossen werden. Es handelt sich hierbei um eine fremde Gensequenz, die von *vanA*-Primern flankiert wird. Diese Sequenz wird von einer speziellen, IK-spezifischen Sonde erkannt. Da die Interne Kontrolle sowie die IK-spezifische Sonde jedem Mastermix zugesetzt werden, ist bei positivem Fluoreszenzsignal ein methodischer Fehler unwahrscheinlich.

Die Interne Kontrolle wurde mithilfe des pGEM-T Easy Vektor Systems kloniert. Nach Restriktion des Klonierungsproduktes durch PVU II wurde das Insert gelelektrophoretisch auf seine Größe untersucht, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen (Abb. 3.3).

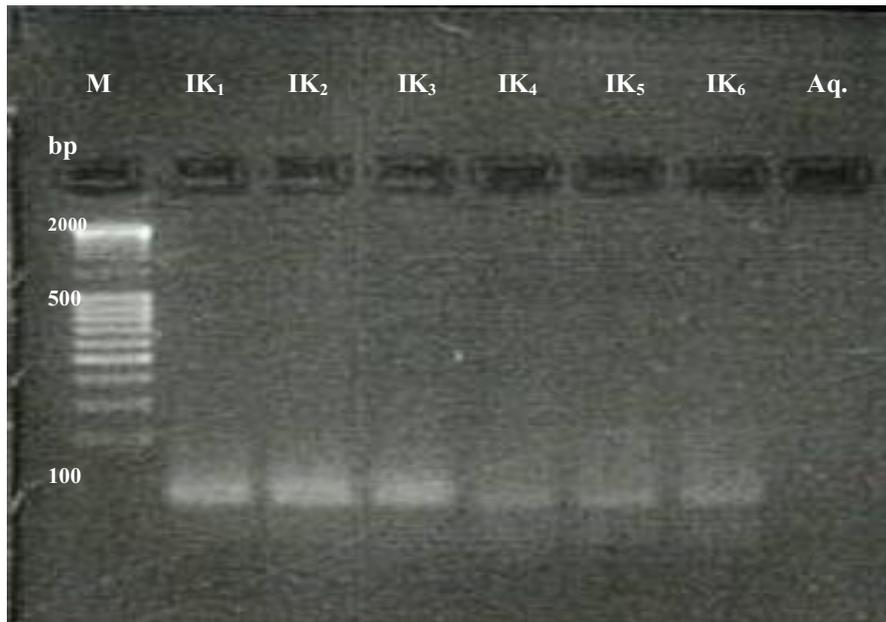


Abb. 3.3: Gelelektrophoretische Kontrolle des Klonierungsproduktes der Internen Kontrolle nach enzymatischer Restriktion. Sechs identische Proben wurden im Sechsfachansatz aufgetragen (IK₁–IK₆), die Interne Kontrolle umfasst 103 bp. 2%iges Agarose-Gel.

M = Molekulargewichtsmarker 1kb DNA Leiter

Aq. = Negativkontrolle

3.3 Ergebnisse der Sensitivitätsüberprüfung

Im Rahmen der Sensitivitätsüberprüfung der PCR wurde eine auf McFarland 1 standardisierte VRE-Bakteriensuspension seriell in 10er Schritten verdünnt (s. 2.2.6). Parallel wurde der Bakteriengehalt der jeweiligen Verdünnungsstufen mittels kultureller Anzucht und anschließender Zählung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Die einzelnen Verdünnungsstufen der Bakteriensuspension wurden einer PCR zugeführt und mit der Zahl kulturell nachgewiesener KBE verglichen.

Für die PCR wurden jeweils 2,5µl verdünnte VRE-Bakteriensuspension eingesetzt, während die kulturelle Anzucht zur Bestimmung der KBE mit 10µl erfolgte. Um zu ermitteln, wie viele KBE ein PCR-Ansatz beinhaltet, wurde die Anzahl an KBE pro Platte durch 4 geteilt. Die Mittelwerte aus den vierfachen Ansätzen wurden ermittelt.

Es zeigte sich, dass die PCR in der Lage ist, minimal 4 *vanA* Genomkopien pro 2,5µl PCR Ansatz zu detektieren, siehe Tabelle 3.1. Liegen weniger KBE im PCR-Ansatz vor,

ist die untere Nachweisgrenze der PCR unterschritten und es erfolgt keine Amplifikation mehr.

