

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

**Molekulargenetische Charakterisierung und Epidemiologie  
der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 in Düsseldorf**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sofija Ressina

2022

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zweitgutachter: PD Dr. med. Timo Brandenburger

Meinen Eltern in Liebe und Dank für ihre unendliche Unterstützung.

## Auflistung der Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

1. Wendel, A. F., Brodner, A. H., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeffer, K., Toleman, M. A., MacKenzie, C. R. Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(10): 5162–5165.
2. Wendel, A. F., Kolbe-Busch, S., Ressina, S., Schulze-Robbecke, R., Kindgen-Milles, D., Lorenz, C., Pfeffer, K., MacKenzie, C. R. Detection and termination of an extended low-frequency hospital outbreak of GIM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Germany. *American Journal of Infection Control*. 2015; 43(6): 635–639.
3. Wendel, A. F., Ressina, S., Kolbe-Busch, S., Pfeffer, K., MacKenzie, C. R. Species Diversity of environmental GIM-1-producing bacteria collected during a long-term outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016; 82(12): 3605–3610.

## **Zusammenfassung (in Deutsch)**

Die klinische Relevanz von Carbapenem-resistenten Erregern mit Bildung von Metallo- $\beta$ -Laktamasen nimmt angesichts der noch beschränkten Therapieoptionen zu. Seit dem Erstnachweis der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 im Jahr 2002 aus dem Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation des UKD ist bis dato eine auf die Region Nordrhein-Westfalen begrenzte und diskontinuierliche Verbreitung dieser MBL festgestellt worden. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung und Epidemiologie der MBL GIM-1 in Düsseldorf.

Alle von 2007 bis 2012 gesammelten klinischen GIM-1-tragenden Isolate zeigten hohe MHK-Werte und damit eine Resistenz gegen Breitbandantibiotika, wie Piperacillin/Tazobactam, die Vertreter der 3. Generation Cephalosporine (Ceftazidim), mit wenigen Ausnahmen auch gegen Vertreter der 4. Generation (Cefepim) und Carbapeneme (Imipenem und Meropenem), sowie Fluorchinolone (Ciprofloxacin). Alle untersuchten *Pseudomonas* spp. sowie die Mehrzahl der *Enterobacterales* waren nur noch auf Colistin sensibel. Mit ausgewählten klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Isolaten unterschiedlicher genetischer Cluster wurden Konjugationsexperimente mit jeweils zwei Akzeptorkeimen auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden durchgeführt. Der *In-vitro*-Gentransfer von *bla*<sub>GIM-1</sub> war lediglich in einem Fall erfolgreich.

In Anbetracht der protrahierten Dauer und des diskontinuierlichen Charakters der klonalen Verbreitung des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub> wurde ein Umweltreservoir vermutet. Die Umweltuntersuchungen auf der chirurgischen Intensivstation des UKD ermöglichten den Erstnachweis von *bla*<sub>GIM-1</sub> in einer Vielzahl unterschiedlicher bakterieller Spezies sowie in unterschiedlich großen Plasmiden, hinweisend auf eine hohe Mobilität von *bla*<sub>GIM-1</sub>. Die Genotypisierung erbrachte den Nachweis eines protrahierten monoklonalen klinischen Ausbruchsgeschehens mit *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden *P. aeruginosa* assoziiert mit der unmittelbaren klinischen Umgebung des Patienten: elf klonale Isolate des *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms M0 wurden in neun Waschbeckensiphons der Patientenzimmer, einem Waschbeckensiphon eines Arbeitsraums und auf einer Haarwaschwanne identifiziert. Nach Einführung von erweiterten Hygienemaßnahmen, u. a. Austausch der Waschbecken, wurde im Rahmen wiederholter Umweltuntersuchung 2013 eine Rekolonisation der Waschbecken festgestellt.

Diese Arbeit verdeutlicht die Wichtigkeit einer lokalen epidemiologisch-mikrobiologischen Surveillance. Es ist eine Überlegung wert, ob derartige Umweltuntersuchungen in Bereichen der stationären Patientenversorgung mit erhöhtem MRE-Risiko trotz aufwendiger Methoden und Kosten routinemäßig mit dem Ziel der Prävention von Ausbruchsgeschehen durchgeführt werden sollten. Hierzu wäre es sinnvoll, eine standardisierte Empfehlung zur Durchführung einer solchen Untersuchung zu entwickeln, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse und damit eine Bewertung zu ermöglichen, welche als Grundlage zur Erarbeitung von Präventionsmaßnahmen notwendig sind.

## **Zusammenfassung (in Englisch)**

The clinical relevance of carbapenemase-resistant pathogens producing metallo- $\beta$ -lactamases is increasing in part due to limited therapeutical options. Since the first detection of the metallo- $\beta$ -lactamase GIM-1 in 2002 from clinical specimen of the surgical intensive-care unit of the UKD, a local and discontinuous spread of this MBL limited to the region of North Rhine-Westphalia has been observed. This dissertation deals with the genetic characterisation and epidemiology of GIM-1 in Düsseldorf.

From 2007 to 2012 GIM-1-carrying isolates showed resistance with high MICs to broad spectrum antibiotics such as piperacillin/tazobactam, representative of the 3rd generation cephalosporins (ceftazidime) and, with few exceptions, also to representative of the 4rd generation (cefepime), carbapenems (imipenem and meropenem) as well as fluoroquinolones (ciprofloxacin). All tested *Pseudomonas* spp. and the majority of the *Enterobacteriales* were sensitive only to colistin. Conjugation experiments were performed with selected clinical isolates of different genetic clusters together with two different pathogens as acceptors on selective media containing antibiotics. The horizontal *in vitro* gene transfer was successful only in one case.

Considering the protracted duration and discontinuous character of the clonal spread of the *bla*<sub>GIM-1</sub> resistance gene, an environmental reservoir was suspected. Investigations on the surgical intensive-care unit revealed the presence of *bla*<sub>GIM-1</sub> in many different bacterial species, which were not previously known to be *bla*<sub>GIM-1</sub>-carriers, and additionally *bla*<sub>GIM-1</sub> was found in many plasmids of different sizes indicating a high mobility of *bla*<sub>GIM-1</sub>. Genotyping revealed a protracted monoclonal clinical outbreak of *bla*<sub>GIM-1</sub>-carrying *P. aeruginosa* linked to the proximate patients' clinical environment: eleven clonal isolates of the *P. aeruginosa* outbreak strain M0 has been found in nine sinks in patient rooms, in one sink in a working room and on one hair-washing basin. After introduction of extended hygiene measurements including the exchange of sinks, recolonization of sinks has been detected during the environmental investigation in 2013.

These work points out the importance of a local epidemiological and microbiological surveillance. It is worth a thought, whether such environmental investigations should be implemented as a routine in areas with inpatient care with high risk for multiresistant pathogens for the purpose of outbreak-prevention in spite of labour-intensive methods and high costs. A standardised recommendation for the performance of such investigations is needed in order to facilitate the comparison of findings and enable an evaluation in order to develop preventive measures.

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Ampicillin
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i>	$\beta$ -Laktamase-Gen
clinical breakpoints	Klinische Grenzwerte
CRE	Carbapenem-resistente <i>Enterobacterales</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended Spectrum $\beta$ -Laktamase
E-Test	Epsilometer-Test
GIM	German-Imipenemase
HAP	Hospital acquired pneumonia
HCl	Salzsäure
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mb	Megabasen
MBL	Metallo- $\beta$ -Laktamase
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRE	Multiresistente Erreger
MRGN	Multiresistente gramnegative Erreger
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
NaAz	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid
NRZ	Nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger an der Ruhr-Universität Bochum
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RIF	Rifampicin
SSC-Puffer	Natriumchlorid-Citrat-Puffer

TBE-Puffer  
TE-Puffer  
Tris-Puffer  
UKD  
VRE  
w/v

TRIS-Borat-EDTA-Puffer  
TRIS-EDTA-Puffer  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Vancomycin-resistente Enterokokken  
weight/volume

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nosokomiale Infektionen .....	1
1.1.1 Pathogenese und Übertragung nosokomialer Infektionen.....	2
1.2 Multiresistente Erreger .....	2
1.2.1 Risikofaktoren für MRE.....	3
1.2.2 Besondere Herausforderung: Multiresistente gramnegative Erreger .....	3
1.3 Carbapenem-Resistenz .....	4
1.3.1 $\beta$ -Laktamase-Resistenzenzyme .....	5
1.3.2 Metallo- $\beta$ -Laktamasen .....	5
1.3.2.1 Wirkspektrum und Resistenzmechanismen.....	5
1.3.2.2 Genetische Übertragung der MBL-Gene .....	6
1.3.2.3 Geografische Verbreitung der MBL.....	7
1.3.2.4 German-Imipenemase-1 in Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen.....	8
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Material .....	10
2.1.1 Klinische Isolate.....	10
2.1.1.1 Medien und Nährböden für die Anzucht und Resistenzbestimmung .....	10
2.1.1.2 Antibiotika und Chemikalien .....	10
2.1.1.3 Konjugationsexperimente der klinischen Isolate.....	10
2.1.1.3.1 Medien und Nährböden.....	10
2.1.1.3.2 Antibiotika und Reagenzien .....	11
2.1.1.3.3 Geräte .....	11
2.1.1.3.4 Primer und Sonden .....	11
2.1.1.3.5 Mastermix.....	12
2.1.1.3.6 DNA-Aufreinigung .....	12
2.1.1.3.7 RAPD-PCR-Primer .....	12
2.1.2 Umweltuntersuchung .....	12
2.1.2.1 Probensammlung und Keimidentifizierung.....	12

2.1.2.1.1	Materialien, Reagenzien und Antibiotika.....	12
2.1.2.1.2	Primer und Sonden .....	13
2.1.2.2	PFGE-Genotypisierung .....	13
2.1.2.2.1	Enzyme und Chemikalien .....	13
2.1.2.2.2	Puffer.....	13
2.1.2.2.3	Geräte .....	14
2.1.2.2.4	Andere Materialien.....	14
2.1.2.3	In-Gel-Hybridisierung.....	14
2.1.2.3.1	Materialien .....	14
2.1.2.3.2	Chemikalien und Lösungen.....	14
2.1.2.3.3	Geräte .....	15
2.1.2.3.4	Primer.....	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Klinische Isolate.....	16
2.2.1.1	Detektion von GIM-1 am Universitätsklinikum Düsseldorf.....	16
2.2.1.2	Resistenzbestimmung durch E-Test .....	18
2.2.1.2.1	Durchführung .....	18
2.2.1.2.2	AbleSEN der Platten und Auswertung .....	19
2.2.1.3	Konjugationsexperimente.....	20
2.2.1.3.1	Ziel .....	20
2.2.1.3.2	Durchführung .....	20
2.2.1.3.3	Auswertung .....	21
2.2.1.3.4	Positivkontrollen .....	22
2.2.1.3.5	DNA-Aufreinigung .....	22
2.2.1.3.6	RAPD-PCR .....	23
2.2.1.3.7	Resistenzbestimmung.....	24
2.2.2	Umweltuntersuchungen.....	24
2.2.2.1	Ziel .....	24
2.2.2.2	Durchführung.....	24
2.2.2.2.1	Sammlung der Proben .....	24

2.2.2.2.2	Screening-PCR aus dem Amies-Medium.....	25
2.2.2.2.3	Kultur-PCR.....	27
2.2.2.2.4	Auswertung .....	28
2.2.2.3	Genotypisierung .....	29
2.2.2.3.1	Das Prinzip der Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	29
2.2.2.3.2	Ziel .....	29
2.2.2.3.3	Durchführung der PFGE .....	30
2.2.2.3.3.1	Vorbereitung der DNA.....	30
2.2.2.3.3.2	Kultivierung der Isolate.....	30
2.2.2.3.3.3	Vorbehandlung der bakteriellen DNA mit Lysozym .....	30
2.2.2.3.3.4	Herstellung der Gelblöckchen.....	31
2.2.2.3.3.5	Verdau mit Restriktionsenzymen <i>BcuI</i> ( <i>SpeI</i> ) oder <i>XbaI</i> .....	31
2.2.2.3.3.6	Verdau mit S1-Nuklease .....	31
2.2.2.3.3.7	Vorbereitung des PFGE-Laufs .....	32
2.2.2.3.3.8	Auswertung .....	32
2.2.2.4	In-Gel-Hybridisierung.....	33
2.2.2.4.1	Durchführung .....	33
2.2.2.4.2	Auswertung .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	Klinische Isolate.....	34
3.1.1	Resistenztestung.....	37
3.1.2	Konjugationsexperimente.....	39
3.2	Umweltuntersuchung .....	41
3.2.1	Umweltisolate: Vielfalt der bakteriellen Spezies .....	43
3.2.2	Ergebnisse der Genotypisierung: Klonalität der Umweltisolate .....	43
3.2.3	Genetische Lokalisation des Resistenzgens <i>bla</i> <sub>GIM-1</sub> .....	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Wirkungsort der $\beta$ -Laktamase .....	5
Abb. 2: Übersicht über die Methoden .....	16
Abb. 3: Algorithmus zur Detektion von Carbapenemase-produzierenden gramnegativen Erregern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des UKD .....	17
Abb. 4: Übersicht über die Konjugationsexperimente .....	20
Abb. 5: Schematische Darstellung der Zimmereinrichtung .....	25
Abb. 6: E-Testergebnis des <i>P. aeruginosa</i> -Isolats M0 .....	38
Abb. 7: Beispiel eines Imipenem-sensiblen <i>P. aeruginosa</i> .....	38
Abb. 8: PFGE-Bandenmuster des Akzeptor-, Donorkeims und des Transkonjuganten .....	40
Abb. 9: Vielfalt der bakteriellen Spezies der Umweltisolate .....	43
Abb. 10: PFGE-Bandenmuster der <i>P. aeruginosa</i> -Umweltisolate und des Ausbruchsstamms M0 .....	46
Abb. 11: PFGE-Bandenmuster der <i>P. putida</i> -Isolate .....	47
Abb. 12: PFGE-Bandenmuster der <i>S. maltophilia</i> -Isolate .....	48
Abb. 13: PFGE-Bandenmuster der <i>C. freundii</i> -Isolate .....	48
Abb. 14: PFGE-Bandenmuster der <i>E. cloacae</i> -Isolate .....	49
Abb. 15: Ausgewählte klinische Isolate und Umweltisolate mit ihren Plasmiden .....	50

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Ansatz für die Real-Time-PCR .....	23
Tab. 2: Einzelschritte im PCR-Programm .....	23
Tab. 3: Ansatz für die Screening-PCR .....	26
Tab. 4: Übersicht über den Ansatz der Screening-PCR mit zugefügtem DNA-Material .....	26
Tab. 5: Ansatz für die Kultur-PCR .....	27
Tab. 6: Übersicht über den Ansatz der Kultur-PCR mit zugefügtem DNA-Material .....	28
Tab. 7: Übersicht über die genetischen Charakteristika der klinischen Isolate .....	35
Tab. 8: MHK-Werte der untersuchten klinischen Isolate .....	39
Tab. 9: MHK-Werte für Akzeptor und Transkonjugant .....	40
Tab. 10: Übersicht über die Zahlen der Umweltuntersuchung 2012 .....	41
Tab. 11: Übersicht über die Zahlen der Umweltuntersuchung 2013 .....	42
Tab. 12: Übersicht über die Umweltisolate und ausgewählte klinische Isolate .....	44

# 1. Einleitung

## 1.1 Nosokomiale Infektionen

Die Definitionen von nosokomialen Infektionen wurden im Rahmen des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) aufgrund der gesetzlich verpflichtenden lokalen Surveillance in medizinischen Einrichtungen in Deutschland zuletzt 2017 überarbeitet und aktualisiert. Für die allgemeine KISS-Definition einer nosokomialen Infektion ist weiterhin der Zeitpunkt des Auftretens eines Infektionssymptoms ab dem Aufnahmetag in eine stationäre Einrichtung entscheidend. Als Aufnahmetag wird der erste Aufenthaltstag festgelegt. Für die Feststellung einer nosokomialen Infektion wird vorausgesetzt, dass der Infektionstag frühestens der dritte Aufenthaltstag ist. Der Infektionstag ist der Tag mit dem ersten Symptom. Sofern Symptome vor dem dritten Aufenthaltstag auftreten, gilt die Infektion als mitgebracht. Wenn das Symptom unspezifisch ist und andere Ursachen vorliegen, zählt für die Datierung des Infektionstages der Tag, an dem das erste spezifische Symptom in Erscheinung tritt. Beispiele für spezifische Symptome sind Ergebnisse der laborchemischen, mikrobiologischen oder bildgebenden Diagnostik, die ärztliche Diagnose oder der Beginn einer antibiotischen Therapie. Zu beachten ist, dass die o. g. Definition nicht für postoperative Wundinfektionen greift. Zum Ziel der Surveillance wurden für die Diagnose von spezifischen nosokomialen Infektionen zusätzliche signifikante Kriterien und Definitionen festgelegt, auf die hier nicht näher eingegangen wird (1).

In absteigender Reihenfolge bezüglich der Inzidenz handelt es sich bei den nosokomialen Infektionen um Infektionen der unteren Atemwege (v. a. *hospital acquired pneumonia*), postoperative Wundinfektionen und Harnwegsinfektionen (2).

Das Keimspektrum von nosokomialen Infektionen ist vielfältig. Die spät auftretenden nosokomialen Pneumonien (*late-onset HAP*) werden v. a. durch gramnegative Erreger verursacht. Hierzu zählen *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacterales*, z. B. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. und *Enterobacter* spp. (3). Bei HAP ist das Erregerspektrum davon abhängig, ob der Patient<sup>1</sup> Risikofaktoren für multiresistente Erreger (MRE) aufweist (Kapitel 1.2.1). Ist dies nicht der Fall, so ist im gramnegativen Bereich mit *Enterobacterales* oder *Haemophilus influenzae* sowie im grampositiven mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pneumoniae* als mögliche Erreger zu rechnen. Bei Wundinfektionen stehen Hautkeime, wie *S. aureus*, als Erreger im Vordergrund. Die Infektionsquelle kann auch keimbesiedeltes Fremdmaterial darstellen, so z. B. Katheter und/oder

---

<sup>1</sup> Aus Gründen der vereinfachten Lesbarkeit wird im Folgenden von einer geschlechterneutralen Schreibweise Abstand genommen und das generische Maskulinum verwendet. Die Personenbezeichnungen sind nur in männlicher Form angeführt, beziehen sich dennoch in gleicher Weise auf weibliche Personen.

Fremdkörper jeglicher Art. Mischinfektionen und Keime, wie *E. coli* und *Enterococcus* spp., können im Rahmen von abdominellen Infektionen durch Wundkontamination als Folge Wundinfektionen auslösen (4). Der häufigste Verursacher von Harnwegsinfektionen ist *E. coli*, dicht gefolgt von *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp. sowie *P. aeruginosa* (5). Sofern Risikofaktoren für MRE vorliegen, erweitert sich das oben angeführte Erregerspektrum um Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA), multiresistente gramnegative Erreger (MRGN), inklusive Extended Spectrum  $\beta$ -Laktamase- sog. ESBL-bildende *Enterobacterales*, sowie *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Stenotrophomonas maltophilia* (3).

### **1.1.1 Pathogenese und Übertragung nosokomialer Infektionen**

Bei der Pathogenese wird zwischen primär endogenen, sekundär endogenen und exogenen Infektionen unterschieden. Die primär endogenen Infektionen entstehen durch die körpereigene Flora des Menschen, die in primär sterile Körperregionen gelangt. Die sekundär endogenen Infektionen werden hervorgerufen durch Übertragung körpereigener Bakterien in primär sterile Körperregionen im Rahmen von pflegerischen Maßnahmen oder iatrogener Manipulation, z. B. durch Anlage von Kathetern oder Sonden. Bei den exogen bedingten Infektionen erfolgt die Übertragung körperfremder Erreger durch direkten Kontakt zu anderen Patienten (6).

Ein möglicher Übertragungsweg ist zum einen die direkte Kontamination, z. B. durch Pflegepersonal, Kontaktflächen oder andere Patienten. Zum anderen können mangelnde Hygiene- bzw. unzureichende Pflegemaßnahmen, wie ausbleibender Verbandswechsel, für die Infektionsgenese ursächlich sein. Zusätzlich ist eine Infektion durch Tröpfchenübertragung oder aerogen über Tröpfchenkerne möglich.

### **1.2 Multiresistente Erreger**

Multiresistente Erreger (MRE) tragen zunehmend zum Entstehen von nosokomialen Infektionen bei (7) und umfassen sowohl das gramnegative als auch grampositive Erregerspektrum.