Für *vanB* ergab die Linearitätskontrolle eine untere Nachweisgrenze von 2,8 CFU, äquivalent für *vanC₁* ergab sich 2,5 CFU, s. Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Nachweisgrenze der PCR

Verdünnung	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
KBE: <i>vanA</i>	67	61	4	0,5	0
KBE: <i>vanB</i>	72	30,5	6	2,8	0
KBE: <i>vanC₁</i>	88	57,5	25,6	8,6	2,5

KBE: 2,5µl Bakteriensuspension aus PCR-Ansatz

Abgebildet sind die Mittelwerte der im Vierfachansatz kulturell bestimmten KBE pro PCR-Ansatz, sortiert nach *van*-Gen und Verdünnungsstufe. Blau unterlegt sind die Felder, bei denen in der PCR ein Signal erfolgte, weiß unterlegt jene, bei denen kein Fluoreszenzsignal mehr nachweisbar war.

3.4 Vorbereitungen des Patientenmaterials

3.4.1 Selektivbrühe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 178 Rektalabstriche parallel kulturell und molekularbiologisch untersucht. Während 114 Fälle übereinstimmend negativ und 14 Fälle übereinstimmend positiv für VRE waren, zeigte sich, dass bei 49 Proben divergente Ergebnisse von Routinediagnostik, sprich kultureller Aufbereitung, und PCR vorlagen, s. Tabelle 3.2. Während die kulturelle Anzüchtung dieser 49 Patientenmaterialien keinen Nachweis von Vancomycin-resistenten Enterokokken erbrachte, detektierte die PCR das für eine Resistenz kodierende *van*-Gen.

Tabelle 3.2: Übersicht der 178 getesteten Rektalabstriche

	Kultur positiv	Kultur negativ
PCR positiv	14	49
PCR negativ	1	114

Als Erklärung der beschriebenen divergenten Ergebnisse konnte nur dann eine höhere Spezifität der PCR angenommen werden, wenn vorher falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen mit nicht-enterokokkaler Begleitflora ausgeschlossen wurden.

Hierzu wurden 19 Patientenmaterialien, die ein divergentes Ergebnis zwischen Kultur und PCR zeigten, über Nacht in einer VRE-Selektivbouillon bebrütet (s. 2.2.5) und anschließend per EZ-1 aufbereitet. Anschließend erfolgte ein molekularbiologischer Vergleich zwischen unbehandeltem Abstrichmaterial und oben genannter Selektivbouillon.

Tabelle 3.3.: Ergebnisse der PCR vor und nach selektiver Bebrütung des Patientenmaterials in Nährbouillon sowie die Ergebnisse der entsprechenden kulturellen Diagnostik.

Abstrich	Kultur	PCR aus nativem Abstrichmaterial	PCR aus Selektivbebrütung
6539	neg	pos	pos
6552	neg	pos	Pos
6591	neg	pos	neg
6600	neg	pos	neg
6604	neg	pos	pos
6750	neg	pos	neg
6774	neg	pos	neg
6777	neg	pos	neg
10681	neg	pos	pos
10728	neg	pos	neg
11700	neg	pos	neg
11964	neg	pos	neg

12000	neg	pos	pos
12039	neg	pos	neg
12174	neg	pos	neg
12176	neg	pos	neg
12274	neg	pos	neg
12357	neg	pos	neg
12277	neg	pos	neg

pos: In kultureller Diagnostik bzw. PCR ließen sich VRE bzw. *van*-Gene nachweisen

neg: keine Detektion von VRE bzw. *van*-Genen möglich

Blau: Nach Selektivbebrütung keine positive PCR

Rot: Auch nach Selektivbebrütung Detektion von *van*-Genen mittels PCR

Wie in Tabelle 3.3 zu erkennen ist, zeigte sich in der molekularbiologischen Diagnostik nach Bebrütung in Selektivmedium in 14 von 19 Fällen eine negative PCR. Die Anzahl der divergenten Ergebnisse konnte durch Selektivbebrütung erheblich reduziert werden. Die einleitend erwähnte Problematik von falsch-positiven Resultaten, verursacht durch *van*-Gene nicht-enterokokkalen Ursprungs, scheint hier ursächlich zu sein (s. 1.2.3).

Die fünf verbleibenden Proben wurden sowohl in der PCR direkt aus Patientenmaterial, als auch in der PCR aus Selektivbrühe positiv detektiert.

Um genauere Klarheit über die biochemische Differenzierung sowie das Resistenzprofil zu erhalten, wurden diese fünf Proben auf Nähragarplatten ausgestrichen und die gewachsenen Kolonien mithilfe des VITEK-Gerätes weiter untersucht. In vier der fünf Proben waren tatsächlich Vancomycin-resistente Enterokokken vorhanden, die im kulturellen Routineansatz nicht gefunden wurden. Die fünfte Probe enthielt *Leuconostoc mesenteroides*, ein gram-positives Milchsäurebakterium, das ebenfalls Vancomycin-Resistenzen ausbilden kann (Patel 2000).

Die biochemische Differenzierung zeigte also, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Real-Time PCR in der Lage ist, kleine Mengen genetischen Materials zu erkennen und somit sehr sensitiv ist.

3.4.2 Thioglykolatbrühen

Nach den guten Erfolgen der PCR nach Bebrütung des Patientenmaterials in Selektivbouillon wollten wir nun der Frage nachgehen, inwiefern die Detektion nicht-

enterokokkaler *van*-Gene zu Fehlern im Sinne falsch-positiver Ergebnissen führen könnte.

Da Anaerobier *van*-Gene exprimieren können (Ballard et al. 2005a), inkubierten wir das Patientenmaterial, das molekularbiologisch positiv detektiert wurde und aus dem sich keine Kulturen anzüchten ließen, über 42-78 Stunden unter anaeroben Bedingungen in einer Thioglykolatbrühe (s. 2.2.5.2). Anschließend wurde eine PCR durchgeführt.

Von insgesamt 12 Rektalabstrichen, die kulturell negativ und von der PCR als positiv detektiert wurden, führten wir Thioglykolatanreicherung durch. Es zeigte sich, dass in sieben dieser vorbebrüteten Proben keine *van*-Gene amplifiziert wurden, also keine *van*-exprimierenden Anaerobier nachweisbar waren, s. Tabelle 3.4. Die übrigen fünf Proben wurden zwar positiv detektiert, allerdings bis auf eine Ausnahme nur auf *vanC1*. In den zuvor durchgeführten PCR des nativen Patientenmaterials wurden aber *vanA* und *vanB* nachgewiesen, kein *vanC1*.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Abstrichuntersuchung nach Bebrütung in Thioglykolatbrühe

	Kultur	PCR direkt	PCR Thio
12802	neg	pos	neg
12801	neg	pos	neg
12782	neg	pos	neg
12781	neg	pos	neg
12761	neg	pos	pos
12760	neg	pos	pos
12734	neg	pos	pos
12635	neg	pos	neg
12631	neg	pos	pos
12628	neg	pos	neg
12636	neg	pos	pos
12497	neg	pos	neg

pos. : In kultureller Diagnostik bzw. PCR ließen sich VRE bzw. *van*-Gene nachweisen
 neg.: Kein Nachweis von VRE bzw. *van*-Genen möglich

4. Diskussion

Diese Arbeit sollte zeigen, dass die Identifizierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken aus rektalen Abstrichen durch die TaqMan-PCR im klinischen und diagnostischen Alltag eine zeitsparende Alternative zur kulturellen Diagnostik darstellt.

Als Zielgene wurden *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2,3* als Marker für die Vancomycin-Resistenz ausgewählt und die entsprechenden Positivkontrollen mithilfe eines pGEMt-Easy Vektors kloniert. Nach Klonierung einer Internen Kontrolle wurde diese als Kontrolle für die Güte von Abstrichmaterialien und die Abwesenheit von Inhibitoren eingesetzt. Insgesamt konnten in jeder PCR minimal 2,5 – 4 Genomkopien nachgewiesen werden.

Um die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PCR zu verifizieren, erfolgte in den Jahren 2007 bis 2008 eine paralleler kultureller Nachweis von 178 Proben durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Uniklinik Düsseldorf sowie eine Real-Time PCR durch diese Arbeitsgruppe. Hierbei ergab sich für die untersuchten Rektalabstriche eine Übereinstimmung von 69%. Betrachtet man den kulturellen Nachweis von VRE als Goldstandard, so ergibt sich eine Spezifität von 69,9% (Anteil der korrekt als negativ detektierten Proben der gesunden Patienten) und eine Sensivität von 93,8 % (Anteil der korrekt als positiv detektierten Proben der erkrankten Patienten).