Die Infectious Diseases Society of America formulierte im Januar 2009 das ESKAPE-Schema zur Beschreibung besonders gefährlicher multiresistenter Erreger mit sehr eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten: *Enterococcus faecium* mit Vancomycin-Resistenz (VRE), *S. aureus* und insbesondere MRSA, *Klebsiella* spp. und *E. coli* mit ESBL-Bildung sowie *K. pneumoniae* durch Bildung von Carbapenemasen als Buchstabe „K“, multiresistenter *A. baumannii* und multiresistenter *P. aeruginosa* sowie *Enterobacter* spp. (8, 9). Im September 2009 wurde ein Vorschlag zur Änderung von ESKAPE zu ESCAPE veröffentlicht. Dieser handelte davon, das letzte „E“ *Enterobacter* spp. in *Enterobacterales* zu ändern und damit *K. pneumoniae* und *Enterobacter* spp. unter „E“ zusammenzufassen. Das „K“ wird folglich zum „C“ zugunsten der Erwähnung von

*Clostridioides difficile* in Anbetracht der zunehmenden Prävalenz sowie der zunehmenden klinischen Bedeutung der *C.-difficile*-assoziierten Infektionen (CDI) (10).

### **1.2.1 Risikofaktoren für MRE**

Das Vorkommen der MRE im klinischen Alltag ist für bestimmte Patientengruppen von Bedeutung. Zu den Patienten mit hohem Risiko für MRE-Infektionen zählen ältere, multimorbide Patienten mit langer Hospitalisierungszeit (> 4 Tage), mit invasiver Beatmung (> 4–6 Tage) sowie Patienten mit einer Tracheotomie. Zudem sind Patienten mit schweren Grunderkrankungen bzw. Stoffwechselerkrankungen, z. B. Diabetes, aber auch Patienten mit Nierenversagen bzw. chronische Dialysepatienten (11), mangelernährte Patienten und Immunsupprimierte (11, 12) betroffen.

Zu den zusätzlichen Risikofaktoren für multiresistente Erreger gehören außerdem: langer Aufenthalt im Krankenhaus oder auf einer Intensivstation, Krankenhausaufenthalt in den letzten drei Monaten, Antibiotikavorthherapie innerhalb der letzten drei Monate, lange Dauer der Antibiotikatherapie, Vorhandensein von chronischen Wunden, Kathetern und/oder Sonden, Unterbringung im Pflegeheim und Bettlägerigkeit (6, 11, 13), Vorhandensein einer strukturellen Lungenerkrankung, offene Hautwunden und bekannte Kolonisation durch MRE.

Infektionen mit Bakterien, welche eine Metallo- $\beta$ -Laktamase (MBL) produzieren, führen zur Erhöhung der Morbidität und Mortalität von Risikopatienten, zu protrahierten Krankheitsverläufen, hoher Liegedauer und dementsprechend hohen Hospitalisierungskosten (14–16).

### **1.2.2 Besondere Herausforderung: Multiresistente gramnegative Erreger**

Multiresistente gramnegative Erreger (MRGN) sind die häufigsten MRE und gewinnen zunehmend an Bedeutung im klinischen Alltag (7).

Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) des Robert Koch-Instituts stellte 2012 eine Klassifizierung multiresistenter gramnegativer Stäbchen auf Basis ihrer phänotypischen Resistenzeigenschaften auf (17). Diese Einteilung hat sich im klinischen Bereich, v. a. im Bereich der Krankenhaushygiene, im Hinblick auf die Durchführung von Präventionsmaßnahmen etabliert. Nachdem EUCAST im Februar 2019 das „I“ neu als „sensibel bei erhöhter (*Increased*) Exposition“ definierte, aktualisiert das RKI die MRGN-Definition (18). Die Klassifikation beruht weiterhin auf der Resistenzentwicklung gegen folgende klinisch bedeutsamen Antibiotikagruppen mit bakterizider Wirkung: Acylureidopenicilline (Leitsubstanz: Piperacillin), 3./4. Generation Cephalosporine (Leitsubstanz: Cefotaxim und/oder Ceftazidim), Carbapeneme (Leitsubstanz: Imipenem und/oder Meropenem) sowie Fluorchinolone (Leitsubstanz: Ciprofloxacin). Während in der Empfehlung aus dem Jahr 2012 ein intermediäres Ansprechen in der Bewertung mit „resistent“ gleichgesetzt wurde, gilt nun, dass im Falle der Anwendung von EUCAST

nur die als resistent getesteten Antibiotika für die MRGN-Klassifizierung herangezogen werden (18). Folglich werden Erreger, die gegen drei der o. g. vier Antibiotikagruppen resistent sind, als 3MRGN und solche, die gegen mindestens ein Antibiotikum in allen vier Antibiotikagruppen resistent sind, als 4MRGN bezeichnet. Hierbei wird eine weitere Differenzierung in Abhängigkeit von der Keimspezies vorgenommen. So sind *Enterobacterales* und *Acinetobacter* spp. den 3MRGN-Erregern zuzuordnen, wenn sie ausschließlich auf alle Carbapeneme sensibel oder sensibel bei erhöhter Dosierung oder Exposition reagieren. Eine Ausnahme betrifft die *Enterobacterales*: Sobald sie nur gegen ein Carbapenem resistent sind, werden sie als 4MRGN klassifiziert (15). Im Falle von *P. aeruginosa* gibt es auch einige Ausnahmen. So wird ein *P. aeruginosa* als 3MRGN-Erreger bezeichnet, wenn er nur auf eine beliebige der vier Antibiotikagruppen sensibel bzw. sensibel bei erhöhter Dosierung oder Exposition reagiert. Damit wäre z. B. ein *P. aeruginosa*, der auf Carbapeneme anspricht, genauso als 3MRGN-Erreger klassifiziert wie ein *P. aeruginosa*, der gegen Carbapeneme resistent ist. Zu beachten ist, dass in der MRGN-Klassifizierung von *P. aeruginosa* in der Antibiotikagruppe der 3./4. Generations-Cephalosporine sowie der Carbapeneme eine „und“-Verknüpfung besteht. D. h., ein *P. aeruginosa* muss gegen beide Leitsubstanzen der jeweiligen Gruppen und damit gegen beide Carbapeneme resistent sein, um als 4MRGN-Erreger eingestuft zu werden (15).

Eine weitere Neuerung betrifft *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii* mit Nachweis einer Carbapenemase. In diesem Fall werden diese Erreger ohne Berücksichtigung der phänotypischen Resistenztestung als 4MRGN-Erreger definiert (18).

### **1.3 Carbapenem-Resistenz**

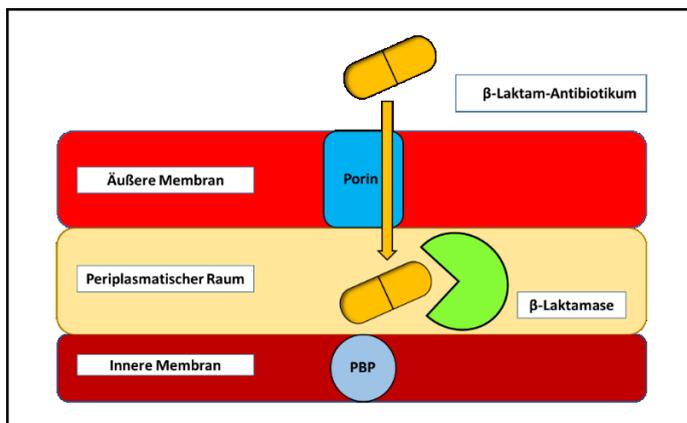
Die zunehmende klinische Relevanz der MRE bezieht sich auf die Resistenz gegen Carbapeneme, welche die Behandlungsmöglichkeiten deutlich einschränkt (19). Carbapeneme sind mit den Hauptvertretern Imipenem und Meropenem als Breitbandantibiotika sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien bakterizid wirksam und werden im Rahmen schwerer bakterieller Infektionen als wichtigste Reserveantibiotika eingesetzt. Aufgrund der steigenden Inzidenz von 3MRGN (20) kommen Carbapeneme im intensivmedizinischen Bereich zunehmend als Initialtherapie zur Behandlung lebensbedrohlicher Infektionen mit gramnegativen Erregern zum Einsatz.

Die Carbapenem-Resistenz der MRE beruht auf vielen verschiedenen Mechanismen, die gleichzeitig in einer Bakterienspezies auftreten und im unterschiedlichen Ausmaß zur Ausbildung der Resistenz beitragen können: die epigenetische wie auch chromosomale Bildung von  $\beta$ -Laktamasen, der Verlust von bestimmten Kanalproteinen, sog. Porinen, sowie die Überexpression von Effluxpumpen. Die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen ist nur eine der Ursachen für die Resistenzentwicklung, ihr kommt jedoch eine zunehmende klinische Bedeutung zu (21).

### 1.3.1 $\beta$ -Laktamase-Resistenzenzyme

Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind über ihre chemische Struktur, den  $\beta$ -Laktam-Ring, definiert. Sie wirken bakterizid, indem sie an das Penicillin-bindende Protein der bakteriellen Zellmembran binden, als Folge die bakterielle Zellwandsynthese hemmen und auf diese Weise die bakterielle Zellteilung unterbinden. Diese Antibiotikagruppe umfasst Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame.

Die  $\beta$ -Laktamase ist ein inaktivierendes bakterielles Enzym, welches eine Spaltung des  $\beta$ -Laktam-Rings durch Hydrolyse im periplasmatischen Raum bewirkt, sodass die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ihre antibakterielle Wirkung nicht entfalten können.



**Abb. 1: Wirkungsort der  $\beta$ -Laktamase**

PBP, Penicillin-bindendes Protein.

Es existieren mehrere Einteilungen der  $\beta$ -Laktamasen. Eine davon ist die molekulare Klassifikation nach Ambler (22) basierend auf der Aminosäuresequenz der Enzyme. Nach dieser Klassifikation werden die  $\beta$ -Laktamasen in vier Gruppen (A, B, C, D) unterteilt. Die Gruppen A, C, D sind Serin- $\beta$ -Laktamasen, die Gruppe B umfasst Metalloenzyme, genauer Metallo- $\beta$ -Laktamasen. Während die Serin- $\beta$ -Laktamasen die Aminosäure Serin für die Hydrolyse des  $\beta$ -Laktam-Rings benötigen, ist bei den Metallo- $\beta$ -Laktamasen das Zink-Ion für ihre Aktivität von Bedeutung (22). Die Gruppe der Metallo- $\beta$ -Laktamasen wird zusätzlich in Subklassen unterteilt. In den Subklassen B1 und B3 befindet sich das zweifach positiv geladene, in B2 das einfach positiv geladene Zink-Ion im aktiven Zentrum. Neben dieser Einteilung besteht auch noch die funktionelle Klassifikation nach Bush und Jacoby mit Fokus auf die phänotypischen Eigenschaften und die Substratspezifität der Enzyme (23).

### 1.3.2 Metallo- $\beta$ -Laktamasen

#### 1.3.2.1 Wirkspektrum und Resistenzmechanismen

Metallo- $\beta$ -Laktamasen sind sog. Carbapenemasen und verursachen den Wirkverlust der Carbapeneme. Sie entfalten ihre Aktivität gegen alle gängigen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, d. h. gegen

Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme (22). Sie sind nicht wirksam gegen Monobactame, wie Aztreonam. Zudem sind sie nicht empfindlich gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, werden jedoch in ihrer Wirkung in Anwesenheit des Chelators Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) inhibiert (24).

MBL kommen am häufigsten in der Familie der Nonfermenter, wie *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp., sowie bei *Enterobacterales* vor. Diese Erreger finden Erwähnung im ESKAPE- bzw. ESCAPE-Schema als besonders gefährliche multiresistente Erreger mit sehr eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten (8, 10). Die Verbreitung der MBL in gramnegativen Bakterien ist besorgniserregend im Hinblick auf die sich daraus ergebenden begrenzten Therapieoptionen.

### 1.3.2.2 Genetische Übertragung der MBL-Gene

Die genetische Information zur Kodierung der MBL kann auf zwei Arten in Bakterien vorkommen. Bei intrinsischen MBL ist die genetische Information im bakteriellen Genom integriert. Häufig sind die MBL-Gene jedoch auf mobilen Elementen, wie Plasmiden oder Integrons, lokalisiert.

Die Carbapenemasen von *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. sind überwiegend chromosomal kodiert, dagegen liegen plasmidkodierte Carbapenemasen häufiger in *K. pneumoniae* und *Enterobacter* spp. vor. MBL, welche durch horizontalen Gentransfer erworben werden, gehören zur Subklasse B1 nach Ambler (22, 25) und finden sich v. a. in *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* und weiteren gramnegativen Nonfermentern (26).

Die Verbreitung der erworbenen MBL erfolgt durch mobile DNA-Elemente. Die Mehrheit der MBL-Gene ist in Genkassetten eingefügt, die in Integrons der Klasse 1 oder Klasse 3 eingebaut sind (27). Integrons sind Bestandteile des bakteriellen Genoms oder von Plasmiden und sind in der Lage, genetische Informationen in Form von Genkassetten einzufangen und wieder freizugeben. Auf diese Weise können Genkassetten zwischen verschiedenen Integrons ausgetauscht werden.

Solche Genkassetten sind kleine, circa 1 kb große Anteile einer zirkulären DNA. Sie enthalten ein oder mehrere Gene zusammen mit einer Erkennungsstelle, welche meistens ein 59 Basen langes DNA-Element darstellt und der Genkassette die Möglichkeit zur Mobilität verleiht. Genkassetten können unabhängig von Integrons existieren, sofern sie jedoch Bestandteil eines Integrons sind, kann die genetische Information weitergegeben werden. Es existiert keine Mengenbegrenzung bezüglich der Anzahl von Genkassetten, die auf einem Integron vorkommen können. Ein Integron kann neben Genkassetten mit MBL-kodierenden Genen auch andere Genkassetten mit zusätzlichen Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen oder andere  $\beta$ -Laktamasen beherbergen (28).

Integrons sind von sich aus nicht mobil, sie benötigen Transposons, die ihnen einen Transfer ermöglichen. Transposons sind genetische Elemente bestimmter Länge, die von einem DNA-

Molekül zum anderen wandern und damit eine genetische Information vom Bakteriengenom in die DNA eines Plasmids und in umgekehrter Richtung übertragen können.

Bei einem Plasmid handelt es sich dagegen um ein kleines, ringförmiges, doppelsträngiges DNA-Molekül, welches extrachromosomal, d. h. unabhängig vom Genom, vorliegt und sich autonom replizieren kann (29). Dadurch, dass verschiedene Bakterienspezies im Rahmen des horizontalen Gentransfers ihre Plasmide untereinander austauschen, ist die Übertragung von unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen möglich. Bei den Plasmiden werden konjugierbare und nicht konjugierbare Plasmide unterschieden. Konjugierbare Plasmide können selbstständig die Konjugation, d. h. den Plasmidaustausch zwischen zwei Bakterien, initiieren, hierfür besitzen sie ein spezielles Gen. Die nicht konjugierbaren Plasmide sind hierzu nicht in der Lage. Sie werden auch als mobilisierbare Plasmide bezeichnet und sind auf das Vorhandensein eines konjugierbaren Plasmids in der Zelle angewiesen, welches die Konjugation initiiert und gemeinsam mit dem nicht konjugierbaren Plasmid übertragen wird. Nach erfolgreicher Konjugation ist das Resistenzplasmid sowohl im Donor- als auch im Akzeptorerreger vorhanden (29).

Eine andere Variante ist das Vorliegen der MBL-Gene in *Insertion-Sequence-Common-Regions-Elementen* (sog. *ISCR-Elementen*), die leicht mobilisierbar sind (27, 30). Es gibt *ISCR-Elemente*, die Bestandteile von Integrons der Klasse 1 bilden, und solche, die nicht Integron-assoziiert sind. Unabhängig davon sind sie jedoch in der Lage, ihnen unmittelbar anliegende große DNA-Stücke zu mobilisieren und diese im Rahmen der Plasmid-DNA-Replikation nach dem *Rolling-Circle-Prinzip* direkt an Plasmide weiterzugeben. Im Rahmen seiner Arbeit geht Toleman davon aus, dass *ISCR-Elemente* ein sehr potentes mobiles Transfersystem darstellten, da sie beliebige Anteile der DNA mobilisieren könnten (30).

### **1.3.2.3 Geografische Verbreitung der MBL**

Mindestens elf MBL-Typen werden beschrieben. Bei den klinisch relevanten MBL kann zwischen solchen mit globaler und lokaler Ausbreitung unterschieden werden.

Die am weitesten geografisch verbreiteten MBL-Typen sind Imipenemase (IMP), Verona-Integron-Metallo- $\beta$ -Laktamase (VIM) und New-Delhi-Metallo- $\beta$ -Laktamase (NDM) (25).

Sowohl vom IMP- als auch vom VIM-Typ existieren mehr als 20 verschiedene genetische Varianten. Der VIM-Typ mit Ursprung in Südeuropa zeigt eine noch breitere Substratspezifität als der IMP-Typ, zusätzlich wurde im Falle von VIM-1 (31) und VIM-2 eine ausgiebigere Verbreitung konstatiert (25, 27). VIM ist die MBL mit der häufigsten Prävalenz in Europa (27), wobei VIM-2 die international am weitesten verbreitete Metallo- $\beta$ -Laktamase darstellt (26). In der NDM-Gruppe zeigt v. a. NDM-1 mit Ursprung in Indien das Potenzial zur interkontinentalen Ausbreitung (25, 32).

Die am häufigsten in Deutschland vorkommende MBL ist VIM-1, gefolgt von NDM-1; sie alle kommen in *Enterobacterales* vor (33).

Noch vor einigen Jahren wurde eine lokale Verbreitung der Metallo- $\beta$ -Laktamasen German-Imipenemase-1 (GIM-1) in Deutschland (34–43), der Sao-Paulo-Metallo- $\beta$ -Laktamase (SPM-1) in Brasilien (44), sowie der Dutch-Imipenemase (DIM-1) in den Niederlanden (45) beschrieben. 2013 wurden GIM-1 und SPM-1 erstmalig in Carbapenem-resistenten *P. aeruginosa*-Isolaten am Universitätsklinikum in Ismailia in Ägypten (46), GIM-1 zuletzt von 2015 bis 2016 erneut in *P. aeruginosa* in Ägypten (47), DIM-1 inzwischen in Indien (48) und Myanmar (49) festgestellt. Als neue genetische Variante der GIM-1 wurde die German-Imipenemase-2 (GIM-2) erstmalig 2014 nachgewiesen (50) – jedoch ohne weitere Erwähnung bis zum aktuellen Zeitpunkt.

#### **1.3.2.4 German-Imipenemase-1 in Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen**

Die MBL German-Imipenemase-1 wurde erstmalig 2004 im Rahmen der Arbeit von Castanheira et al. beschrieben (34). Diese Arbeit bezieht sich auf fünf klonale *P. aeruginosa*-Isolate, welche im Jahr 2002 aus dem respiratorischen Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf isoliert und nach Übermittlung an das weltweite SENTRY Antimicrobial Surveillance Program erstmalig als Träger der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 identifiziert worden sind. Das Auftreten der MBL GIM-1 wurde zunächst in der Gruppe der Nonfermenter, genauer bei *P. aeruginosa* festgestellt (34, 36). Später wurde GIM-1 bei *Serratia marcescens* (35, 42) und *E. cloacae* (37) der *Enterobacterales*-Gruppe sowie bei *Acinetobacter pittii* (38) nachgewiesen. Die initiale Ausbreitung von GIM-1 wurde in Düsseldorf lokalisiert (39, 40), andere GIM-1 tragende *Pseudomonas* spp.-Isolate wurden später in Mönchengladbach entdeckt (36). GIM-1 gehört gemeinsam mit der inzwischen geografisch weitverbreiteten VIM-MBL zwar der gleichen Subklasse B1 an, die Ausbreitung von GIM-1 war jedoch noch bis vor einigen Jahren nur auf Deutschland beschränkt, vorwiegend auf die Region Nordrhein-Westfalen. Hashem et al. wiesen 2013 und 2014 erstmalig GIM-1 in Carbapenem-resistenten *P. aeruginosa*-Isolaten einer Intensivstation am Universitätsklinikum in Ismailia, Ägypten nach (46). 2015 und 2016 wurde erneut in Ägypten GIM-1 in *P. aeruginosa* festgestellt (47). Zeitgleich erfolgte von 2014 bis 2016 ebenfalls in Ägypten der Nachweis von GIM-1 erstmalig in *A. baumannii* (51).

In Bezug auf die Aminosäuresequenz von GIM-1 stellten Castanheira et al. lediglich eine geringe Übereinstimmung zu anderen MBL-Genen fest. Die höchste Gemeinsamkeit wurde mit 43,5 % zu der MBL vom IMP-6-Typ und nur noch 31,2 % zu den MBL vom VIM-Typ beschrieben (34).

#### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung und Epidemiologie der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 in Düsseldorf. Seit der Isolation des ersten *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven klinischen Keims (*P. aeruginosa*-Isolat M0) im Juni 2002 aus dem Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation wurde das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub> von 2007 bis 2012 in weiteren klinischen Isolaten nachgewiesen. Eine erhöhte Inzidenz wurde im Jahr 2011 registriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Isolate phänotypisch der Resistenzbestimmung unterzogen und der Prüfung auf die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers von *bla*<sub>GIM-1</sub>.