Aufgrund der steigenden Rate nosokomialer Infektionen mit VRE ist das Interesse an der Entwicklung einer Screening-PCR groß. In den letzten Jahren haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit diesem Thema beschäftigt (Satake et al. 1997, Palladino et al. 2003, Paule et al. 2003)

1999 veröffentlichte Michel Roger et al. (Roger et al. 1999) eine konventionelle Monoplex-PCR, die *vanA* aus zuvor in Selektivbrühe angereicherten Rektalabstrichen detektierte. Es wurden 223 Proben auf eine Selektivagarplatte sowie in eine Nährbrühe infundiert. Nach 15 – 18 Stunden Bebrütung wurde die Nährbrühe sowohl einer PCR als auch einer zweiten VRE-Selektivagarplatte zugeführt. Es zeigte sich, dass die PCR aus Brühe eine Sensitivität von 94,5% hatte, während VRE-Agarplatten, die mit zuvor bebrüteter VRE-Nährbrühe beimpft wurden, eine Sensitivität von 98% aufwiesen. Während beide Verfahren über eine Spezifität von 100% verfügten, detektierte die Kultur

kapp vier Prozentpunkte mehr Enterokokken, als die PCR es tat. Allerdings waren nach Ansicht der Autoren die Sensitivitätsunterschiede zu gering, als dass sie die Zeitersparnis (24 – 30 Stunden versus 5 Tage) aufwiegen würden. Zu beachten ist, dass die Studie von Roger et al. eine konventionelle Monoplex-PCR entwickelte, so dass andere *van*-Gene unberücksichtigt blieben. Eine Multiplex-PCR wurde unter anderem von der Arbeitsgruppe um Satake (Satake et al. 1997) entwickelt, hier zeigte sich, dass bei Verwendung der Primersets für alle vier Gene (*vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2*) die Sensitivität für *vanA* 67,8 % betrug. Wurde nur das Primerset für *vanA* benutzt, also eine Monoplex-PCR durchgeführt, stieg die Sensitivität für *vanA* auf 88,5 %.

Eine weitere Studie, die sich mit einer Multiplex – PCR beschäftigt hat, ist von der Arbeitsgruppe um Pedro Alves d’Azevedo (Alves d’Azevedo et al. 2009). Sie hat 2006 104 Rektalabstriche untersucht, die während und nach einem VRE-Ausbruch in einem brasilianischen Krankenhaus von der Intensivstation gewonnen wurden. Die Patientenproben wurden auf drei verschiedenen Agarplatten inkubiert: Medium I enthielt verschiedene Antibiotika (Aztreonam, Polymyxin B und Amphotericin B), Medium II wurde 6 g/ml Vancomycin zugesetzt und Medium III enthielt neben Vancomycin noch einen chromogenen Marker.

Diejenigen Stämme, die auf allen drei Medien gewachsen waren (n = 59), wurden einer Multiplex Real-Time PCR auf *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2,3* zugeführt. Es ergab sich eine Übereinstimmung zwischen konventionellen Methoden und der PCR mit vorheriger Selektivbebrütung von 90,2%. Die benötigte Zeitspanne von Probengewinn bis Erhalt der Ergebnisse betrug 29,5 Stunden im Vergleich zu 72 Stunden für die konventionelle kulturelle Bebrütung.

Auch bei der Studie von Alves wurden die Patientenproben vor der PCR bearbeitet, die Selektivbebrütung erfolgte nicht in einer Brühe wie bei Roger, sondern mittels unterschiedlicher Selektivagarplatten. Auch hier bleibt die Zeitersparnis gegen den hohen präanalytischen Aufwand für das mikrobiologische Laborpersonal abzuwägen.

2009 veröffentlichten Anton Mak et al. (Mak et al. 2009) eine Studie, in der sie 30.835 Rektalabstriche untersuchten. Sie führten konventionelle Monoplex-PCRs für *vanA* und *vanB* dieser Proben durch, ohne sie vorher in einem Selektivmedium zur Unterdrückung der Begleitflora inkubiert zu haben. Für *vanA* erzielten sie im Vergleich von kulturellem Nachweis und PCR eine Spezifität von 99,6% sowie eine Sensitivität von 73,3%. Der

positiv prädiktive Wert war 68,5%, der negativ prädiktive Wert 99,7%. Diese PCR ist gut geeignet, um Patienten, die mit VRE kolonisiert oder infiziert sind, herauszufiltern. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient bei negativem Testergebnis frei von Vancomycin-resistenten Enterokokken ist, liegt bei 99,7%.