Die von der Arbeitsgruppe gesammelten klinischen Daten deuteten auf einen langjährigen, von 2002 bis 2012 bestehenden klinischen Ausbruch von *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven *P. aeruginosa* auf der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf hin. Eine zeitliche Überschneidung zwischen Patientenaufenthalten konnte nicht festgestellt werden. Aufgrund der über die Jahre geringen Inzidenz der *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden klinischen Isolate wurde eine Übertragung zwischen klinischer Umgebung und Patient vermutet. Es stellte sich die Frage, inwiefern die klinische Umgebung des Patienten das Resistenzgen beherbergt und welche Rolle sie bei seiner Ausbreitung spielt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Umweltuntersuchung auf der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf initiiert. Die detektierten *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Umweltisolate wurden gemeinsam mit ausgewählten klinischen Isolaten genotypisiert, um eine Aussage über die Verwandtschaft der Umweltisolate untereinander und ihren möglichen Bezug zu klinischen Isolaten treffen zu können. Zusätzlich wurden weitere genetische Untersuchungen zur Bestimmung der Lokalisation des Resistenzgens in den identifizierten Umweltisolaten durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Klinische Isolate

##### 2.1.1.1 Medien und Nährböden für die Anzucht und Resistenzbestimmung

Hirn-Herz-Infusion (BHI) Bouillon	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MacConkey-Agar	Oxoid, Basingstoke, UK
Müller-Hinton-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Luria-Bertani-Agar (LB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Die Herstellung aller aufgeführten Medien erfolgte in der Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Düsseldorf.

Glycerinstocks	0,74 g Hirn-Herz-Infusion (BHI) Bouillon 80 ml Glycerin 20 ml Aqua dest.
MacConkey-Agar mit Meropenem	51,5 g Agar 1000 ml Aqua dest. 0,5 g Meropenem
Müller-Hinton-Agar	38 g Agar 1000 ml Aqua dest.

##### 2.1.1.2 Antibiotika und Chemikalien

E-Test-Antibiotikastreifen	bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Meropenem	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Trypton	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland

##### 2.1.1.3 Konjugationsexperimente der klinischen Isolate

###### 2.1.1.3.1 Medien und Nährböden

LB-AMP/RIF Selektivnährboden, fest	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar 100 mg Ampicillin 100 mg Rifampicin
------------------------------------	---

LB-AMP/NaAz Selektivnährboden, fest	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar 100 mg Ampicillin 100 mg Natriumazid
LB-Medium, flüssig	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
COS-Agar (Columbia Agar + 5 % Hammelblut)	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland

### 2.1.1.3.2 Antibiotika und Reagenzien

Ampicillin	Roche, Basel, Schweiz
Rifampicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bactident Oxidase-Test	Merck, Darmstadt, Deutschland
BD BBL Indole Slides	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.1.3.3 Geräte

VITEK 2	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
MALDI-TOF-MS	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
IQ5 iCycler (PCR-Gerät)	Bio-Rad, München, Deutschland
Densitometer	bioMérieux, Durham NC, USA
Zentrifuge	Hettich, Bäch, Schweiz
Magnetrührer	Labinco, Breda, Niederlande
Vortex-Gerät	Heidolph, Schwabach, Deutschland

### 2.1.1.3.4 Primer und Sonden

Folgende Primer und Sonden (Metabion, Martinsried, Deutschland) wurden für die Zielgene *bla<sub>OXA-48</sub>* (52) sowie *bla<sub>GIM-1</sub>* (39) benutzt:

Zielgen	Primer/Sonde	Sequenz (5' -> 3')	Größe (bp)
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-48 Forward	TTCGGCCACGGAGCAAATCAG	21
	OXA-48 Reverse	GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA	27

	OXA-48 Sonde	5' Hex-CTGGCTGCGCTCCGATACGTGTAACCTATTG-BHQ-1-3'	31
<i>bla</i> <sub>GIM-1</sub>	GIM-1 Forward	CGACACACCTTGGTCTGAAGAA	22
	GIM-1 Reverse	GATGCTAGCCATAACCTGGTATCC	24
	GIM-1 Sonde	5' Hex-ACACGAAGTTGTTATTATCCTGGGCGACTGAC-BHQ-1-3'	32

#### 2.1.1.3.5 Mastermix

2x Mastermix Eurogentec, Köln, Deutschland

Inhalt: HotGoldStar DNA Polymerase, 5 mM

MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Uracil-N-glycosylase

#### 2.1.1.3.6 DNA-Aufreinigung

BioRobot EZ1 Workstation Qiagen, Hilden, Deutschland

EZ1 DNA Tissue Kit Qiagen, Hilden, Deutschland

PBS-Puffer Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

#### 2.1.1.3.7 RAPD-PCR-Primer

Mit folgenden Primern der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) wurde gearbeitet:

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Größe (bp)	Quelle der Primer
Eric1-R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA	21	(39)
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	22	(39, 53)
272	AGCGGGCCAA	10	(39, 54)
1254	CCGCAGCCAA	10	(39, 55)

### 2.1.2 Umweltuntersuchung

#### 2.1.2.1 Probensammlung und Keimidentifizierung

##### 2.1.2.1.1 Materialien, Reagenzien und Antibiotika

Elution Swab (eSwab<sup>TM</sup>) Copan Diagnostics, Brescia, Italy

Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) Nährbodenküche am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Meropenem, Imipenem, Vancomycin Hexal, Holzkirchen, Deutschland

### 2.1.2.1.2 Primer und Sonden

Für die Multiplex-Real-Time-PCR wurden folgende Primer und Sonden (Metabion, Martinsried, Deutschland) benutzt:

Zielgen	Primer/Sonde	Sequenz (5' -> 3')	Größe (bp)
<i>bla<sub>gyrB</sub></i>	<i>gyrB</i> -Forward	CCTGACCATCCGTCGCCACAAC	22
	<i>gyrB</i> -Reverse	CGCAGCAGGATGCCGACGCC	20
	<i>gyrB</i> -Sonde	5'-Fam-CCGTGGTGGTAGACCTGTTCCCAGACC-BHQ-1-3'	27
<i>bla<sub>ecfX</sub></i>	<i>ecfX</i> -Forward	CGCATGCCTATCAGGCGTT	19
	<i>ecfX</i> -Reverse	GAACTGCCCAGGTGCTTGC	19
	<i>ecfX</i> -Sonde	5'-Hex-ATGGCGAGTTGCTGCGCTTCCT-BHQ-1-3'	22
Euba	Euba-Forward	TCGAGCATGTKGYTTAATTYGA	22
	Euba-Reverse	TGCRGGACTTRACCMAACA	19
	Euba-Sonde	5'-TexasRed-CACGAGCTGACGACARCCATGCA-BHQ-2-3'	23
Verwendete Primer und Sonde für die Inhibitionskontrolle:			
Inhibitions- kontrolle	Bp-Primer- Forward	CGGATGAACACCCATAAGCAT	21
	Bp-Primer- Reverse	CGATCAATTGCTGGACCATT	21
Universal- sonde	Sonde	5'-TexasRed-ATGCCTCTTCACATTGCTCCACCTTCCT- BHQ-2-3'	29

### 2.1.2.2 PFGE-Genotypisierung

#### 2.1.2.2.1 Enzyme und Chemikalien

Lysozym (25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinase K (10 mg/ml)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>BcuI</i> ( <i>SpeI</i> ) (10 U/μl)	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>XbaI</i> (10 U/μl)	Thermo Scientific, Waltham, USA
S1-Nuklease (100 U/μl)	Thermo Scientific, Waltham, USA

#### 2.1.2.2.2 Puffer

Lysis-Puffer, für 1-L-Lösung	10 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	0,2 % Natriumdesoxycholat,
	0,5 % N-Lauroylsarcosin, pH 7,5
TE-Puffer, für 1-L-Lösung	100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 7,5

Proteolyse-Puffer, für 500-ml-Lösung	100 mM EDTA 0,2 % Natriumdesoxycholat, 1 % N-Lauroylsarcosin, pH 8,0
S1-Puffer, für 1-L-Lösung	30 mM Natriumacetat 50 mM NaCl 5 mM Zinksulfat, pH 4,5
10x Tango-Puffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
10x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.2.2.3 Geräte

CHEF-DR III System (PFGE-Gerät)	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gel Doc XR plus Imaging System	Bio-Rad, München, Deutschland

#### 2.1.2.2.4 Andere Materialien

CHEF Mapper XA System 50-Well Plug Mold	Bio-Rad, München, Deutschland
48 Well Cell Culture Cluster	Corning, New York, USA

#### 2.1.2.3 In-Gel-Hybridisierung

##### 2.1.2.3.1 Materialien

Whatman® Blotting Paper	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Prime-it II Random Primer Labelling Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Fotofilm Biomax MR	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

##### 2.1.2.3.2 Chemikalien und Lösungen

Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon 400	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SSC-Puffer, 20x	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lachshoden-DNA (D1626-1G)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<sup>32</sup> P dCTP	Perkin-Elmer, Waltham, USA

Angaben für jeweils 1-L-Lösung:

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
----------------------	--------------------------

Neutralisationslösung	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
Prehybridisierungslösung	20 ml 6x SSC 0,1 % 0,1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0,1 % Ficoll 0,1 % (v/v) UHT-Vollmilch, 1 ml verdünnt mit 20 ml Wasser 0,5 % (w/v) Natriumlaurylsulfat 150 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA

### 2.1.2.3.3 Geräte

Hybridisierungssofen (Hybridiser HB-1D)	Techne, Barlow World Scientific Ltd, Stone, UK
---	---

### 2.1.2.3.4 Primer

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Größe (bp)	Quelle der Primer
R2	CCAAGCAGCAAGCGCGTTAC	20	(39)
GIMR	ACTCATGACTCCTCACGAGG	20	(34, 39)

## 2.2 Methoden

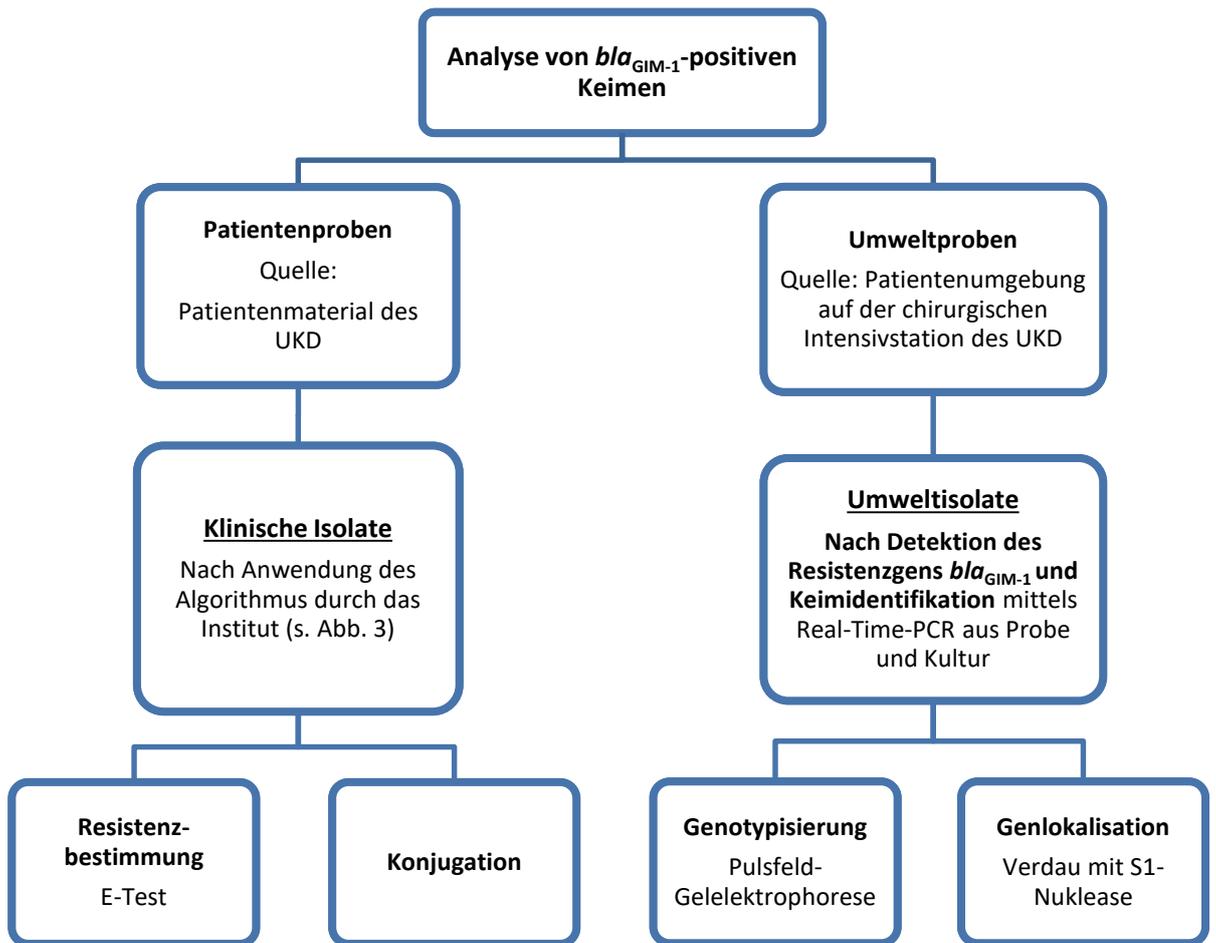


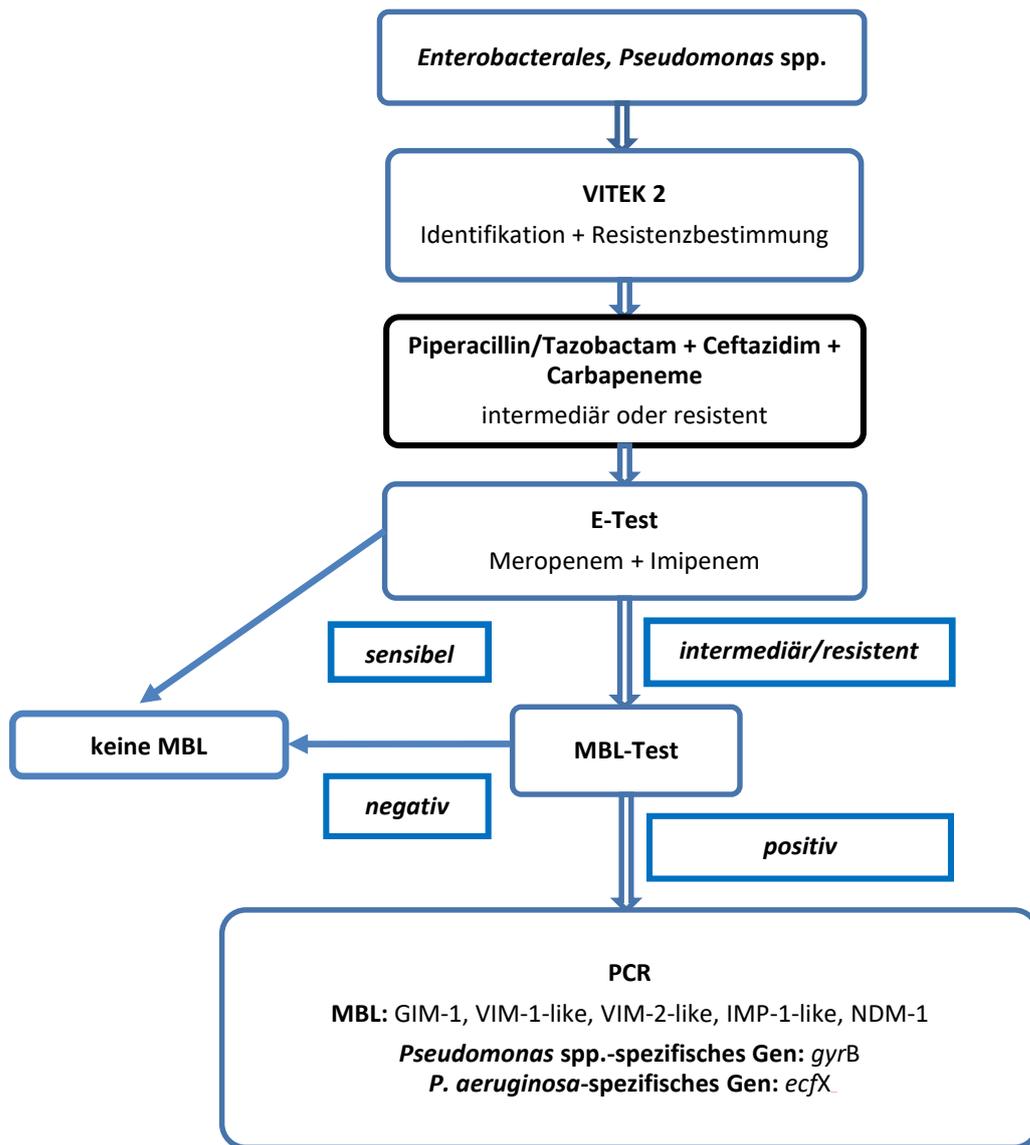
Abb. 2: Übersicht über die Methoden

### 2.2.1 Klinische Isolate

#### 2.2.1.1 Detektion von GIM-1 am Universitätsklinikum Düsseldorf

Aus dem Patientenmaterial des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) wurden im Zeitraum von 2007 bis 2012 das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragende klinische Isolate gesammelt. Zwischen 2002 und 2007 erfolgte keine systematische Asservierung von multiresistenten Keimen.

Die systematische Erfassung von Carbapenemase-produzierenden gramnegativen Erregern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene wurde 2009 eingeführt und fand nach folgendem Algorithmus statt:



**Abb. 3: Algorithmus zur Detektion von Carbapenemase-produzierenden gramnegativen Erregern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des UKD**

Alle aus dem Patientenmaterial des Universitätsklinikums Düsseldorf isolierten Keime (*Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. sowie *Acinetobacter* spp.) wurden durch das VITEK-2-System identifiziert. Anschließend wurde eine Resistenzbestimmung durchgeführt. Bei Keimen, die Resistenzen oder intermediäres Ansprechen auf Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidim sowie Carbapeneme zeigten, erfolgte im nächsten Schritt ein E-Test auf die Carbapeneme Imipenem und Meropenem. Bei Nachweis von Resistenzen oder intermediärer Sensitivität wurde daraufhin ein MBL-Test mittels MHK-Teststreifen (Liofilchem, Roseto degli Abuzzi, Italien) durchgeführt. Sofern die Keime im MBL-Test Resistenzen aufwiesen, fand im nächsten Schritt eine Real-Time-PCR zur Detektion der verschiedenen Metallo- $\beta$ -Laktamasen statt. Zusätzlich erfolgte die Real-Time-PCR zur Bestätigung der Keimspeziesidentifikation von *Pseudomonas* spp. durch den Nachweis des *Pseudomonas* spp.-spezifischen Gens *gyrB* und des *P. aeruginosa*-spezifischen Gens *ecfX*.

Bei einem weiterhin bestehenden Verdacht auf das Vorhandensein einer Carbapenemase trotz negativem PCR-Ergebnis wurden die betroffenen Isolate an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Ruhr-Universität Bochum übergeben. Dort wurden weitere Untersuchungen zur Detektion von Carbapenemasen vorgenommen.

Insgesamt sind durch den oben beschriebenen Algorithmus im o. g. Zeitraum 52 klinische Isolate als Träger der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 identifiziert worden. Hierzu zählen 34 *P. aeruginosa*-, sechs *P. putida*-, sieben *E. cloacae*- und zwei *S. marcescens*-Isolate sowie jeweils ein *E. coli*-, ein *K. oxytoca*- und ein *Citrobacter freundii*-Isolat. Alle klinischen GIM-1-Isolate wurden in Glycerinstocks überführt zur Aufbewahrung auf Mikrobank bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Das in der Publikation von Castanheira et al. erwähnte *P. aeruginosa*-Isolat 73-5671 (34) wurde in diese Arbeit einbezogen und wird unter der Arbeitsnummer M0 geführt. Dieses und die anderen in dieser Publikation erwähnten Erstisolate aus dem Jahr 2002 (*P. aeruginosa*-Isolate 73-12198, 73-15553, 73-15574) wurden freundlicherweise von Mark Toleman (Institute of Infection and Immunity, University of Cardiff, UK) zur Verfügung gestellt.

Die das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden klinischen Isolate wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene genotypisch voruntersucht. Zu diesen Voruntersuchungen gehörten der Verdau mit den Restriktionsenzymen (*SpeI* und *XbaI*) und die Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Das Ergebnis der Genotypisierung erbrachte für jede Keimspezies mehrere genotypisch verwandte PFGE-Typ-Cluster. Stellvertretend für jedes dieser Cluster wurde im Rahmen dieser Arbeit mindestens ein Isolat ausgewählt, welches der Resistenzbestimmung sowie den Konjugationsexperimenten unterzogen wurde.

## **2.2.1.2 Resistenzbestimmung durch E-Test**

### **2.2.1.2.1 Durchführung**

Die *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven klinischen Isolate wurden auf folgende Antibiotika getestet:

- Piperacillin/Tazobactam
- Ceftazidim, Cefepim
- Imipenem, Meropenem
- Ciprofloxacin
- Gentamicin
- Aztereonam
- Colistin

Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Glycerinstocks aufbewahrten GIM-1-positiven Keime wurden zur Selektion von Carbapenem-resistenten Kolonien auf Meropenem-haltigem MacConkey-Agar (Meropenem-Konzentration  $0,5\text{ g/L}$ ) ausgeimpft. Zur Prüfung der Reinheit der Bakterienkultur wurden die Keime zusätzlich auf antibiotikafreiem MacConkey-Agar ausgestrichen und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Vom antibiotikahaltigen Agar wurde eine Subkultur auf antibiotikafreiem MacConkey-Agar angelegt und diese über Nacht inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden zwei bis drei morphologisch gleiche Einzelkolonien mit  $6\text{ ml}$  physiologischer NaCl-Lösung durchmischt, und mithilfe eines Densitometers wurde eine optische Dichte von  $0,5$  nach McFarland eingestellt. Die Suspension wurde anschließend auf Müller-Hinton-Agarplatten verteilt, und der Überstand wurde entfernt. Die Agarplatten wurden für  $15\text{ Minuten}$  bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen. Anschließend wurden die E-Teststreifen auf die jeweiligen Müller-Hinton-Agarplatten platziert. Die Platten wurden weitere  $15\text{ bis }20\text{ Minuten}$  beiseitegestellt, um dem Antibiotikum eine Vordiffusion in den Agar zu ermöglichen. Danach wurden die Agarplatten  $16\text{ bis }18\text{ Stunden}$  bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aerob inkubiert.

#### **2.2.1.2.2 Ablesen der Platten und Auswertung**

Nach der Inkubation sollten die Platten einen gleichmäßigen Bakterienrasen sowie einen elliptischen Hemmhof aufweisen. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde an der Stelle der Skala abgelesen, an der der Bakterienrasen den Teststreifen berührte.

Die MHK entspricht der Antibiotikakonzentration, bei der ein sichtbares Keimwachstum verhindert wird. Sie wird in Mikrogramm pro Milliliter ( $\mu\text{g/ml}$ ) und in  $\log_2$ -Schritten angegeben. Die dokumentierten Werte wurden nach den standardisierten Messwerten (*clinical breakpoints*) von EUCAST Version 3.1 des Jahres 2013 interpretiert (56).

Die Qualitätskontrolle der E-Teststreifen mit Referenzstämmen nach EUCAST erfolgte nach Herstellerangaben durch das Institut.

### 2.2.1.3 Konjugationsexperimente

#### 2.2.1.3.1 Ziel

Die Konjugationsexperimente dienen dem *In-vitro*-Nachweis des horizontalen Gentransfers von *bla*<sub>GIM-1</sub> und dadurch dem Nachweis, dass sich das Gen auf einem Plasmid befindet.

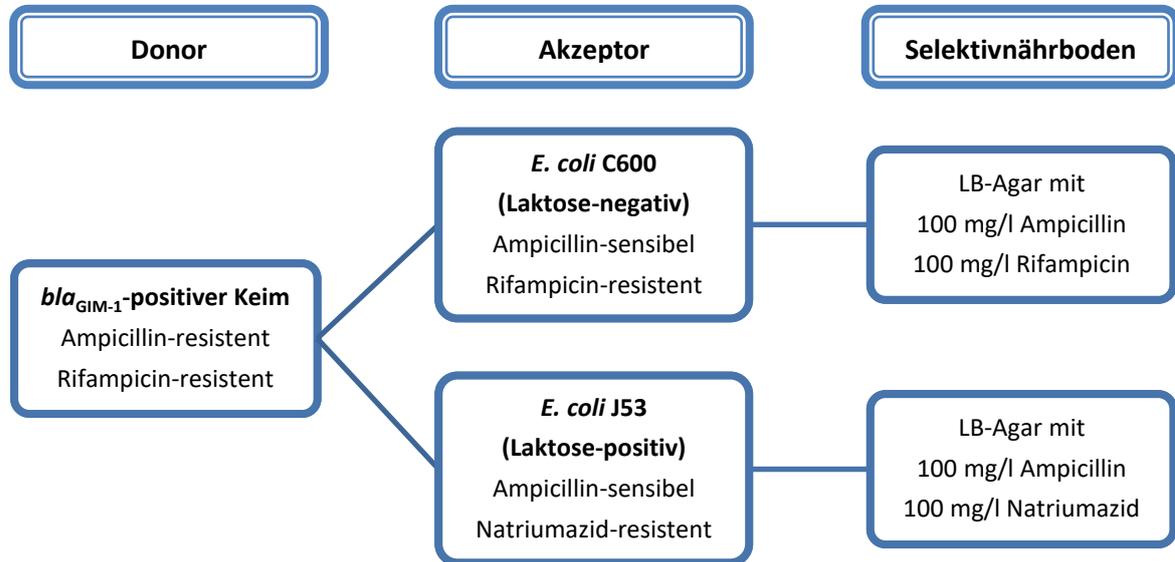


Abb. 4: Übersicht über die Konjugationsexperimente

#### 2.2.1.3.2 Durchführung

1. Tag: Für die Konjugation wurden die *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Keime, der jeweilige Akzeptorkeim (*E. coli* C600 oder J53) und die Positivkontrolle (*K. pneumoniae* NRZ 100) aus den Glycerinstocks auf dem MacConkey- und COS-Agar ausgeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2. Tag: Von den bebrüteten Agarplatten wurden Einzelkolonien isoliert, die erneut auf MacConkey-Agar ausgestrichen wurden. Mithilfe der MacConkey-Platten wurde die Reinheit der Bakterienkultur überprüft. Zusätzlich wurden die Donatoren, der Akzeptor und die Positivkontrolle auf antibiotikahaltigen Selektivnährmedien isoliert. Dieser Schritt diente der Überprüfung der Selektivnährböden, die ohne vorangegangene Konjugation das Wachstum der *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Keime, des Akzeptorkeims und der Positivkontrolle unterdrücken sollen. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und auf Wachstum bzw. die Selektivnährböden auf die Abwesenheit von Wachstum am folgenden Tag kontrolliert. Die für die Konjugation verwendeten Selektivnährböden sind der Abb. 4 zu entnehmen. Die Konzentration von Ampicillin, Rifampicin und Natriumazid im jeweiligen LB-Agar betrug jeweils 0,1 g/L.

3. Tag: Im nächsten Schritt wurden zwei bis drei Bakterienkolonien der Reinkulturen in 20 ml LB-Medium inokuliert und drei Stunden in Schüttelkultur bei 37 °C inkubiert.

Für die Konjugation wurde ein 1:10-Zelldichteverhältnis von Akzeptor- bzw. Donorkeim hergestellt, indem der jeweilige Donorkeim auf eine optische Dichte von 0,5–0,6 [ $\sim 1,5 \times 10^8$  CFU/ml] und der Akzeptorkeim auf 0,25–0,3 [ $\sim 7,5 \times 10^7$  CFU/ml] nach McFarland eingestellt wurde (57). Anschließend wurden jeweils 3 ml von der Donor- und Akzeptorsuspension zusammengegeben und für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt, die Pellets wurden in 300  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l auf drei COS-Agarplatten fleckförmig aufgetragen, und diese wurden dann bei Raumtemperatur (18 °C), 30 °C oder 37 °C 18 Stunden lang inkubiert.

4. Tag: Das komplette Koloniematerial wurde mit einem sterilen Tupfer vom Agar abgenommen, in 10 ml physiologische NaCl-Lösung eingerieben und durchgemischt. Anschließend wurde in einer Mikrotiterplatte eine 1:10-Verdünnungsreihe aus physiologischer NaCl-Lösung und der Keimsuspension hergestellt. Von den Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  wurden jeweils 90  $\mu$ l gleichmäßig auf die Selektivnährböden (entsprechend Abb. 4) verteilt, und die Nährböden wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6. Tag: Von den bewachsenen Selektivnährböden wurden Einzelkolonien erneut auf die Selektivnährböden isoliert. Dieser Schritt diente zur Überprüfung der Stabilität der vom Transkonjuganten erworbenen Resistenz. Zusätzlich wurde eine Isolation auf MacConkey-Agar vorgenommen, um den Keim morphologisch identifizieren zu können. Nicht bewachsene Selektivnährböden wurden weitere 24 Stunden inkubiert.

### **2.2.1.3.3 Auswertung**

Mithilfe des Wachstums auf dem MacConkey-Agar konnte anhand der speziesunterschiedlichen Koloniemorphologien eine Erstidentifizierung des Keims erfolgen.

Die Konjugation des Donorkeims *E. coli* M17 mit dem zweiten Akzeptorkeim *E. coli* J53 wurde nicht durchgeführt, da beide Keime Laktose-positiv und morphologisch nicht zu unterscheiden sind.

Eine weitere Keimdifferenzierung resultierte aus zusätzlichen biochemischen Untersuchungen. Der Indol-Test diente zur Abgrenzung des *E. coli* vom *E. cloacae* und der Oxidase-Test zur Identifikation von *Pseudomonas* spp.. Der Indol-Test ist eine qualitative Testmethode zum Nachweis des Enzyms Tryptophanase in Bakterien, wie z. B. *E. coli*, die in der Lage sind die Aminosäure Tryptophan zu Indol umzusetzen. Bei einem positiven Testergebnis verfärbt sich die auf den Teststreifen aufgetragene Kolonienmenge rosa, bei negativem Testergebnis bleibt die aufgetragene Kolonienmenge gelb.

Der Oxidase-Test dient dem Nachweis der bakteriellen Cytochromoxidase, die u. a. in *Pseudomonas* spp. vorkommt. Ein positives Testergebnis, d. h. blaue Verfärbung des Teststreifens, deutet auf einen

*Pseudomonas* spp. hin; sowohl *E. coli* als auch *E. cloacae* sind Oxidase-negativ. Zur Keimidentifikation wurden neben der Beurteilung der Koloniemorphologie und der o. g. Zusatztests ebenso das VITEK-2-System und der MALDI-TOF-MS herangezogen.

Zur molekularbiologischen Bestätigung des horizontalen Gentransfers wurde die DNA des transkonjugierten *E. coli* durch den EZ1 BioRobot aufgereinigt, und eine Real-Time-PCR wurde zur Detektion des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens durchgeführt.

#### **2.2.1.3.4 Positivkontrollen**

Als Positivkontrollen wurden die *bla*<sub>OXA-48</sub>-tragende *K. pneumoniae* (NRZ 100) sowie der *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragende *E. cloacae* (NRZ 614/2) verwendet. Bei jedem dieser Isolate ist das entsprechende Gen auf einem Plasmid lokalisiert. Jeweils eine Konjugation dieser Keime mit den jeweiligen Akzeptoren (*E. coli* C600 und *E. coli* J53) erfolgte zum Nachweis, dass die experimentellen Bedingungen zur Konjugation führen können. Die *K. pneumoniae* (NRZ 100) wurde bei jedem Konjugationslauf als Positivkontrolle mitgeführt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Übertragbarkeit des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens im Rahmen des Versuchsablaufs wurde der *E. cloacae* (NRZ 614/2) einmalig konjugiert. Die erfolgreiche Genübertragung wurde nach der Aufreinigung über den EZ1 BioRobot und der anschließenden Real-Time-PCR zur Detektion des entsprechenden Gens (*bla*<sub>GIM-1</sub> bei NRZ 614/2 und *bla*<sub>OXA-48</sub> bei NRZ 100) überprüft und bestätigt.

Die Positivkontrollen und die beiden Akzeptorkeime wurden freundlicherweise vom Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

#### **2.2.1.3.5 DNA-Aufreinigung**

Von der Bakterienkultur wurden ein bis zwei Einzelkolonien in einen 500 µl PBS-Puffer überführt. 200 µl dieser Bakteriensuspension wurden nach Herstellerangaben in den EZ1 BioRobot eingesetzt, und 100 µl aufgereinigter bakterieller DNA wurde eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert oder unmittelbar in die Real-Time-PCR eingesetzt.

**Tab. 1: Ansatz für die Real-Time-PCR**

	10-facher Ansatz (in µl)
2x Mastermix	125
Forward Primer (100 µM)	0,375
Reverse Primer (100 µM)	0,375
Sonde (100 µM)	0,25
Aqua dest.	74

Pro Well wurden 20 µl vom Ansatz und 5 µl der DNA zusammen pipettiert, sodass das Gesamtreaktionsvolumen 25 µl betrug.

Als Positivkontrolle der *bla*<sub>GIM-1</sub>-Real-Time-PCR wurde der *bla*<sub>GIM-1</sub>-positive *P. aeruginosa* M4 benutzt, bei dem das Resistenzgen im Vorfeld sequenziert worden war. Für die *bla*<sub>OXA-48</sub>-Real-Time-PCR kam die *K. pneumoniae* NRZ 100 zum Einsatz. Für die Negativkontrolle wurde keine DNA zum Ansatz dazu pipettiert.

**Tab. 2: Einzelschritte im PCR-Programm**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	50 °C	10 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	10 Minuten
3. Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
4. Elongation	60 °C	1 Sekunde

Der 3. und 4. Schritt wurde 45-mal zyklisch wiederholt.

#### 2.2.1.3.6 RAPD-PCR

Die RAPD-PCR (auf Englisch: *Randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction*) stellt eine besondere Form der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar, bei der unbekannte und zufällige DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Mehrere kurze Primer kommen dabei zum Einsatz. In der anschließenden Pulsfeld-Gelelektrophorese ergeben sich Bandenmuster, sodass eine genetische Verwandtschaft von Bakterienisolaten festgestellt werden kann.

Diese Methode wurde im Anschluss an die Konjugationsexperimente von der Krankenhaushygiene-Abteilung des Instituts durchgeführt, um den *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven *E. coli*-Donorkeim zusätzlich zum Laktoseverhalten sicher zu identifizieren. Zudem wurde diese Methode mit dem Transkonjuganten, dem Akzeptorkeim *E. coli* C600 und dem Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 unternommen. Wies der Transkonjugant und der *E. coli* C600 das gleiche Bandenmuster auf, so war eine genetische

Verwandtschaft und damit die erfolgte Konjugation des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens vom Donorkeim in den Akzeptorkeim bestätigt.

#### **2.2.1.3.7 Resistenzbestimmung**

Der *E. coli* C600 und der transkonjugierte *E. coli* C600/M17 (T17) wurden auf Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem sowie Aztreonam getestet.

### **2.2.2 Umweltuntersuchungen**

#### **2.2.2.1 Ziel**

Die Umweltuntersuchung diente der Sammlung und Detektion von *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Keimen in der unmittelbaren klinischen Umgebung des Patienten sowie den Arbeitsräumen der betroffenen Krankenstation.

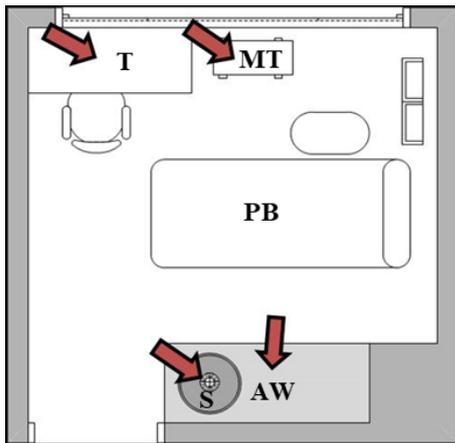
#### **2.2.2.2 Durchführung**

##### **2.2.2.2.1 Sammlung der Proben**

Die chirurgische Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf verfügt über 40 Einzelzimmer und ist in eine A- und eine B-Seite unterteilt. Die Sammlung der Umweltproben fand in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene einmalig jeweils 2012 und 2013 statt.

Während der Sammlung im Jahr 2012 wurden die Oberflächen (Schreibtisch, Medikamententisch) der 20 Zimmer der B-Seite der chirurgischen Intensivstation beprobt. In allen Einzelzimmern sowie den reinen und unreinen Arbeitsräumen wurden Umweltproben aus den Waschbeckensiphons entnommen (Abb. 5). Die unreinen Arbeitsräume werden von der Pflege u. a. für die Entsorgung des kontaminierten Patientenmaterials und für die Reinigung von Pflegeutensilien verwendet. Außerdem wurden Proben von zwei Haarwaschwannen gesammelt. Diese sind wiederverwendbar und werden im Rahmen der Patientenpflege für die Haarwäsche benutzt. Im Jahr 2013 wurden Proben aus Waschbeckensiphons und von den Ablageflächen der Waschbecken in allen Patientenzimmern entnommen. Die Probensammlung wurde morgens vor der Zimmerreinigung durchgeführt.

Abstriche wurden mit den eSwab<sup>TM</sup>-Tupfern entnommen, und das Material wurde im flüssigen Amies-Medium der Abstrichröhrchen transportiert. Bei glatten Oberflächen wurde der Tupfer zuvor mit 0,9%iger NaCl-Lösung angefeuchtet. Bei allen Oberflächen wurde mit dem Abstrichtupfer eine Fläche von 10 cm<sup>2</sup> erfasst. Bei der Probenentnahme aus den Waschbeckensiphons wurde der Abstrichtupfer 5 cm tief in den Waschbeckenabfluss eingeführt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Zimmereinrichtung**

Rote Pfeile markieren die Probenentnahmestellen. T, Tisch; MT, Medikamententisch; S, Siphon; AW, Ablagefläche am Waschbecken; PB, Patientenbett.

Parallel zur Probensammlung beaufsichtigten Hygienefachkräfte die Pflegemaßnahmen auf der Intensivstation in Bezug auf die Hygiene-Compliance.

#### 2.2.2.2.2 Screening-PCR aus dem Amies-Medium

Aus dem Amies-Medium der eSwab<sup>TM</sup>-Röhrchen mit dem dort enthaltenen Probenmaterial wurde in folgenden Schritten die DNA gewonnen: Die Abstrichröhrchen wurden mithilfe des Vortex-Geräts durchmischt, 200 µl des Amies-Mediums wurden in ein steriles 1,5-ml-Röhrchen überführt, und die Proben wurden zur Zelllyse für 10 Minuten in den Heizblock bei 95 °C gestellt. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl entnommen, aus denen dann eine 1:10-Verdünnung mit Tris/HCl-Puffer hergestellt wurde. Im letzten Schritt wurde das mit Tris/HCl-Puffer verdünnte DNA-Material einer Screening-PCR zugeführt. Der Rest des Amies-Mediums wurde bei +4 °C aufbewahrt.

Diese PCR diente der Detektion des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub> (40) sowie des *Pseudomonas* spp.-spezifischen Gens *gyrB* und des *P. aeruginosa*-spezifischen Gens *ecfX* (58). Bei jedem Lauf wurde zusätzlich auf universelle bakterielle DNA (Euba) getestet unabhängig von der Keimspezies in einer Probe. Dies wurde als Gütekontrolle der Probensammlung benutzt und diente dem Nachweis, dass im gesammelten Probenmaterial der Siphons tatsächlich bakterielle DNA vorhanden ist.

Zum PCR-Ansatz der Screening-PCR wurde als interne Qualitätskontrolle ein künstliches Plasmid mit passender Primer-Sonden-Kombination in 50 Kopien pro PCR-Ansatz eingesetzt. Dieses am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene hergestellte Plasmid besteht aus einer Sequenz von *Drosophila simulans*, die jeweils von beiden Seiten von einer *Bordetella*

*pertussis*-Sequenz umrahmt wird. Somit verfügt das Plasmid über Andockstellen für die *Bordetella pertussis*-Forward- und Reverse-Primer sowie über eine Andockstelle für die Sonde an der *Drosophila simulans*-Sequenz (59). In diesem PCR-Kanal sollte bei jedem PCR-Lauf ein positives Ergebnis entstehen. Ausnahmen hiervon stellt der Verbrauch von Nukleotiden im gleichen Well durch weitere Amplifikation der anderen Primer-Sonden-Kombinationen dar.

Zur Herstellung der PCR-Ansätze für die Screening- und Kultur-PCR wurde jeweils der gleiche Mastermix verwendet, wie zuvor in Kapitel 2.2.1.3.5 beschrieben (Tab. 1).

**Tab. 3: Ansatz für die Screening-PCR**

<u>Screening-PCR</u>	100-facher Ansatz (in µl)		
	<b>GIM und IK</b>	<b><i>gyrB</i> und <i>ecfX</i></b>	<b>Euba</b>
2x Mastermix	1250	1250	1250
Primer Forward (100 µM)	2x 3,75	2x 3,75	3,75
Primer Reverse (100 µM)	2x 3,75	2x 3,75	3,75
Sonde (100 µM)	2,5	2x 2,5	2,5
Aqua dest.	620	730	740
IK	100		-
IK-Sonde (50 µM)	10		-

IK, interne Kontrolle; GIM, German Imipenemase; *gyrB*, *Pseudomonas* spp.-spezifisches Gen, *ecfX*, *P. aeruginosa*-spezifisches Gen; Euba, universelle bakterielle DNA.