Im Gegensatz zu diesen guten Ergebnissen zeigte die Studie aber auch, dass die PCR bezüglich des Nachweises von *vanB* weniger genau ist: die Sensitivität lag hier mit 85,4% zwar höher, die Spezifität aber deutlich niedriger bei 83,9% und der positiv prädiktive Wert nur bei 1,42%. Dies mag daran liegen, dass es eine hohe Durchseuchung von Darmkeimen mit nicht enterokokkalem *vanB* gibt (Graham et al. 2008) und dass keine vorherige Selektivbebrütung stattfand.

Zwar exprimierten in der Studie von Mak et al. deutlich mehr Enterokokken *vanA* als *vanB* (353 zu 82 Proben). Dennoch mindert der niedrige positiv prädiktive Wert der entwickelten PCR für *vanB* die Einsetzbarkeit als Screeningverfahren, da es zu einem unnötigen Einsatz hygienischer Schutzmaßnahmen kommen würde. Die kulturelle Routinediagnostik ist trotz eines höheren Zeitbedarfs hier die effizientere Alternative.

2010 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Dona Benadof (Benadof et al. 2010) eine Studie, in der sie eine Multiplex Real-Time PCR für *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2,3* sowie für *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* entwickelte. Es wurden von 2007 bis 2008 insgesamt 187 Rektalabstriche entnommen, die parallel einer traditionell kulturellen sowie einer molekulargenetischen Diagnostik zugeführt wurden: mit jedem Abstrichtupfer wurde eine VRE-Agarplatte beimpft, und es wurde DNA für die PCR daraus extrahiert. Die Agarplatte wurde anaerob bebrütet und anschließend wurde mittels VITEK eine Resistenz- und Subtypklassifizierung durchgeführt.

Betrachtet man den kulturellen Nachweis als Goldstandard, ergab sich eine Sensitivität von 96,8%, eine Spezifität von 76%, ein positiv prädiktiver Wert von 67,7% und ein negativ prädiktiver Wert von 97,9%. Auf eine präanalytische Bebrütung wurde verzichtet, so dass die benötigte Zeit von Probenentnahme bis zum diagnostischen Ergebnis nur wenige Stunden beträgt. Durch den simultanen Nachweis von *van*-Genen und enterokokkalen Markern ergibt sich nach Aussage der Autoren eine niedrigere Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen.

Die von Benadof vorgestellte Real-Time PCR stellt also eine echte Alternative zur kulturellen Diagnostik dar und erscheint im Vergleich zu den Ergebnissen der vorher genannten Arbeitsgruppen die sensitivste Methode zu sein. Die Studie von Mak et al

ergab zwar für *vanA* ähnlich sensitive Ergebnisse, jedoch lag der positiv prädiktive Wert der *vanB*-PCR bei nur 1,42%.

Betrachtet man nun diese Arbeit in Gegenüberstellung zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, so zeigt sich, dass die Sensitivität mit anderen Ergebnissen vergleichbar ist. Jedoch ist die Spezifität mit 69% relativ niedrig. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die entwickelte PCR sensitiver als die kulturelle Diagnostik ist, das heißt, dass geringere Keimzahlen nachgewiesen werden können (die Nachweisgrenze beträgt 2,5 – 4 Genomkopien pro PCR-Ansatz und ist damit sehr niedrig).

Auch besteht die Möglichkeit einer Detektion von nicht-enterokokkalen Trägern der *van*-Gene, beschrieben sind hier anaerobe physiologische Darmbakterien (Ballard et al. 2005a).

Um Anaerobier im Patientenmaterial zu detektieren, inkubierten wir die Rektalabstriche unter anaeroben Bedingungen in Thioglykolatbrühen (s. 3.4.2) und führten eine PCR mit dem Sediment durch. Hierbei zeigte sich, dass fünf von 12 Thioglykolatbrühen positiv auf *van*-Gene waren, diese jedoch in nur einem Fall mit den aus dem Nativmaterial detektierten *van*-Subtypen übereinstimmten: es wurde in der Brühen-PCR *vanC1* detektiert, während die PCR direkt aus Patientenmaterial *vanA* oder *vanB* fand.