**Tab. 4: Übersicht über den Ansatz der Screening-PCR mit zugefügtem DNA-Material**

<u>Screening-PCR</u>		
<b>PCR-Ansatz + DNA-Probe</b>		
1. Well-Reihe	2. Well-Reihe	3. Well-Reihe
GIM, IK + Positivkontrolle	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Positivkontrolle	Euba + Positivkontrolle
GIM, IK + Negativkontrolle	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Negativkontrolle	Euba + Negativkontrolle
GIM, IK + Probe 1	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Probe 1	Euba + Probe 1
GIM, IK + Probe 2	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Probe 2	Euba + Probe 2

IK, interne Kontrolle; GIM, German Imipenemase; *gyrB*, *Pseudomonas* spp.-spezifisches Gen, *ecfX*, *P. aeruginosa*-spezifisches Gen; Euba, universelle bakterielle DNA.

Für alle in diesem Kapitel erwähnten Real-Time-PCR gelten folgende Anmerkungen:

Als Positivkontrolle wurde die DNA eines bekannten *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven klinischen Isolats (*P. aeruginosa* M4) verwendet, im Gegensatz dazu wurde für die Negativkontrolle lediglich Aqua dest. hinzugegeben. Pro Well wurden 20 µl vom PCR-Ansatz und 5 µl der Template-DNA zugefügt, sodass das Gesamtvolumen 25 µl betrug. Ein identisches PCR-Programm wurde verwendet wie zuvor in Kapitel 2.2.1.3.5 (Tab. 2).

### 2.2.2.2.3 Kultur-PCR

Der Inhalt der Abstrichröhrchen wurde jeweils auf MacConkey- sowie antibiotikahaltigen Blutagarplatten (mit 5 mg/L Meropenem und 5 mg/L Vancomycin) inokuliert. Ebenfalls wurden herkömmliches sowie 32 mg/L Imipenem-haltiges flüssiges BHI-Medium beimpft. Die Agarplatten und die BHI-Medien wurden maximal 48 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension von den antibiotikahaltigen BHI-Medien jeweils auf einen MacConkey-Agar inokuliert. Diese und die zuvor mit dem Amies-Medium beimpften Agarplatten wurden nach der Inkubation auf Wachstum kontrolliert. Bei unzureichendem Wachstum wurden die Agarplatten weitere 24 Stunden bebrütet. Danach wurde von diesen Platten (d. h. vom antibiotikahaltigen Blutagar und vom mit BHI-Medium beimpften MacConkey-Agar) jede morphologisch eindeutige Kolonie auf jeweils einer MacConkey-Platte isoliert, diese Platten wurden anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von den Reinkulturen wurde im nächsten Schritt Koloniematerial entnommen, die bakterielle DNA wurde via EZ1 Biorobot aufbereitet und der Real-Time-PCR zugeführt. Diese Kultur-PCR diente der Detektion des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub> sowie der Identifikation der *P. aeruginosa*-Isolate mittels Untersuchung auf das *Pseudomonas* spp.-spezifische Gen *gyrB* und das *P. aeruginosa*-spezifische Gen *ecfX*.

**Tab. 5: Ansatz für die Kultur-PCR**

<b>Kultur-PCR</b>	100-facher Ansatz (in µl)	
	<b>GIM</b>	<b><i>gyrB</i> und <i>ecfX</i></b>
2x Mastermix	1250	1250
Primer Forward (100 µM)	3,75	2x 3,75
Primer Reverse (100 µM)	3,75	2x 3,75
Sonde (100 µM)	2,5	2x 2,5
Aqua dest.	740	730

GIM, German Imipenemase; *gyrB*, *Pseudomonas* spp.-spezifisches Gen, *ecfX*, *P. aeruginosa*-spezifisches Gen.

**Tab. 6: Übersicht über den Ansatz der Kultur-PCR mit zugefügtem DNA-Material**

<b>Kultur-PCR</b>	
<b>Ansätze + DNA-Probe</b>	
1. Well-Reihe	2. Well-Reihe
GIM + Positivkontrolle	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Positivkontrolle
GIM + Negativkontrolle	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Negativkontrolle
GIM + Probe 1	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Probe 1
GIM + Probe 2	<i>gyrB</i> , <i>ecfX</i> + Probe 2

GIM, German Imipenemase; *gyrB*, *Pseudomonas* spp.-spezifisches Gen, *ecfX*, *P. aeruginosa*-spezifisches Gen.

#### **2.2.2.2.4 Auswertung**

Die Proben wurden bei einer Zyklusanzahl von  $\leq 35$  als eindeutig positiv bewertet. Bei einer Zyklusanzahl bis 40 wurde die Probe ebenfalls als positiv gewertet.

Sollte trotz einer hochpositiv ausgefallenen Screening-PCR in der nachfolgenden Kultur-PCR kein *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen detektiert worden sein, wurde eine erneute Ausimpfung aus dem Amies-Medium vorgenommen, und der o. g. Ablauf wurde wiederholt.

Bei positiven Ergebnissen für das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen, das *Pseudomonas* spp.-spezifische Gen *gyrB* und das *P. aeruginosa*-spezifische Gen *ecfX* wurde der Keim eindeutig als *P. aeruginosa* identifiziert. Im nächsten Schritt wurde eine Resistenzbestimmung durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die in der Kultur-PCR negativ auf das *Pseudomonas* spp.-spezifische Gen *gyrB* und das *P. aeruginosa*-spezifische Gen *ecfX* getesteten, jedoch als *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiv detektierten Keime wurden im nächsten Schritt mittels VITEK 2 und MALDI-TOF-MS eindeutig identifiziert.

Bei widersprüchlichen Ergebnissen in der Kultur-PCR-, der VITEK-2- oder MALDI-Diagnostik wurden durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe weitere PCR-Untersuchungen auf bestimmte Gene bzw. Gensequenzierungen durchgeführt: So war im Falle des Isolats 1564-2 die Kultur-PCR *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiv, jedoch fiel es negativ bezüglich der *P. aeruginosa*-spezifischen Gene aus. MALDI ordnete den Keim als *A. baumannii* ein, die Gensequenzierung mittels 16S rRNA identifizierte den Keim als *Acinetobacter* spp. Erst die weiterführende Sequenzierung mithilfe von *bla*<sub>OXA-228</sub> ermöglichte die endgültige Differenzierung als *A. bereziniae* (41, 60).

Im Falle des Isolats 1456-7 war die Kultur-PCR *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiv sowie positiv auf das *ecfX*-Gen, jedoch negativ auf das *gyrB*-Gen. MALDI identifizierte das Isolat dennoch als ein *P. aeruginosa*. Die 16S rRNA-Diagnostik ergab jedoch die richtige Identifizierung als *P. nitroreducens*.

Alle positiv auf das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen getesteten Isolate wurden zur Aufbewahrung bei  $-80\text{ °C}$  auf Mikrobank in Glycerinstocks überführt.

### 2.2.2.3 Genotypisierung

#### 2.2.2.3.1 Das Prinzip der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine etablierte und gute Standardmethode zur Genotypisierung bakterieller Stämme und ermöglicht die Feststellung des Verwandtschaftsgrades zwischen mehreren Bakterienstämmen bei epidemiologischen Fragestellungen.

Die PFGE ist in der Lage größere DNA-Stücke (bis zu 30 kb) aufzutrennen. Das in dieser Arbeit verwendete CHEF DR III-System bewerkstelligt mit 24 Elektroden die Auftrennung von DNA-Stücken in der Größenordnung von 100 bp bis 10 Mb. Die PFGE unterscheidet sich von einer herkömmlichen Gelelektrophorese dadurch, dass durch den Einsatz mehrerer Elektroden anstelle von zwei ein periodisch wechselndes elektrisches Stromfeld erzeugt wird. Die DNA-Stücke bewegen sich darin mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und unter ständigem Richtungswechsel fort. Der Richtungswechsel des Stromfeldes erfolgt zu bestimmten Zeiten (sog. *switch time*). Da die langen DNA-Moleküle mehr Zeit zur Neuausrichtung im elektrischen Feld benötigen, wandern diese langsamer als die kürzeren. Auf diese Art und Weise wird bei der PFGE eine höhere Auflösung als bei einer herkömmlichen Gelelektrophorese erreicht (61).

#### 2.2.2.3.2 Ziel

Ziel der Genotypisierung war festzustellen, inwiefern die Umweltisolate untereinander eine Klonalität aufwiesen und eine Verwandtschaft der Umweltisolate mit den gesammelten klinischen Isolaten bestand. Von Interesse war insbesondere die Frage, ob ein Bezug der *P. aeruginosa*-Umweltisolate zum klinischen *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamm M0 hergestellt werden konnte.

Um die Lokalisation des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub> in Umweltisolaten und die Plasmidgröße zu bestimmen, erfolgten weitere Untersuchungen. Hierzu ging der PFGE der DNA-Verdau mit der S1-Nuklease voraus. Anschließend wurde eine In-Gel-Hybridisierung, sowie Markierung des Gels mit einer radioaktiven <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde durchgeführt (Arbeiten mit radioaktiver <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde erfolgten freundlicherweise durch Dr. med. A. F. Wendel und B. Lamik am Institut).

Als Referenzstämme wurden für jede Bakterienspezies Isolate benutzt, die keine *bla*<sub>GIM-1</sub>-Träger waren und in keinem epidemiologischen Zusammenhang mit den untersuchten Isolaten standen. Dies waren überwiegend ATCC-Stämme und andere Stämme aus der klinischen Diagnostik des Instituts. Zusätzlich wurde aus der Gruppe der klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-Träger aus jedem genetischen PFGE-Typ-Cluster einer Keimspezies stellvertretend ein klinisches Isolat ausgewählt. Dieses wurde ebenfalls genotypisiert, um anschließend einen Vergleich mit den Umweltisolaten zu ermöglichen.

### **2.2.2.3.3 Durchführung der PFGE**

#### **2.2.2.3.3.1 Vorbereitung der DNA**

Vor der Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese muss die bakterielle DNA entsprechend vorbereitet werden. Die langen DNA-Stücke sind empfindlich gegenüber Scherkräften, sodass Strangbrüche sowie Zersetzung der DNA resultieren können, z. B. beim Pipettieren. Um dies zu verhindern, wird die Bakterienkultur in Agarose-Gelblöckchen eingebettet, und die DNA wird anschließend in den Gelblöckchen extrahiert (61). Nach der DNA-Extraktion wird diese als Nächstes mit Restriktionsenzymen verdaut. Das Restriktionsenzym *BcuI* (*SpeI*) erkennt die A|CTAGT- und *XbaI* die T|CTAGA-Sequenz der bakteriellen chromosomalen DNA. Beide Sequenzen kommen selten vor, daher wird die DNA in längere Stücke zerlegt. Im Vergleich dazu ist die S1-Nuklease in der Lage, Einzelstrang-DNA oder -RNA zu degradieren, sodass 5'-Mono- oder Oligonukleotide entstehen. In hoher Enzymkonzentration und in Lösung mit geringer Salzkonzentration verursacht die S1-Nuklease Brüche in der Doppelstrang-DNA sowie -RNA (62). Dies ist von Vorteil, um ringförmige, in dicht spiralisierte (sog. *supercoiled*) Form vorliegende Plasmide in eine lineare Form zu überführen. Dadurch kann in anschließender PFGE die Größe der Plasmide bestimmt werden (63).

#### **2.2.2.3.3.2 Kultivierung der Isolate**

1. Tag: Die zu untersuchenden Isolate wurden aus den Glycerinstocks jeweils auf einen herkömmlichen MacConkey-Nährboden und auf einen Meropenem-haltigen (0,5 mg/L) MacConkey-Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2. Tag: Das Wachstum auf den Platten wurde auf Reinheit überprüft. Von den Meropenem-haltigen MacConkey-Agarplatten wurde jeweils eine Einzelkolonie pro morphologisch erkennbare Keimspezies auf einen herkömmlichen MacConkey-Agar isoliert, und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

#### **2.2.2.3.3.3 Vorbehandlung der bakteriellen DNA mit Lysozym**

3. Tag: Von den bewachsenen MacConkey-Nährböden wurden jeweils eine bis drei Einzelkolonien in 350 µl einer sterilen physiologischen NaCl-Lösung resuspendiert und 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen, das Pellet wurde in 350 µl NaCl-Lösung resuspendiert und durchmischt. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym wurde die Keimsuspension für fünf Minuten bei 50 °C in den Heizblock gestellt, um die Auflösung bakterieller Zellwandbestandteile aus Polysacchariden zu erreichen.

#### **2.2.2.3.3.4 Herstellung der Gelblöckchen**

Zunächst erfolgte die Herstellung von 2%iger Agarose, die im Warmbad bei 50 °C warm gehalten wurde. Jede im letzten Schritt mit Lysozym vorbehandelte Keimsuspension wurde mit 400 µl warmer Agarose gemischt, und die Suspension wurde blasenfrei in fünf Gelformen gefüllt. Nach 15-minütigem Trocknen bei Raumtemperatur wurden alle fünf Gelblöckchen einer Probe gemeinsam in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben, und jedes Well wurde mit 2 ml Lysis-Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 80 µl Lysozym wurde der Inhalt mit einer Öse verrührt, und die Platte wurde 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Entfernung des Lysis-Puffers wurden die Gelblöckchen mit 2 ml 1x TE-Puffer gewaschen und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Lysis-Puffer mit der Pipette abgenommen, und die Wells wurden mit jeweils 1 ml Proteolyse-Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K zur Auflösung von zellulären Bestandteilen wurden die Gelblöckchen 18 Stunden bei 50 °C inkubiert.

4. Tag: Die Gele wurden fünf Mal mit 2 ml 1x TE-Puffer gewaschen und nach jedem Waschgang für 30 Minuten bei +4 °C inkubiert. Anschließend wurde je nach Fragestellung der Verdau von bakterieller DNA mit Restriktionsenzymen oder der S1-Nuklease durchgeführt. Grundsätzlich ist es jedoch an dieser Stelle möglich, die Gele im TE-Puffer für drei bis sechs Monate im Kühlschrank bei +4 °C aufzubewahren.

#### **2.2.2.3.3.5 Verdau mit Restriktionsenzymen *BcuI* (*SpeI*) oder *XbaI***

Die Gele wurden mit einem Skalpell geviertelt, und das jeweilige zugeschnittene Gelviertel wurde in ein Well einer 48-Well-Platte gegeben. Die Viertelstücke wurden mit 500 µl 1/10 TE-Puffer gewaschen und 30 Minuten bei 37 °C auf einer Wippe inkubiert.

Anschließend wurden folgende Waschschriffe durchgeführt: zweimaliges Waschen mit 300 µl 2x Tango-Puffer und Ruhigstellen der Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur, dann einmaliges Waschen mit 300 µl 1x Tango-Puffer. Die Platte wurde einmal geschwenkt, der Puffer wurde mithilfe einer Pipette abgenommen, und erneut wurden 300 µl 1x Tango-Puffer dazugegeben.

Die DNA von *Pseudomonas* spp. wurde mit *BcuI* (*SpeI*) behandelt, während die von *Enterobacteriales* und *S. maltophilia* mit *XbaI* behandelt wurde. Dementsprechend wurde entweder 3 µl *BcuI*(*SpeI*)-Enzym (30 Units) oder 2 µl *XbaI*-Enzym (20 Units) hinzugefügt, und der Inhalt wurde mit einer Öse verrührt. Anschließend wurden die Gelstückchen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.2.3.3.6 Verdau mit S1-Nuklease**

Hierzu wurden die Gele halbiert, die zugeschnittenen Gelstücke wurden mit 500 µl 1/10 TE-Puffer gewaschen und 30 Minuten bei 37 °C auf einer Wippe inkubiert. Danach wurden folgende Waschschriffe durchgeführt: zweimaliges Waschen mit 500 µl 2x S1-Puffer und Ruhigstellen der

Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend einmaliges Waschen mit 500 µl 1x S1-Puffer. Daraufhin wurde die Platte einmal geschwenkt, der Puffer wurde abgenommen, und erneut wurden 500 µl 1x S1-Puffer zusammen mit 4 µl S1-Nuklease (0,4 Units) pro Well dazugegeben. Der Inhalt wurde mit einer Öse verrührt, und die Gelblöckchen wurden für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.2.3.3.7 Vorbereitung des PFGE-Laufs**

Zur Herstellung des 1%igen Gels wurde die Agarose in 0,5x TBE-Puffer gelöst und in die Gelform gegossen. Nach 15-minütigem Trocknen wurde das Gel (nach S1- oder Restriktionsverdau) mit den Gelblöckchen sowie dem Lambda Ladder PFGE-Marker beladen und in die Elektrophoresekammer des PFGE-Geräts gestellt.

Die Elektrophoresekammer wurde mit 2,5 l 0,5x TBE-Puffer gefüllt, und 2,5 ml Thiourea-Lösung (1 ml/L) wurden hinzugefügt. Thiourea inaktiviert zum einen freie DNasen, zum anderen neutralisiert sie als Reduktionsmittel Oxidantien, die sich während des PFGE-Laufs im Tris-Puffer bilden. Durch die Anwendung von Thiourea wird das Verschmieren der DNA-Banden vermieden, und somit wird eine bessere Sichtbarkeit der DNA-Banden erreicht (64–66).

Am PFGE-Gerät wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

- Run time: 22 h
- Initial switch time: 5 s
- Final switch time: 45 s
- Voltage gradient: 6 V/cm
- Angle: 120°

Unmittelbar nach dem Gellauf wurde das Gel 15 Minuten lang in Ethidiumbromidlösung (175 µl Ethidiumbromid in 1000 ml Aqua dest.) gefärbt und anschließend für 15 Minuten in Aqua dest. entfärbt. Das Bandenmuster wurde mithilfe des Gel Doc XR plus Imaging Systems unter UV-Licht (260–320 nm) sichtbar gemacht, als Bilddatei abgespeichert und dokumentiert.

#### **2.2.2.3.3.8 Auswertung**

Nach Behandlung mit Restriktionsenzymen *BcuI* (*SpeI*) oder *XbaI*

Die Bandenmuster der mittels PFGE untersuchten Umweltisolate wurden untereinander und mit dem Bandenmuster des klinischen Isolats der jeweiligen Keimspezies verglichen. Die Interpretation der Bandenmuster erfolgte im ersten Schritt visuell in Anlehnung an Kriterien, die in der Publikation von F. C. Tenover (67) aufgestellt worden waren: Weist das untersuchte Isolat ein mit dem Bezugsstamm identisches Bandenmuster auf, so wird eine Verwandtschaft des Isolats angenommen.

Bei einem Unterschied von zwei bis drei Banden wird das Isolat als „nah verwandt“ eingestuft. Wenn das Bandenmuster jedoch einen Unterschied von mehr als vier Banden zeigt und somit weniger als 50 % der Banden identisch sind, wird eine Verwandtschaft ausgeschlossen. Die grafische Darstellung der unterschiedlichen Verwandtschaftscluster wurde mithilfe der Software GelCompar II (Version 5.1.0., Firma Applied Maths, Belgien) erstellt, hierbei wurde eine Positionstoleranz von 1 % und ein Optimierungsgrad von 2 % eingestellt. Bei einem Übereinstimmungsgrad der Bandenmuster der untersuchten Isolate von über 80 % wurde eine Klonalität der Isolate und damit ein Cluster definiert.

#### **2.2.2.4 In-Gel-Hybridisierung**

##### **2.2.2.4.1 Durchführung**

Die In-Gel-Hybridisierung wurde von Dr. med. A. F. Wendel und B. Lamik, wie von Wendel et al. beschrieben (40, 41), durchgeführt.

Das Gel wurde auf Filterpapier platziert und bei 50 °C über Nacht getrocknet. Danach wurde es für 30 Minuten in eine Denaturierungslösung und im nächsten Schritt für weitere 30 Minuten bei +4 °C in eine Neutralisationslösung gelegt. Anschließend wurde das Gel in eine Prehybridisierungslösung eingetaucht und im Hybridisierungssofen bei 65 °C über Nacht inkubiert.

Die Gele wurden mit einer <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde markiert und bei 65 °C inkubiert. Die Sonden wurden mit dem Prime-it II Random Primer Labelling Kit hergestellt. Als Template wurde das Amplifikat (jeweils 500 bp lang) der Primer R2 (39) sowie GIMR (34, 39) benutzt (s. Kapitel 2.1.2.3.4). Anschließend wurden die Gele mit 2x SSC/ 0.1 % (w/v) Natriumlaurylsulfatlösung und danach mit 0.1x SSC/0.1 % (w/v) Natriumlaurylsulfatlösung für jeweils 30 Minuten bei 65 °C gewaschen. Nach einer Lagerung des Gels zusammen mit Filmmaterial bei -80 °C über Nacht wurde der Film entwickelt, zuletzt wurde die Autoradiographie vorgenommen.

##### **2.2.2.4.2 Auswertung**

###### Nach Behandlung mit S1-Nuklease

Die <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde bindet an DNA-Stücke, die das Gen *bla*<sub>GIM-1</sub> tragen. Auf diese Weise werden nur bestimmte Banden sichtbar gemacht, die Größe dieser Banden entspricht der Plasmidgröße.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Isolate

Die ersten fünf *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven klinischen Isolate wurden 2002 aus dem Respirationstrakt der Patienten der chirurgischen Intensivstation isoliert und gehörten der *P. aeruginosa*-Spezies an. Darunter befand sich das *P. aeruginosa*-Isolat 73-5671, welches in dieser Arbeit als klinischer Ausbruchsstamm M0 bezeichnet wird. Genetische Untersuchungen bewiesen, dass es sich bei den untersuchten *P. aeruginosa*-Isolaten aus dem Jahr 2002 um Klone des Ausbruchsstamms M0 handelte (34). Im Zeitraum von 2007 bis 2012 wurde das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub> in weiteren klinischen Isolaten festgestellt. Diese wurden von der Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene genotypisiert. Die Genotypisierung umfasste den Verdau mit Restriktionsenzymen (*SpeI* und *XbaI*) und die anschließende Pulsfeld-Gelelektrophorese der *Pseudomonas* spp., *S. marcescens*- sowie *E. cloacae*-Isolate. Das Ergebnis der Genotypisierung lieferte für jede Keimspezies mehrere genotypisch verwandte PFGE-Typ-Cluster. Durch weitere Untersuchungen (Verdau mit S1-Nuklease und Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese mit anschließender In-Gel-Hybridisierung und Markierung der Gele mit einer <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde) wurden die Lokalisation von *bla*<sub>GIM-1</sub> u. a. auf Plasmiden und die Größe der Plasmide bestimmt. Diese Daten sind bereits veröffentlicht worden (39) und sind in der folgenden tabellarischen Übersicht (Tab. 7) aufgeführt. Die Auflistung ist nach Datum der Erstisolation sowie der Keimspezies geordnet.

Tab. 7: Übersicht über die genetischen Charakteristika der klinischen Isolate (39)<sup>2</sup>

Isolatnummer, M	Datum, Erstisolierung	Quelle	Station	PFGE- Typ	Gen- lokalisierung	Plasmidgröße (kb)	Konjugation- Erfolg C600 und J53
<i>Pseudomonas aeruginosa (PSA)</i>							
0	Jun. 02	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C (und P)	n. b.	negativ
19	Okt. 07	Wundabstrich	CN1	PSA-B	C		negativ
1	Dez. 07	Respirationstrakt	IIS2	PSA-C	C		negativ
2	Jan. 08	Stuhl	IN3	PSA-D	C		negativ
4	Apr. 08	Urin	IN2	PSA-A	C		negativ
3	Apr. 08	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
5	Jun. 08	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
7	Sep. 08	Respirationstrakt	IIS1	PSA-E	C		negativ
8	Sep. 08	Respirationstrakt	IIS1	PSA-A	C		
10	Okt. 08	Stuhl	IIS1	PSA-F	C		negativ
16	Feb. 10	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
25	Feb. 10	Urin	IN2	PSA-A	C		
28	Mai. 10	Urin	IA	PSA-G	n. b.	n. b.	negativ
29	Mai. 10	Respirationstrakt	CIS	PSA-H	C		negativ
45	Nov. 10	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
46	Dez. 10	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
47	Dez. 10	Urin	IN1	PSA-A	C		
48	Mrz. 11	Wundabstrich	CIS	PSA-A	C		
57	Apr. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
49	Mai. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
50	Jun. 11	Urin	CIS	PSA-A	C		
51	Jun. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
53	Jun. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
52	Jun. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
55	Jul. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
58	Sep. 11	Wundabstrich	CIS	PSA-A	C und P	25	negativ
63	Dez. 11	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
64	Jan. 12	Wundabstrich	CIS	PSA-A	C		
67	Mrz. 12	Wundabstrich	CIS	PSA-A	C		
68	Mrz. 12	Urin	IN1	PSA-A	C		negativ
69	Apr. 12	Wundabstrich	CIS	PSA-A	C		
70	Mai. 12	Respirationstrakt	CIS	PSA-A	C		
71	Mai. 12	Respirationstrakt	IN4	PSA-D	C		
72	Jun. 12	ZVK	IIS2	PSA-G	C		
<i>Pseudomonas putida (PUT)</i>							
18	Sep. 07	Urin	IN3	PUT-B	C		negativ
6	Sep. 08	Stuhl	IN3	PUT-A1	C		negativ
12	Dez. 08	Urin	IN3	PUT-A1	C		
37	Aug. 10	Urin	IN3	PUT-A2	C		negativ
38	Aug. 10	Urin	IN3	PUT-A2	C		negativ
76	Aug. 12	Urin	UN2	PUT-C	C		

<sup>2</sup>Copyright © American Society for Microbiology, doi: 10.1128/AAC.00118-13

Die genotypischen PFGE-Typen (Cluster) wurden entsprechend der jeweiligen Keimspezies abgekürzt: PSA, *P. aeruginosa*; PUT, *P. putida*, ZVK, Zentraler Venenkatheter; CIS, chirurgische Intensivstation; CN, chirurgische Normalstation; IIS, internistische Intensivstation; IN, internistische Normalstation; IA, internistische Ambulanz; UN, urologische Normalstation; C, chromosomal vorhanden; P, Plasmid vorhanden; n. b., nicht bestimmbar.

Tab. 7 (Fortsetzung): Übersicht über die genetischen Charakteristika der klinischen Isolate (39)<sup>2</sup>

Isolatnummer, M	Datum, Erstisolierung	Quelle	Station	PFGE- Typ	Gen- lokalisierung	Plasmidgröße	Konjugation- Erfolg C600 und J53
<i>Enterobacter cloacae (ENT)</i>							
14	Jun. 09	Urin	IN4	ENT-A1	C und zwei P	25 und 220	negativ
15	Jan. 10	Blutkultur	IIS1	ENT-A2	C und zwei P	25 und 220	negativ
21	Mrz. 10	Wundabstrich	IN2	ENT-A2	C und zwei P	25 und 220	negativ
35	Jul. 10	Urin	IN3	ENT-A1	C und zwei P	25 und 220	negativ
44	Aug. 10	Urin	IN3	ENT-A1	C und zwei P	25 und 220	negativ
60	Dez. 11	Wundabstrich	IN3	ENT-A3	C und zwei P	25 und 220	
65	Dez. 11	Urin	IN3	ENT-A1	C und zwei P	25 und 220	negativ
<i>Serratia marcescens (SMA)</i>							
9	Sep. 08	Urin	IIS2	SMA-A	P	140	negativ
11	Nov. 08	Urin	CN2	SMA-B	C		negativ
<i>Escherichia coli</i>							
17	Mrz. 07	Blutkultur	IN5	n. u.	C und P	50 und 130	positiv mit C600
<i>Klebsiella oxytoca</i>							
43	Okt. 10	Urin	IN3	n. u.	C		negativ
<i>Citrobacter freundii</i>							
56	Jul. 11	Wundabstrich	CIS	n. u.	C		negativ

<sup>2</sup>Copyright © American Society for Microbiology, doi: 10.1128/AAC.00118-13

Die genotypischen PFGE-Typen (Cluster) wurden entsprechend der jeweiligen Keimspezies abgekürzt: ENT, *E. cloacae*; SMA, *S. marcescens*; CIS, chirurgische Intensivstation; CN, chirurgische Normalstation; IIS, internistische Intensivstation; IN, internistische Normalstation; C, chromosomal vorhanden; P, Plasmid vorhanden; n. u., nicht untersucht.

### 3.1.1 Resistenztestung

Die Interpretation der MHK-Werte erfolgte nach standardisierten Messwerten (*clinical breakpoints*) von EUCAST nach der Version 3.1 des Jahres 2013 (56).

Alle das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden und im Rahmen dieser Arbeit untersuchten klinischen Isolate zeigten eine hochgradige Resistenz gegen Breitbandantibiotika, wie Piperacillin/Tazobactam sowie die Vertreter der 3. Generation Cephalosporine, genauer Ceftazidim, und mit wenigen Ausnahmen auch Vertreter der 4. Generation, nämlich Cefepim (Tab. 8). Das Isolat *P. aeruginosa* M19 war als einziges der *P. aeruginosa*-Gruppe sensibel auf Cefepim. Dagegen wiesen die Isolate *S. marcescens* M11 sowie *E. cloacae* M15 eine intermediäre Sensitivität auf Cefepim auf.

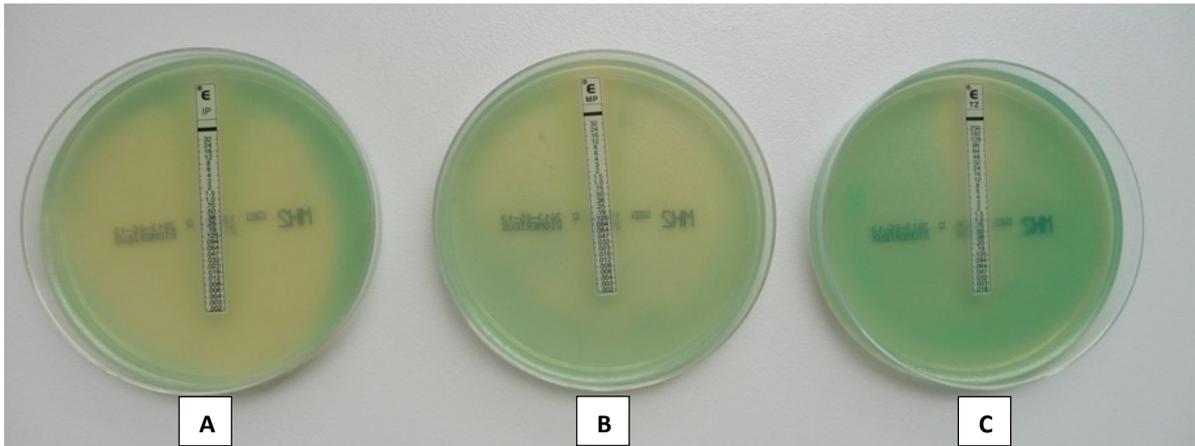
Die Resistenz gegen die Leitsubstanzen der Carbapeneme war bei allen hier aufgeführten klinischen Isolaten ausgeprägt. Eine Ausnahme hiervon stellte das Isolat *E. coli* M17 dar, für dieses lag die Sensitivität im intermediären Bereich. Zusätzlich fand sich bei allen untersuchten klinischen Isolaten eine Resistenz gegen Ciprofloxacin als Leitsubstanz der Fluorchinolone.

Eine ausgeprägte Resistenzentwicklung zeigte sich bei *Pseudomonas* spp. für die Leitsubstanz Gentamicin als Leitsubstanz der Aminoglykoside. Bei allen klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Isolaten der *Enterobacterales* lag eine intermediäre Sensitivität auf Gentamicin vor. Ausnahme hiervon war der *E. coli* M17, dieser ist sensibel auf Gentamicin getestet worden.

Die Sensitivität auf Aztreonam als Hauptvertreter der Monobactam-Antibiotika war sehr heterogen ausgeprägt. Sie lag bei allen *P. aeruginosa*-Isolaten im intermediären Bereich. Ausnahme hiervon bildete das *P. aeruginosa*-Isolat M7 in dieser Gruppe, das eine Aztreonam-Resistenz aufwies. Dagegen waren alle *P. putida*-Isolate resistent gegen dieses Antibiotikum. Bei den *Enterobacterales* bestand ebenfalls eine Aztreonam-Resistenz. Die Isolate *E. coli* M17 sowie *S. marcescens* M11, die als sensitiv getestet wurden, stellten eine Abweichung dar. Dagegen zeigte das *S. marcescens*-Isolat M9 eine intermediäre Sensitivität auf Aztreonam.

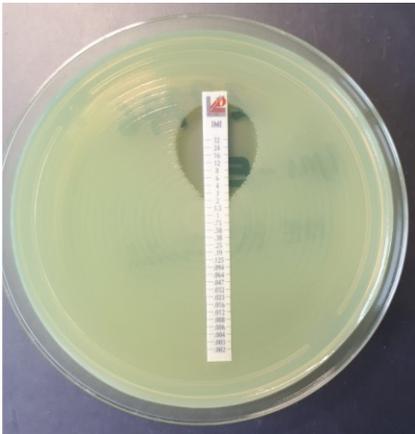
Betreffend des Reserveantibiotikums Colistin ist beachtenswert, dass sich alle untersuchten *Pseudomonas* spp. sowie die Mehrzahl der *Enterobacterales* als Colistin-sensibel erwiesen.

Nach Interpretation der MHK-Werte nach EUCAST 2013 handelte es sich bei allen untersuchten Isolaten um 4MRGN-Keime. Ausnahme hiervon waren alle *P. putida*-Isolate und das *E. coli*-Isolat M17, welcher ein 3MRGN-Keim war.



**Abb. 6: E-Testergebnis des *P. aeruginosa*-Isolats M0**

Das *P. aeruginosa*-Isolat (M0) wurde, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, mittels E-Test gegen Imipenem (A), Meropenem (B) und Piperacillin/Tazobactam (C) untersucht. Die MHK für Imipenem und Meropenem liegt jeweils bei  $\geq 32$  mg/L, die MHK für Piperacillin/Tazobactam bei  $\geq 256$ . Damit ist eine Resistenz gegen die drei Antibiotika nachgewiesen.



**Abb. 7: Beispiel eines Imipenem-sensiblen *P. aeruginosa***

Imipenem-sensibles *P. aeruginosa*-Isolat mit typischer Hemmhof-Ellipse um den Imipenem-Antibiotikastreifen. Die MHK von  $2 \mu\text{g/ml}$  entspricht der Antibiotikakonzentration, bei der ein sichtbares Keimwachstum verhindert wird. Sie wird an der Stelle der Skala abgelesen, an der der Teststreifen vom Bakterienrasen berührt wird.

**Tab. 8: MHK-Werte der untersuchten klinischen Isolate**

	Antibiotika mit MHK-Angabe (µg/ml)								
	Pip/Taz.	Ceftazidim	Cefepim	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Getamicin	Aztreonam	Colistin
<b>Klinische Isolate,</b>									
<b>M</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
0	>256	>256	16	>32	>32	>32	32	4	1
1	>256	128	32	>32	>32	>32	>256	8	2
2	>256	>256	16	>32	>32	16	256	2	1
4	>256	>256	64	>32	>32	>32	>256	8	2
7	>256	>256	64	>32	>32	>32	>256	32	1
8	>256	>256	64	>32	>32	>32	>256	8	2
10	>256	>256	64	>32	>32	>32	>256	16	1
19	>256	64	8	>32	>32	>32	32	8	1
28	>256	>256	32	>32	>32	>32	>256	4	1
29	>256	>256	32	>32	>32	16	>256	4	0,5
68	>256	>256	>256	>32	>32	>32	>256	8	0,5
	<i>Pseudomonas putida</i>								
12	>256	>256	32	>32	>32	>32	32	>256	0,5
18	>256	>256	32	>32	>32	4	32	128	0,125
37	>256	>256	32	>32	>32	>32	32	256	1
38	>256	>256	16	>32	>32	>32	32	256	0,5
	<i>Enterobacter cloacae</i>								
14	>256	>256	8	>32	>32	>32	4	32	0,125
15	>256	>256	2	32	32	>32	4	64	0,5
21	>256	>256	8	>32	>32	>32	4	64	0,125
35	>256	>256	8	>32	>32	>32	4	32	0,125
	<i>Serratia marcescens</i>								
9	>256	256	8	>32	>32	>32	4	4	>256
11	<256	64	4	32	>32	>32	4	1	8
	<i>Escherichia coli</i>								
17	>256	64	64	8	8	>32	2	0,125	0,125
	<i>Klebsiella oxytoca</i>								
43	>256	>256	8	>32	>32	>32	4	32	0,125
	<i>Citrobacter freundii</i>								
56	>256	>256	8	>32	>32	>32	4	32	0,125

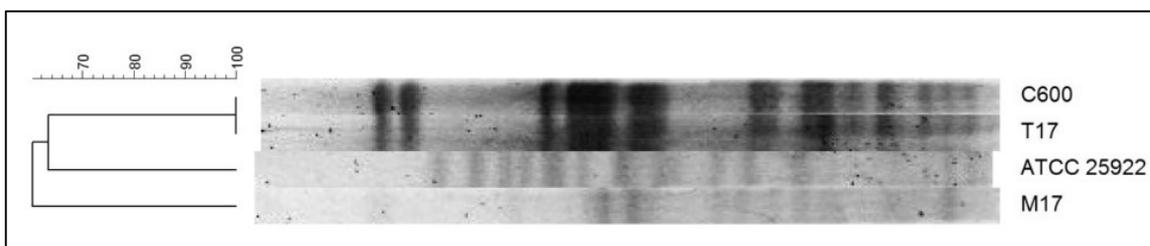
MHK, minimale Hemmkonzentration; Pip/Taz, Piperacillin/Tazobactam.

### 3.1.2 Konjugationsexperimente

Die Ergebnisse der Konjugationsexperimente sind in Tabelle 7 aufgeführt und werden im Folgenden erläutert.

In der Arbeit von Castanheira et al. wurde hinsichtlich des *P. aeruginosa*-Isolats M0 die Präsenz eines 22 kb großen Plasmids beschrieben, welches nicht konjugierbar war (34). Im Rahmen der von der Arbeitsgruppe durchgeführten genotypischen Voruntersuchungen (S1-Nuklease) konnte dieses Plasmid nicht mehr detektiert werden. Dagegen war es möglich, ein 25 kb großes Plasmid in dem *P. aeruginosa*-Isolat M58 nachzuweisen. Dieses gehört wie das Isolat M0 demselben genetischen Cluster PSA-A an. Die durchgeführten Konjugationsexperimente mit dem *P. aeruginosa*-Isolat M58 sowie mit anderen Keimen des gleichen genotypischen Clusters wie das *P. aeruginosa*-Isolat M0 (PSA-A) zeigten ebenfalls keinen Erfolg. Bei den Keimen *S. marcescens* M9 sowie allen *E. cloacae*-Isolaten war die Konjugation trotz der Präsenz von teilweise mehreren Plasmiden pro Isolat nicht erfolgreich.

Der horizontale *In-vitro*-Gentransfer gelang lediglich in einem Fall: beim *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven *E. coli* M17 als Donor- und *E. coli* C600 als Akzeptorkeim. In der Multiplex-Real-Time-PCR wurde beim Transkonjuganten *E. coli* C600/M17 (T17) das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen detektiert. Nach der RAPD-PCR zeigten sich in der anschließenden PFGE identische Bandenmuster der Transkonjuganten C600/M17 (T17) und *E. coli* C600 (Abb. 8). Somit wurde die erfolgte Konjugation des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens in den *E. coli* C600 bestätigt.



**Abb. 8: PFGE-Bandenmuster des Akzeptor-, Donorkeims und des Transkonjuganten**

Die Darstellung erfolgte mithilfe der Software GelCompar II. Abgebildet sind die Bandenmuster des Akzeptorkeims *E. coli* C600, des Donorkeims *E. coli* M17, des Transkonjuganten *E. coli* C600/M17 (T17) und des Referenzstamms *E. coli* ATCC 25922 nach durchgeführter Gelelektrophorese. Der phylogenetische Baum links zeigt die 100%ige Übereinstimmung der Banden des Akzeptorkeims *E. coli* C600 und des Transkonjuganten *E. coli* T17.

Die nachfolgende Resistenztestung des Transkonjuganten sowie des Akzeptorkeims mittels E-Test auf die Antibiotika Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem und Aztreonam erbrachte ausgeprägte erworbene Resistenzen gegen Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam sowie Ceftazidim (Tab. 9). Der Transkonjugant wies eine zweifach erhöhte MHK für Imipenem und 2,6-fach erhöhte MHK für Meropenem auf, hat jedoch trotz des erfolgten Gentransfers keine Resistenz gegen Carbapeneme erworben.

**Tab. 9: MHK-Werte für Akzeptor und Transkonjugant**

Konjugationsexperimente						
	Antibiotika mit MHK-Angabe (µg/ml)					
	Piperacillin	Pip/Taz.	Ceftazidim	Imipenem	Meropenem	Aztreonam
<b>Akzeptor</b>						
<i>E. coli</i> C600	2	2	0,25	0,12	0,012	0,064
<b>Transkonjugant</b>						
<i>E. coli</i> T17	> 256	> 256	256	0,25	0,032	0,125

MHK, minimale Hemmkonzentration; Pip/Taz, Piperacillin/Tazobactam.

### 3.2 Umweltuntersuchung

Die bereits erwähnte genotypische Voruntersuchung der seit 2007 isolierten *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven klinischen Keime durch die Arbeitsgruppe konnte in der Gruppe der *P. aeruginosa*-Isolate ein großes genetisches PFGE-Cluster PSA-A feststellen. Dieses umfasst insgesamt 24 Isolate, davon stammen 19 aus dem Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation (Tab. 12). Die lange Dauer und der diskontinuierliche Charakter der klonalen Verbreitung des *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms ließen ein Umweltreservoir vermuten. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Umweltuntersuchung auf der chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf initiiert. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits publiziert (40).