Somit zeigt diese Arbeit, dass in den von uns untersuchten Abstrichen vorkommende Anaerobier zwar zum Teil für *van*-Gene kodieren, jedoch nicht – im Gegensatz zur Arbeit von S.A. Ballard aus dem Jahre 2005 (Ballard et al. 2005b) – vorwiegend *vanB*, sondern primär *vanC1* exprimieren.

Die Sensitivität der von uns entwickelten PCR ist mit 93,8% hoch, das heißt, dass bei einem negativen PCR-Ergebnis die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass der Patient doch VRE-Träger ist. Dementsprechend bietet die PCR die Möglichkeit eines „Prä-Screenings“: die eingehenden Rektalabstriche können initial mittels PCR auf Vancomycin-resistente Enterokokken überprüft werden. Zeigt sich in diesem Schritt ein negatives Ergebnis, kann der Station innerhalb weniger Stunden übermittelt werden, dass für diesen Patienten keine speziellen Hygienemaßnahmen getroffen werden müssen.

Detektiert die PCR Vancomycin-resistente Enterokokken, sollte der Patient isoliert werden und sich eine additive kulturelle Diagnostik anschließen. Zeigt sich hier kein Wachstum, können die Hygiene- und Isolationsmaßnahmen beendet werden.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, der Real-Time PCR eine Anreicherung in Selektivbrühe voranzustellen. Wir verwendeten hierfür VRE-Nährbouillon, die die Spezifität, gemessen an der Routinediagnostik, von 69% auf 74% (17/23) erhöhte. Da wir die divergenten Ergebnisse einer biochemischen Identifizierungsmethode zuführten, konnten in zwei weiteren Fällen Vancomycin-resistente Enterokokken identifiziert werden. Somit stieg die Spezifität, wenn man die biochemische Identifizierung als Standard betrachtet, auf 80% (17/21).

Die präanalytische Inkubation braucht jedoch eine größere Zeitspanne von Probenentnahme bis zur Ergebnismitteilung (ungefähr 16 Stunden im Vergleich zu 5 Stunden, wenn die PCR direkt aus dem Abstrichmaterial durchgeführt wird). Somit bleibt zu erwägen, ob bei einer verbleibenden Restunsicherheit bezüglich der Spezifität, der zusätzliche Zeitaufwand gerechtfertigt ist.

Zusammengefasst ist der zusätzliche Einsatz einer Real-Time PCR in der Routinediagnostik zur Detektion Vancomycin-resistenter Enterokokken eine gute Alternative zur reinen kulturellen Diagnostik. Natürlich muss man auch den Kostenaufwand bedenken, so dass wahrscheinlich nur dann kostendeckend gearbeitet werden kann, wenn ein entsprechend großes Patientenkollektiv getestet wird.

5. Zusammenfassung

Enterokokken sind ubiquitär vorkommende, äußerst umweltresistente grampositive Kokken mit den wichtigsten humanpathogenen Vertretern *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*. Ihre Bedeutung als Erreger nosokomialer Infekte steigt zunehmend; besonders immunsupprimierte Patienten sind gefährdet (Schaberg et al. 1991; Nelson 1999). Ist Vancomycin normalerweise ein potentes Antibiotikum zur Therapie enterokokkaler Infektionen, versagt es bei einer zunehmenden Zahl Vancomycin-resistenter Subtypen. Patienten, die mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) infiziert oder kolonialisert sind, müssen daher frühzeitig erkannt und gegebenenfalls isoliert werden; einerseits, um ihre Therapie im Infektionsfall frühzeitig anzupassen, andererseits, um die Ansteckungsgefahr für andere Patienten zu minimieren.