Im Jahr 2012 wurden insgesamt 119 Umweltproben gesammelt, davon wurden 51 positiv auf die Präsenz des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub> in der PCR aus dem Direktmaterial (Screening-PCR) getestet (Tab. 10). Hierzu zählen 44 Umweltproben der Waschbeckensiphons, vier Proben von Oberflächen sowie drei Proben von insgesamt zwei Haarwaschwannen (eine Haarwaschwanne wurde zweimal beprobt). Bei 16 Umweltproben gelangen eine kulturelle Anzucht und eine anschließende Identifikation von *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Keimen in der Kultur-PCR. Darunter fallen die Proben von 15 Siphons und einer Haarwaschwanne.

**Tab. 10: Übersicht über die Zahlen der Umweltuntersuchung 2012**

<b>Untersuchung 2012</b>	Proben von	Probenanzahl	Screening-PCR positiv	Kultur-PCR positiv
<b>Patientenzimmer</b>	Siphons	42	37	10
	Oberflächen	38	4	0
<b>Arbeitsraum</b>	Siphons	13	7	5
	Oberflächen	23	n. d.	n. d.
<b>Gesamt</b>	Siphons	55	44	15
	Oberflächen	61	4	0
	Haarwaschwannen	3	3	1
	Gesamtanzahl der Proben	119	Gesamt: 51	Gesamt: 16

n. d., PCR nicht durchgeführt.

Die Typisierung mittels PFGE nach Restriktionsenzymverdau zeigte bei acht Umweltisolaten eine direkte Verwandtschaft mit dem klinischen *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamm M0. Diese Klone wurden in sechs Waschbeckensiphons entdeckt: in den Waschbecken in fünf Einzelzimmern (*P. aeruginosa*-Isolate 1452-1, 1562-1, 1564h, 1568h, 1571-1, 1571-2) sowie einem Arbeitsraum (*P. aeruginosa*-Isolat 2155). Zudem wurde ein Umweltisolat auf einer Haarwaschwanne (*P. aeruginosa*-Isolat 2156-2) nachgewiesen.

Nach Beaufsichtigung der Pflegemaßnahmen auf der betroffenen Intensivstation durch Hygienefachkräfte und den Ergebnissen der ersten Umweltuntersuchung 2012 wurden Waschbeckenabflüsse in den Patientenzimmern als vermutete Ausbruchsquelle identifiziert. Auffällig war, dass häufig sauberes Patientenmaterial, welches im Waschbecken oder in dessen unmittelbarer Nähe abgestellt worden war, wieder zurück zum Patienten gebracht worden ist. Dies wurde als mögliche Übertragungskette angenommen, woraufhin im Mai 2012 die Standardhygienemaßnahmen intensiviert und einige neue Hygienemaßnahmen eingeführt worden sind. In allen Patienteneinzelzimmern wurde die Verwendung des Wassers aus den Waschbecken für die Patientenpflege eingestellt. Die Waschbecken durften nur zum Abfluss des nach durchgeführter Patientenpflege kontaminierten Wassers benutzt werden. Patientenmaterial und Pflegeutensilien durften nicht mehr im oder neben dem Waschbecken abgelegt werden. Sofern sie dort abgestellt wurden, durften diese nicht wieder zurück zum Patienten gebracht werden. Anschließend wurden in allen Einzelzimmern die Abflüsse desinfiziert. Nach Austausch der Waschbeckensiphons wurden die o. g. Änderungen der Hygienemaßnahmen weiterhin beibehalten. Die Verwendung von Haarwaschwannen wurde untersagt. Die Umsetzung dieser Maßnahmen wurde durch Hygienefachkräfte im Laufe mehrerer Wochen kontrolliert. Der klinische Ausbruch wurde an das Gesundheitsamt gemeldet (40).

Nach der Implementierung von Hygienemaßnahmen im Mai 2012 wurde die Umweltuntersuchung im Jahr 2013 zur Einschätzung des Umweltreservoirs wiederholt. In allen 40 Einzelzimmern der chirurgischen Intensivstation wurden Proben aus den Waschbeckensiphons und von den Ablageflächen der Waschbeckentheken entnommen. Von insgesamt 80 gesammelten Umweltproben waren 38 *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiv in der Screening-PCR, davon stammten 31 Proben aus Waschbeckensiphons und sieben von den Ablageflächen der Waschbeckentheken (Tab. 11). Bei 13 Proben wurden in der Kultur-PCR *bla*<sub>GIM-1</sub>-positive Isolate identifiziert.

**Tab. 11: Übersicht über die Zahlen der Umweltuntersuchung 2013**

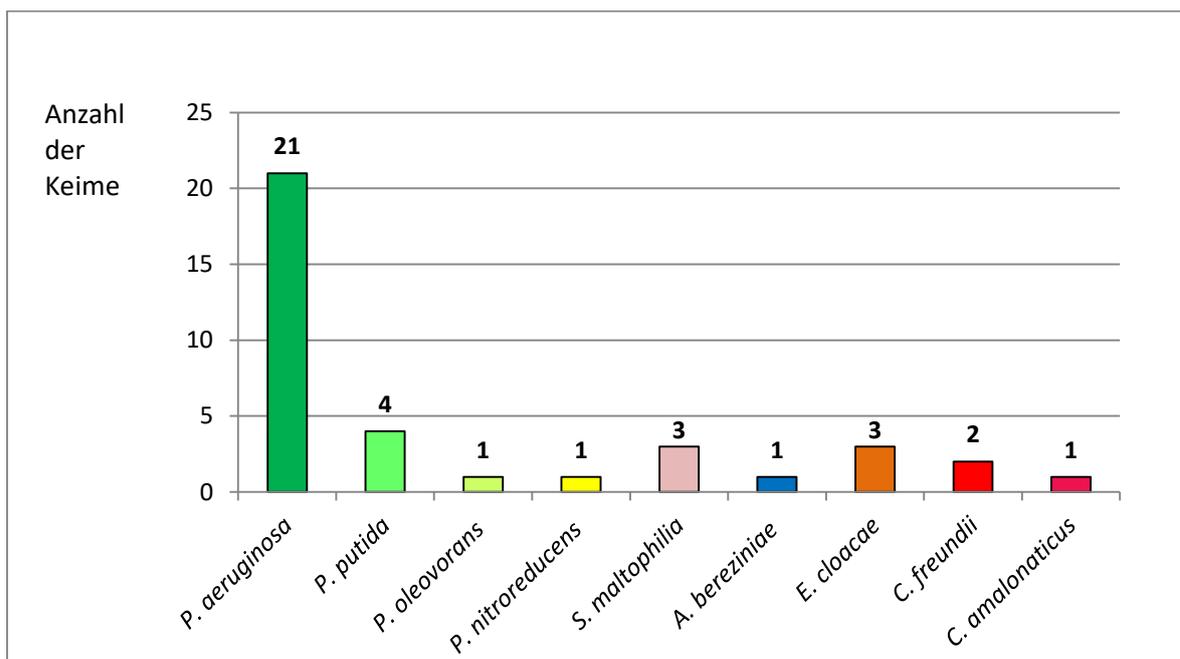
<b>Untersuchung 2013</b>	Proben von	Probenanzahl	Screening-PCR positiv	Kultur-PCR positiv
<b>Patientenzimmer</b>	Siphons	40	31	13
	Oberflächen	40	7	0
	Gesamtanzahl der Proben	80	38	13

2013 wurden *P. aeruginosa*-Isolate, die mit dem klinischen Ausbruchsstamm M0 genetisch verwandt sind (Cluster PSA-A), in drei Waschbeckensiphons gefunden (*P. aeruginosa*-Isolate 1173-1, 1174-3, 1182-4). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine persistierende Kolonisierung der Waschbeckensiphons mit *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Umweltkeimen bestätigt.

Seit der Einführung der neuen Hygienemaßnahmen im Mai 2013 wurden keine *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Erreger des PSA-A-Clusters aus dem Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation mehr isoliert.

### 3.2.1 Umweltisolate: Vielfalt der bakteriellen Spezies

Ein Fazit der Umweltuntersuchungen aus den Jahren 2012 und 2013 ist die Feststellung einer großen Vielfalt der bakteriellen Spezies unter den *bla*<sub>GIM-1</sub>-beherbergenden Umweltisolaten (Abb. 9). Das Resistenzgen wurde in neun verschiedenen Keimspezies nachgewiesen, vorherrschend in der Gruppe der Nonfermenter, jedoch auch in der *Enterobacterales*-Gruppe. Als typischer Wasserkeim wurde hauptsächlich *P. aeruginosa* in den Siphonumweltproben entdeckt. Neben *P. aeruginosa* wurde das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub> in weiteren Keimspezies der Nonfermenter detektiert: *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Stenotrophomonas maltophilia* sowie *Acinetobacter bereziniae*. In der Gruppe der *Enterobacterales* ist *Citrobacter amalonaticus* erstmalig als *bla*<sub>GIM-1</sub>-Träger identifiziert worden (40).



**Abb. 9: Vielfalt der bakteriellen Spezies der Umweltisolate**

Im Zeitraum von 2012 bis 2013 wurden insgesamt 37 Umweltisolate gesammelt. Die Zahl oberhalb der Balken gibt die Anzahl der jeweiligen Isolate an.

### 3.2.2 Ergebnisse der Genotypisierung: Klonalität der Umweltisolate

Alle im Rahmen der Umweltuntersuchung auf der chirurgischen Intensivstation identifizierten *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Umweltisolate wurden genotypisch untersucht. Im nächsten Schritt wurde ein Vergleich zwischen diesen Umweltisolaten und allen durch die Arbeitsgruppe genotypisch voruntersuchten klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Isolaten unternommen. Hierzu wurde aus jedem

genetischen PFGE-Typ-Cluster der klinischen Isolate einer Keimspezies (Tab. 7) stellvertretend ein Klon ausgewählt, welcher gemeinsam mit den Umweltisolaten der jeweiligen Keimspezies der Genotypisierung mittels PFGE unterzogen worden ist. Zur Feststellung der Klonalität erfolgten im Anschluss die Darstellung und Auswertung der Bandenmuster mithilfe der Software GelCompar II. Für die Auswertung wurden bei einem Übereinstimmungsgrad der Bandenmuster der untersuchten Isolate von über 80 % eine Klonalität der Isolate und damit ein Cluster definiert. Tabelle 12 führt alle zum Zeitpunkt der Typisierungsuntersuchung identifizierten Umweltisolate sowie die parallel untersuchten klinischen Isolate gemeinsam mit epidemiologischen und genetischen Informationen auf.

**Tab. 12: Übersicht über die Umweltisolate und ausgewählte klinische Isolate (41)<sup>3</sup>**

Isolatnummer	Spezies	PFGE-Restriktionsenzym	PFGE-Typ	Genlokalisierung	Plasmidgröße (kb)	Ort	Jahr	Station der Erstisolation
<i>Pseudomonas aeruginosa (PSA) - Umweltisolate</i>								
1181-0		<i>Spe I</i>	PSA-D	C		Ausguss, AR	2012	CIS
1187-h		<i>Spe I</i>	PSA-D	C		Ausguss, AR	2012	CIS
1452-1		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2012	CIS
1454		<i>Spe I</i>	PSA-F	neg.		Siphon	2012	CIS
1456-8		<i>Spe I</i>	PSA-B	C		Siphon	2012	CIS
1458-2		<i>Spe I</i>	PSA-B	C		Siphon	2012	CIS
1562-1		<i>Spe I</i>	PSA-A	C und ein P	25	Siphon	2012	CIS
1564-h		<i>Spe I</i>	PSA-A	C und ein P	25	Siphon	2012	CIS
1568h		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2012	CIS
1571-1		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2012	CIS
1571-2		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2012	CIS
1581-2		<i>Spe I</i>	PSA-B	C		Siphon	2012	CIS
2155		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon, AR	2012	CIS
2156-2		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Haarwaschwanne	2012	CIS
1158-1		<i>Spe I</i>	PSA-G	C		Siphon	2013	CIS
1170-1		<i>Spe I</i>	PSA-C	C		Siphon	2013	CIS
1171-1		<i>Spe I</i>	PSA-C	C		Siphon	2013	CIS
1173-1		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2013	CIS
1174-3		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2013	CIS
1177-2		<i>Spe I</i>	PSA-H	C		Siphon	2013	CIS
1182-4		<i>Spe I</i>	PSA-A	C		Siphon	2013	CIS
<i>Pseudomonas aeruginosa (PSA) - klinische Isolate</i>								
M0		<i>Spe I</i>	PSA-A	C			2002	CIS
M1		<i>Spe I</i>	PSA-E	C				IIS2
M2		<i>Spe I</i>	PSA-L	C				IN3
M7		<i>Spe I</i>	PSA-M	C				IIS1
M10		<i>Spe I</i>	PSA-I	C				IIS1
M16		<i>Spe I</i>	PSA-A	C				CIS
M28		<i>Spe I</i>	PSA-K	C				IA
M29		<i>Spe I</i>	PSA-J	C				CIS
M58		<i>Spe I</i>	PSA-A	C und ein P	25			CIS
M72		<i>Spe I</i>	PSA-K	C				IIS2

<sup>3</sup>Copyright © American Society for Microbiology, doi: 10.1128/AEM00424-16.

CIS, chirurgische Intensivstation; IN, internistische Normalstation; IA, internistische Ambulanz; IIS, internistische Intensivstation; AR, Arbeitsraum der CIS; C, chromosomal vorhanden; P, Plasmid vorhanden; neg., Resistenzgen nicht mehr detektierbar (möglicherweise Verlust während Subkultivierung oder Lagerung).

Anmerkungen: „Ausguss“ deutet darauf hin, dass der Keim aus der Probe des Ausgusswassers im unreinen Arbeitsraum nachgewiesen worden ist.

Tab. 12 (Fortsetzung): Übersicht über die Umweltisolate und ausgewählte klinische Isolate (41)<sup>3</sup>

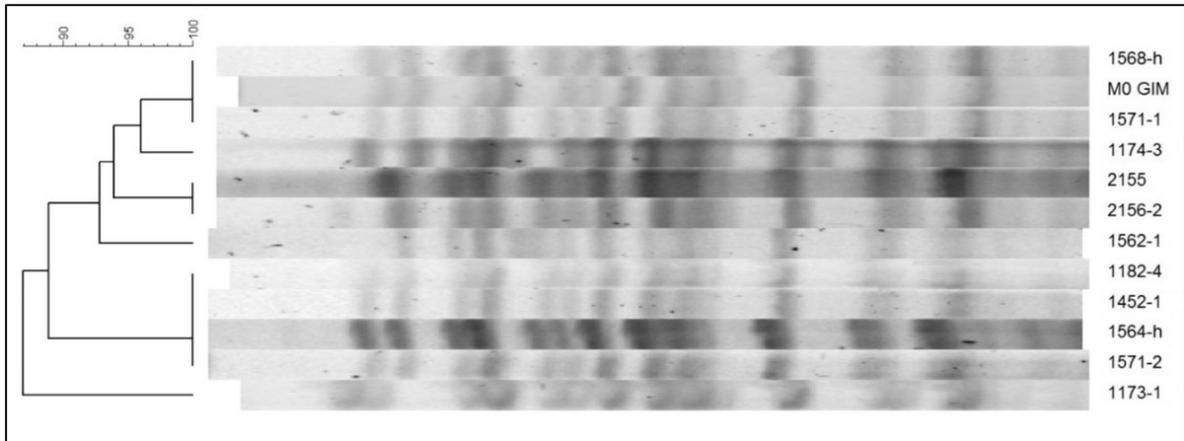
Isolatnummer	Spezies	PFGE-Restriktionsenzym	PFGE-Typ	Genlokalisierung	Plasmidgröße (kb)	Ort	Jahr	Station der Erstisolation
<i>Pseudomonas putida (PUT) - klinische und Umweltisolate</i>								
M18		<i>Spe I</i>	PUT-B	C				IN3
M6		<i>Spe I</i>	PUT-A	C				IN3
M12		<i>Spe I</i>	PUT-A	C				IN3
M37		<i>Spe I</i>	PUT-A	C				IN3
M38		<i>Spe I</i>	PUT-A	C				IN3
M76		<i>Spe I</i>	PUT-C	C				UN2
1167-1		<i>Spe I</i>	PUT-D	C		Siphon	2013	CIS
1172-3		<i>Spe I</i>	PUT-D	C		Siphon	2013	CIS
1180-4		<i>Spe I</i>	PUT-D	C		Siphon	2013	CIS
1187-2		<i>Spe I</i>	PUT-E	C		Ausguss, AR	2012	CIS
<i>Andere Pseudomonas spp.- Umweltisolate</i>								
1460-1	<i>P. oleovorans</i>	nur S1	n. u.	C		Siphon	2012	CIS
1456-7	<i>P. nitroreducens</i>	nur S1	n. u.	C		Siphon	2012	CIS
<i>Stenotrophomonas maltophilia (STE) - Umweltisolate</i>								
1160-1		<i>Xba I</i>	STE-A	C		Siphon	2013	CIS
1161-1		<i>Xba I</i>	STE-A	C		Siphon	2013	CIS
1163-3		<i>Xba I</i>	STE-A	C		Siphon	2013	CIS
<i>Enterobacter cloacae (ENT) - klinische und Umweltisolate</i>								
M14		<i>Xba I</i>	ENT-A	C und zwei P	25 und 220			IN4
M15		<i>Xba I</i>	ENT-A	C und zwei P	25 und 220			IIS1
NRZ 614 - 2		<i>Xba I</i>	ENT-D	P	260			Quelle: NRZ
3678		<i>Xba I</i>	ENT-A	C und zwei P	25 und 220	Siphon, AR	2012	IN5
1172-1		<i>Xba I</i>	ENT-B	C		Siphon	2013	CIS
1568-5		<i>Xba I</i>	ENT-B	C		Siphon	2012	CIS
2156-3		<i>Xba I</i>	ENT-C	C		Haarwaschwanne	2012	CIS
<i>Citrobacter freundii (CIT) - klinische und Umweltisolate</i>								
M56		<i>Xba I</i>	CIT-A	C				CIS
2157-0		<i>Xba I</i>	CIT-B	P	260	Siphon	2012	CIS
1187-1		<i>Xba I</i>	CIT-C	C		Ausguss, AR	2012	CIS
<i>Restliche Umweltisolate</i>								
1195-2	<i>C. amalonaticus</i>	nur S1	n. u.	C		Siphon	2012	CIS
1564-2	<i>A. bereziniae</i>	nur S1	n. u.	C und ein P	350	Siphon	2012	CIS

<sup>3</sup>Copyright © American Society for Microbiology, doi: 10.1128/AEM00424-16.

CIS, chirurgische Intensivstation; IN, internistische Normalstation; IIS, internistische Intensivstation; UN, urologische Normalstation; AR, Arbeitsraum der CIS; C, chromosomal vorhanden; P, Plasmid vorhanden; n. u., nicht untersucht; NRZ, Nationales Referenzzentrum in Bochum.

Anmerkungen: „Ausguss“ deutet darauf hin, dass der Keim aus der Probe des Ausgusswassers im unreinen Arbeitsraum nachgewiesen worden ist. Das *E. cloacae*-Isolat 3678 wurde im Juli 2012 aus einem Waschbeckensiphon einer internistischen Normalstation IN5 im Rahmen einer anderen Umweltuntersuchung isoliert. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls genotypisch untersucht.

In der Gruppe der *P. aeruginosa*-Umweltisolate zeigen sich sechs verschiedene genetische Cluster. Das größte Cluster PSA-A bilden elf Umweltisolate. Diese wurden als genetische Klone des *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms M0 (PSA-A) identifiziert, sodass hier ein Bezug zum klinischen Ausbruchsgeschehen bestätigt worden ist (Abb. 10).