Die aktuelle kulturelle VRE-Diagnostik ist mit 3-5 Tagen langwierig. Daher war der Ansatz dieser Arbeit, mithilfe einer Real-Time PCR eine Screeningmethode zu entwickeln, welche die Zeitspanne der Diagnostik auf wenige Stunden verkürzt. Hierfür wurden Rektalabstriche von hämatologisch-onkologischen Patienten des UKD untersucht. Als Zielgene wählten wir die häufigsten für Vancomycin-Resistenz kodierenden Sequenzen: *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2,3*. Um jede PCR auf potentielle Inhibitoren sowie Fehler bei der DNS-Aufbereitung überprüfen zu können, klonierten wir Positivkontrollen und eine Interne Kontrolle.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die parallel durchgeführte mikrobiologische und molekularbiologische Diagnostik der Rektalabstriche divergente Ergebnisse ergab. Die PCR detektierte deutlich mehr VRE als die kulturelle Diagnostik: Von 178 Proben wurden 63 molekularbiologisch positiv auf VRE getestet, jedoch nur 15 in der kulturellen Diagnostik. Dies könnte einerseits mit einer höheren Sensitivität der PCR begründet werden (d.h., es können sehr kleine Mengen genetischen Materials detektiert werden), andererseits könnte es auch zur Detektion non-enterokokkaler *van*-Gene und damit falsch-positiver Resultate gekommen sein. Wir bebrüteten 19 Rektalabstriche, die unterschiedliche Ergebnisse gezeigt hatten, zur Unterdrückung von Begleitflora in VRE-Selektivbouillon und führten anschließend eine erneute PCR durch. In 14 von 19 Fällen zeigte die PCR hiernach keine Fluoreszenz mehr, es können also in diesen Fällen falsch-positive Resultate durch non-enterokokkale *van*-Gene angenommen werden. In 5 Patientenmaterialien konnten auch in der zweiten PCR VRE amplifiziert werden, sie

wurden daraufhin einer biochemischen Differenzierung zugeführt. In vier der fünf Proben konnten Vancomycin-resistente Enterokokken nachgewiesen werden, der fünfte Rektalabstrich enthielt *Leuconostoc mesenteroides*, ein gram-positives Milchsäurebakterium, das ebenfalls Vancomycin-Resistenzen ausbilden kann (Patel 2000).

Aufgrund der hohen Sensitivität von 93% könnte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Real-Time PCR als „Prä-Screening“ etabliert werden: Wird ein Patient negativ getestet, brauchen keine Isolationsmaßnahmen initiiert zu werden. Findet sich in der PCR eine positive Fluoreszenz, sollten entsprechende Isolations- und Hygienemaßnahmen sowie eine zusätzliche kulturelle Diagnostik eingeleitet werden. Ist diese negativ, kann die Isolation beendet werden.

6. Literaturverzeichnis

Alves d'Azevedo, P.; Souza Santiago, K. A. de; Furtado, G. H. C.; et. al. (2009):

Rapid Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in Rectal Samples from Patients Admitted to Intensive Care Units.

In: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 13 (4), S. 289–293.

Ballard, S. A.; Grabsch, E. A.; Johnson, P. D. R.; Grayson, M. L. (2005a):

Comparison of Three PCR Primer Sets for Identification of vanB Gene Carriage in Feces and Correlation with Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci: Interference by vanB-Containing Anaerobic Bacilli.

In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1), S. 77–81.

Ballard, S. A.; Pertile, K. K.; Lim, M.; Johnson, P. D. R.; Grayson, M. L. (2005b):

Molecular Characterization of vanB Elements in Naturally Occurring Gut Anaerobes.

In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (5).

Benadof, D.; San Martin, M.; Aguirre, J.; Paredes, L.; et. al. (2010):

A new multiplex PCR assay for the simultaneous detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs.

In: *Journal of Infection* 60, S. 354–359.

Chavers, L. S.; Mosery, S. A.; Benjamin, W. H.; Banksy, S. E.; et. al. (2003):

Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting.

In: *Journal of Hospital Infection* 53, S. 159–171.

Courvalin, P. (2006):

Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci.

In: *Clinical Infectious Diseases* 42 (1), S. S25-34.

Domingo, M. C., Huletsky A., Giroux R., Boissinot K., Picard F.J., Lebel P., Ferraro M.J., Bergeron M.G. (2005):

High prevalence of glycopeptide resistance genes vanB, vanD, and vanG not associated with enterococci in human fecal flora.

In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11), S. 4784 - 4786

Graham, M.; Ballard, S. A.; Grabsch, E. A.; Johnson, P. D. R.; Grayson, M. L. (2008):

High Rates of Fecal Carriage of Nonenterococcal vanB in both Children and Adults.

In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (3), S. 1195–1197.

Hammerum, A. M.; Lester C. H.; Heuer, O. E. (2010):

Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard?

In: *Foodborne pathogens and disease* 7 (10), S. 1137–1146.

Lee, M. S.; Connell, C. R.; Bloch, W. (1993):

Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.

In: *nucleic acids research* 21 (16), S. 3761–3766.

Low, D.E; Keller, N.; Bart, A.; Jones, R. N. (2001):

Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999.

In: *Clinical Infectious Diseases* 32 (2), S. 133–145.

Mak, A.; Miller, M. A.; Chong, G.; Monczak, Y. (2009):

Comparison of PCR and Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enterococci: Highly Disparate Results for vanA and vanB.

In: *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12), S. 4136–4137.

Martone, W. J. (1998):

Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States?

In: *Infection control and hospital Epidemiology* 19 (8), S. 539–545.

Mascini, E. M.; Bonten, M. J. M. (2005):

Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control.

In: *Clinical Microbiology and Infection* 11 (4), S. 43–56.

Moellering, R. (1998):

Vancomycin-Resistant Enterococci.

In: *Clinical Infectious Diseases* 26, S. 1196–1199.

Mullis, K. B.; Faloona F. A. (1987):

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.

In: *methods in enzymology* 155, S. 335–350.

Murray, B. E. (1998):

Diversity among multi-drug resistant enterococci.

In: *Emerging infectious diseases* 4 (1), S. 37–47.

Nelson, R. R. S. (1999):

Intrinsically vancomycin-resistant Gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control.

In: *Journal of Hospital Infection* 42, S. 275–282.

Palladino, S.; Kay, I. D.; Flexman, J. P.; Boehm, I.; et. al. (2003):

Rapid Detection of vanA and vanB Genes Directly from Clinical Specimens and Enrichment Broths by Real-Time Multiplex PCR.

In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6), S. 2483–2486.

Patel, R. (2000):

Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal specimens.

In: *FEMS Microbiology letters* 185 (1), S. 1–7.

Paule, S. M.; Trick, W. E.; Tenover, F. C.; Lankford, M.; et. al. (2003):

Comparison of PCR Assay to Culture for Surveillance Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci.

In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10), S. 4805–4807.

Roger, M.; Faucher, M.; Forest, P.; et. al. (1999):

Evaluation of a vanA-Specific PCR Assay for Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during a Hospital Outbreak.

In: *Journal of Clinical Microbiology* 37 (10), S. 3348–3349.

Satake, S.; Clark, N.; Rimland, D.; Nolte, F. S.; Tenover, F. C. (1997):

Detection of Vancomycin-resistant Enterococci in Fecal Samples by PCR.

In: *Journal of Clinical Microbiology* 35 (9), S. 2325–2330.

Schaberg, D. R.; Culver, D. H.; Gaynes, R. P. (1991):

Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection.

In: *The American Journal of Medicine* 91 (3B), S. 72S-75S.

Schleifer, K. H.; Klipper-Balz, R. (1984):

Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.

In: *International Journal of systematic bacteriology* 34, S. 31–34.

Sherman, J. M. (1937):

The streptococci.

In: *Bacteriological reviews* 1 (1), S. 3–97.

Sood, S.; Malhotra, M.; Kapil, D.; Kapil, A. (2008):

Enterococcal infections & antimicrobial resistance.

In: *Indian Journal of Medical Research* 128, S. 111–121.

Zirakzadeh, A.; Patel, R. (2006):

Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment.

In: *Mayo Clinic Proceedings* 81 (4), S. 529–536.

6. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Colin MacKenzie, der mir dieses Dissertationsthema zur Verfügung stellte und ein besonders geduldiger, bemühter und stets ansprechbarer Doktorvater war. Vielen Dank für die großartige Betreuung und Unterstützung!

Herrn Professor Klaus Pfeffer danke ich dafür, dass ich im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene forschen und promovieren durfte.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Sabine Messler bedanken, die oftmals klaglos Ihre PCR-Auswertungen unterbrochen hat, um mir bei den meinen (und bei noch viel mehr) zu helfen.

Herrn PD Dr. Guido Kobbe möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Ebenfalls danke ich Sonja Kropp und dem mikrobiologischen Laborteam für tausend kleine und große Hilfestellungen sowie das gute Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Großmutter, die früh damit begonnen haben, stetig wiederkehrende Motivationstiefpunkte zu überwinden und mir damit unter anderem das Medizinstudium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.