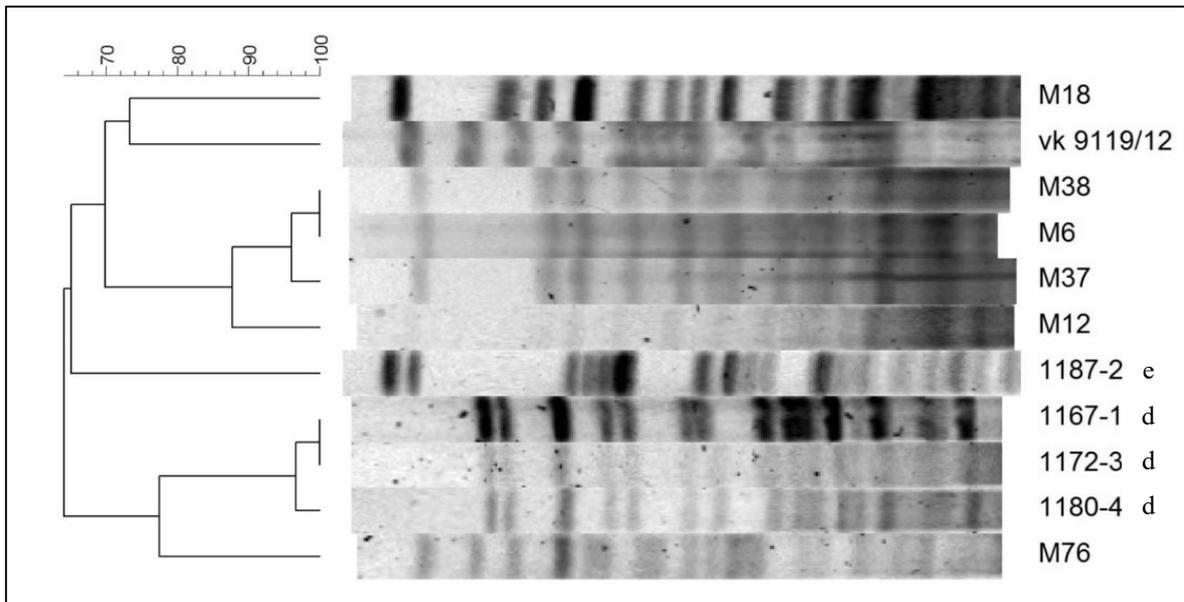


**Abb. 10: PFGE-Bandenmuster der *P. aeruginosa*-Umweltisolate und des Ausbruchsstamms M0**

Diese Darstellung der PFGE-Bandenmuster der *P. aeruginosa*-Umweltisolate des Clusters PSA-A (11 Klone) und die des Ausbruchsstamms M0 wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *SpeI* und anschließender PFGE mithilfe der Software GelCompar II erstellt. Links zeigt der phylogenetische Baum die 80%ige Übereinstimmung der Bandenmuster. Rechts sind die Nummern der *P. aeruginosa*-Umweltisolate abgebildet. Alle hier dargestellten Umweltisolate und der klinische Ausbruchsstamm M0 bilden das Cluster PSA-A.

Im Rahmen der Genotypisierung zeigte sich, dass auch andere *P. aeruginosa*-Umweltisolate klonal sind, so z. B. die Isolate 1456-8, 1458-2 und 1581-2 (PSA-B), 1170-1 und 1171-1 (PSA-C) sowie 1181 und 1187-h (PSA-D). Die klinischen Isolate des jeweils gleichen Clusters wurden jedoch nicht von der chirurgischen Intensivstation isoliert (Tab. 12). Dementsprechend ist an dieser Stelle kein örtlicher sowie klinischer Zusammenhang herstellbar.

In der Gruppe der *P. putida*-Isolate bilden die Isolate 1167-1, 1172-3, 1180-4 ein gemeinsames Gencluster (PUT-D). Das Bandenmuster des vierten Isolats 1187-2 unterscheidet sich von den Bandenmustern der PUT-D-Isolate und wird daher als PUT-E charakterisiert (Abb. 11). Es besteht keine genetische Verwandtschaft sowie kein örtlicher Zusammenhang zu den größtenteils von der Station IN3 isolierten klinischen *P. putida*-Keimen.

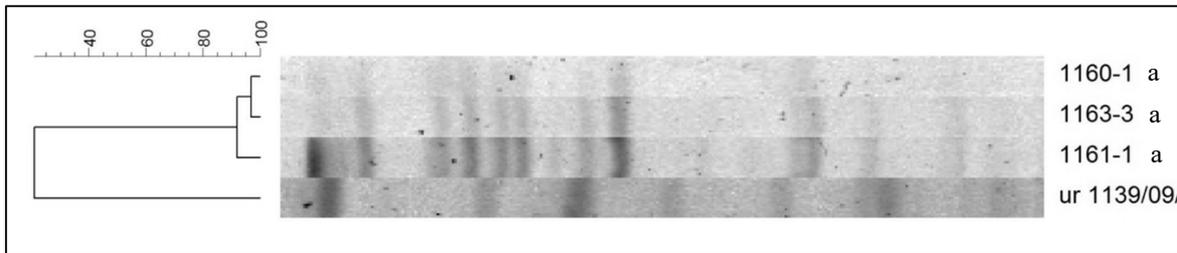


**Abb. 11: PFGE-Bandenmuster der *P. putida*-Isolate**

Diese Darstellung der PFGE-Bandenmuster der klinischen *P. putida*-Isolate und der *P. putida*-Umweltisolate wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *SpeI* und anschließender PFGE mithilfe der Software GelCompar II erstellt. Links zeigt der phylogenetische Baum den Grad der Übereinstimmung der Bandenmuster in Prozent an, rechts sind die Isolatnummern aufgeführt. Das Isolat vk 9119/12 diente als Referenzstamm.

d, PFGE-Cluster PUT-D; e, PFGE-Cluster PUT-E.

Die *S. maltophilia*-Umweltisolate sind untereinander genetisch identisch (STE-A). Sie stammen von der chirurgischen Intensivstation, wurden jedoch alle aus unterschiedlichen Siphons isoliert (Abb. 12).

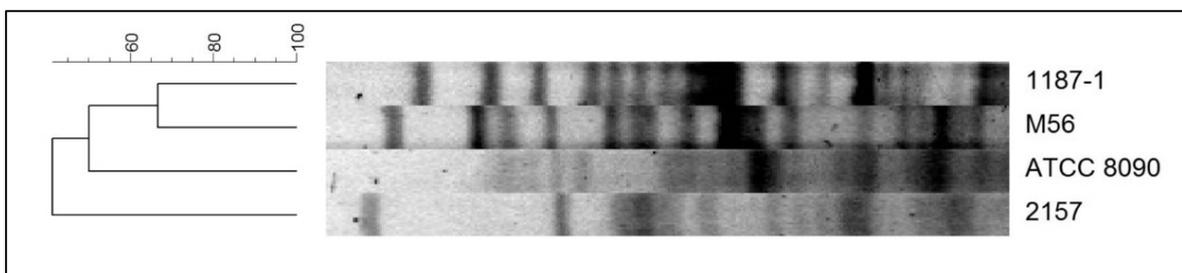


**Abb. 12: PFGE-Bandenmuster der *S. maltophilia*-Isolate**

Diese Darstellung der PFGE-Bandenmuster der *S. maltophilia*-Umweltisolate wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und anschließender PFGE mithilfe der Software GelCompar II erstellt. Links zeigt der phylogenetische Baum eine Klonalität von 90 % an, rechts sind die Isolatnummern aufgeführt. Alle hier abgebildeten *S. maltophilia*-Umweltisolate gehören dem STE-A-Cluster an. Das Isolat ur 1139/09 diente als Referenzstamm.

a, PFGE-Cluster STE-A.

Bei den *C. freundii*-Isolaten ist eine genetische Heterogenität festzustellen. Die Umweltisolate sind weder untereinander verwandt, noch gibt es einen Bezug zum klinischen *C. freundii*-Isolat M56 (Abb. 13).

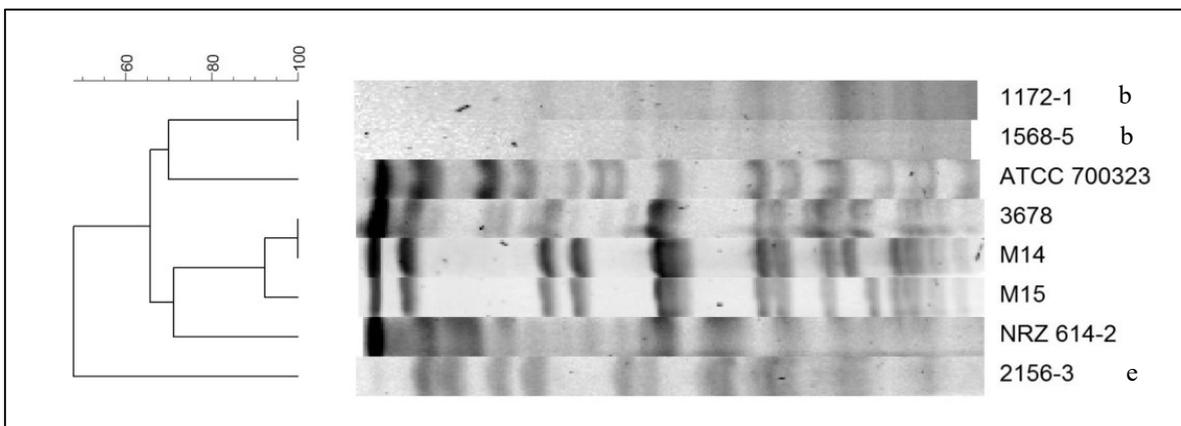


**Abb. 13: PFGE-Bandenmuster der *C. freundii*-Isolate**

Diese Darstellung der PFGE-Bandenmuster des klinischen *C. freundii*-Isolates M56 und der *C. freundii*-Umweltisolate wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und anschließender PFGE mithilfe der Software GelCompar II erstellt. Links zeigt der phylogenetische Baum den Grad der Übereinstimmung der Bandenmuster in Prozent an, rechts sind die Isolatnummern aufgeführt. Das Isolat ATCC 8090 diente als Referenzstamm.

In der *E. cloacae*-Gruppe wurde u. a. das Isolat 3678 untersucht. Dieses wurde von der Arbeitsgruppe im Rahmen einer parallel durchgeführten Umweltuntersuchung im Juli 2012 im Waschbeckensiphon eines Arbeitsraums der Station IN5 nachgewiesen. Isolat 3678 ist mit den klinischen Isolaten M14 und M15 verwandt, gemeinsam bilden sie das ENT-A-Cluster (Abb. 14).

Der Ursprung der beiden klinischen Isolate M14 (Station IN4) und M15 (Station IIS1) stimmt jedoch nicht mit dem des Umweltisolats 3678 überein, daher kann hier kein epidemiologischer Zusammenhang hergestellt werden. Die beiden von der chirurgischen Intensivstation gesammelten Umweltisolate 1172-1 und 1568-5 sind miteinander verwandt (ENT-B). Dagegen weist das Isolat 2156-3 ein komplett anderes Bandenmuster (ENT-E) auf, damit besteht keine Verwandtschaft mit der ENT-B-Gruppe. Folglich konnte kein epidemiologischer Zusammenhang zwischen den klinischen und den aus der Umwelt isolierten *E. cloacae*-Isolaten aufgezeigt werden.



**Abb. 14: PFGE-Bandenmuster der *E. cloacae*-Isolate**

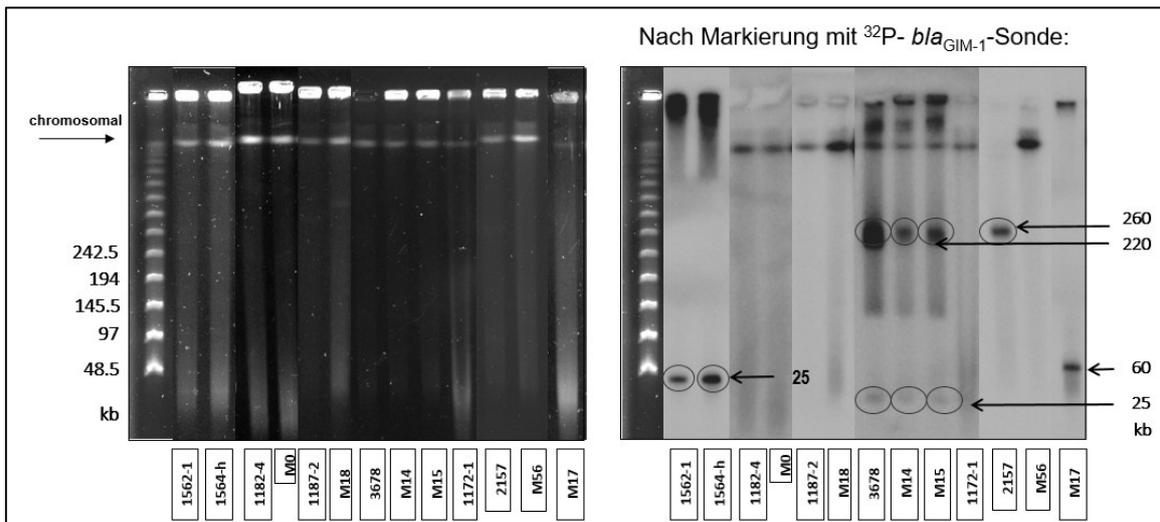
Diese Darstellung der PFGE-Bandenmuster der klinischen *E. cloacae*-Isolate und der *E. cloacae*-Umweltisolate wurde nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und anschließender PFGE mithilfe der Software GelCompar II erstellt. Links zeigt der phylogenetische Baum den Grad der Übereinstimmung der Bandenmuster in Prozent an, rechts sind die Isolatnummern aufgeführt. Das Isolat ATCC 700323 diente als Referenzstamm.

b, PFGE-Cluster ENT-B; e, PFGE-Cluster ENT-E.

Die Umweltisolate *P. oleovorans*, *P. nitroreducens*, *C. amalonaticus* und *A. bereziniae* wurden als Einzelkeime nur dem S1-Verdau zur Bestimmung der genetischen Lokalisation des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens zugeführt.

### 3.2.3 Genetische Lokalisation des Resistenzgens *bla*<sub>GIM-1</sub>

Das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub> ist bei der Mehrheit der Umweltisolate auf dem bakteriellen Genom lokalisiert. Bei fünf Umweltisolaten ist *bla*<sub>GIM-1</sub> zusätzlich auf einem bzw. zwei Plasmiden vorhanden. In der *P. aeruginosa*-Gruppe weisen lediglich zwei Umweltisolate (1562-1, 1564-h) ein jeweils 25 kb großes Plasmid auf (Abb. 15). Das von der Station IN5 isolierte *E. cloacae*-Isolat 3678 hat als einziges Umweltisolat zwei Plasmide, jeweils 25 und 220 kb groß. Das *C. freundii*-Umweltisolat 2157 trägt das Resistenzgen *bla*<sub>GIM-1</sub> ausschließlich auf einem 260 kb großen Megaplasmid (67). Das *A. bereziniae*-Isolat 1564-2 beherbergt das Resistenzgen sowohl auf seinem Chromosom als auch auf einem 360 kb großen Megaplasmid.



**Abb. 15: Ausgewählte klinische Isolate und Umweltisolate mit ihren Plasmiden**

Das linke Bild zeigt das Gel nach Durchführung der PFGE ausgewählter klinischer Isolate sowie Umweltisolate. Das rechte Bild zeigt das gleiche Gel nach Markierung mit der <sup>32</sup>P-*bla*<sub>GIM-1</sub>-Sonde. Nach Bindung der Sonde an die DNA der Plasmide werden diese nach der Autoradiographie sichtbar. Die roten Kreise kennzeichnen die Plasmide, rechts davon ist mit Pfeilen die Größe der jeweiligen Plasmide in kb aufgeführt. Linksseitig vom ersten Gelbild sind die DNA-Größen in kb angegeben, sie sind jeweils den einzelnen Abschnitten der DNA-Leiter zugeordnet. Die Zahlen unterhalb der Gelbilder sind Isolatnummern, welche den Bandenmustern der jeweiligen Isolate zugeordnet sind.

#### 4. Diskussion

Epidemiologisch-mikrobiologische Surveillance umfasst die kontinuierliche systematische Erhebung, Analyse und Interpretation der Gesamtprävalenz und Inzidenz nosokomialer Infektionen und multiresistenter Erreger mit dem Ziel, Maßnahmen zu ihrer Reduktion und Prävention zu entwickeln, sie umzusetzen und anschließend zu bewerten (68). Surveillance ist nach § 23 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) gesetzlich gefordert und verpflichtend für Leiter medizinischer Einrichtungen. Hierzu zählt sowohl ambulante wie auch stationäre klinische und präklinische Patientenversorgung, einschließlich der Einrichtungen für Vorsorge sowie Rehabilitation und des öffentlichen Dienstes (69). In Deutschland existieren mehrere Surveillance-Systeme. Das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) am nationalen Referenzzentrum für nosokomiale Infektionen ist das umfangreichste. Es befähigt Krankenhäuser, freiwillig eine Surveillance von nosokomialen Infektionen und MRE sowie u. a. des Verbrauchs von Antibiotika und Händedesinfektionsmittel im Sinne eines internen Qualitätsmanagements durchzuführen. Grundsätzlich kann mithilfe der verschiedenen KISS-Module die Surveillance bezogen auf das gesamte Krankenhaus sowie einzelne Stationen erfolgen, d. h. für Normal- oder Intensivstation. Anschließend können die Daten mit anderen Krankenhäusern verglichen werden. Die MRGN-Surveillance findet nur stationsbezogen statt (70). Ein weiteres Surveillance-System ist das Nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger. Mikrobiologische Labore deutschlandweit können auf freiwilliger Basis Isolate mit Verdacht auf das Vorliegen einer Carbapenemase an das NRZ zur weiteren Abklärung einsenden. Im Fall von bereits nachgewiesener Carbapenemase kann das NRZ weitere Untersuchungen zur genauen Differenzierung veranlassen.

In Deutschland verzeichnet das NRZ für gramnegative Erreger eine mit jedem Jahr zunehmende Inzidenz von Carbapenemasen in eingesendeten Isolaten. OXA-48 ist seit Jahren die häufigste Carbapenemase, dicht gefolgt von VIM-1, KPC-2 und NDM-1. Sie alle kommen in *Enterobacterales* vor. Dagegen wurde im Jahr 2019 nur bei 18,8 % der ans NRZ für gramnegative Erreger übermittelten Carbapenem-resistenten *P. aeruginosa*-Isolate eine Carbapenemase detektiert (33). Es ist bekannt, dass die Carbapenem-Resistenz in *P. aeruginosa* auf verschiedenen gleichzeitig auftretenden Mechanismen beruhen kann, u. a. dem Vorhandensein intrinsischer  $\beta$ -Laktamasen, der Veränderung der Membrandurchgängigkeit durch Verlust von Porinen oder Überexpression von Effluxpumpen (71). In *P. aeruginosa* ist seit Jahren VIM-2 die am häufigsten nachgewiesene Carbapenemase. GIM-1 ist die zweithäufigste Carbapenemase in *P. aeruginosa* – allerdings mit einer sehr niedrigen Inzidenz. Im Jahr 2019 wurde sie bei 20 der an das NRZ übermittelten *P. aeruginosa*-Isolate nachgewiesen (33), das entspricht lediglich 1 %.

Nach erstmaliger Detektion von GIM-1 in *P. aeruginosa* (34, 36, 39) wird diese MBL immer häufiger in *Enterobacterales* nachgewiesen (35, 37, 42). Die letzte Erwähnung von GIM-1 erfolgte 2018 im Zusammenhang mit einem klinischen Ausbruch, dabei handelte es sich um einen GIM-1-tragenden *Enterobacter hormaechei* ssp. *steigerwaltii* (43). Diese Entwicklung kann bei den durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Düsseldorf gesammelten klinischen GIM-1-Isolaten (Kapitel 3.1, Tab. 7) wie auch bei den im Rahmen dieser Arbeit detektierten GIM-1-Umweltisolaten (Kapitel 3.2.2, Tab. 12) nachvollzogen werden. Im Rahmen der Umweltuntersuchung wurde *bla*<sub>GIM-1</sub> in einigen Bakterienspezies erstmalig nachgewiesen: in der Gruppe der Nonfermenter in *P. oleovorans*, *P. nitroreducens*, *S. maltophilia* sowie *A. bereziniae*. In der Gruppe der *Enterobacterales* ist *C. amalonaticus* erstmalig als *bla*<sub>GIM-1</sub>-Träger detektiert worden (Abb. 9). Das Vorkommen in unterschiedlichen Bakterienspezies spiegelt die genetische Mobilität des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens wider. Zum aktuellen Zeitpunkt zeigt das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen trotz des erstmaligen Auftretens in Ägypten im Zeitraum von 2013 bis 2016 (46, 47, 51) erfreulicherweise keine Tendenz zur weiteren geografischen Ausbreitung.

Die Inzidenz von Carbapenem-resistenten *Enterobacterales* (CRE) nimmt weltweit zu und ist beunruhigend, denn die therapeutischen Optionen sind trotz Neuzulassungen antimikrobieller Substanzen, wie Ceftazidim/Avibactam und Ceftazolan/Tazobactam, weiterhin eingeschränkt (19, 72). Zudem ist eine steigende Resistenzentwicklung gegen andere bereits etablierte Reserveantibiotika, z. B. gegen Colistin, zu beobachten (73, 74). Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten klinischen GIM-1-tragenden Isolate waren bis auf die beiden *S. marcescens*-Isolate M9 und M11 sensibel auf Colistin. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewandten Resistenztestung mittels E-Test nach der aktuellen Version von EUCAST aus dem Jahr 2021 die MHK-Mikrodilutionsmethode als die Methode der Wahl zur Resistenztestung auf Colistin empfohlen wird.

Des Weiteren verzeichnet das NRZ für gramnegative Erreger in den letzten Jahren einen Anstieg von Isolaten mit Produktion von mehr als einer Carbapenemase (33). Tamma et al. haben in ihrer Arbeit die Mortalitäten von Patienten mit einer Bakteriämie verglichen, welche durch Carbapenem-resistente *Enterobacterales* jeweils mit und ohne nachgewiesener Carbapenemase verursacht worden war. Ausgehend von ihren Ergebnissen vermuten sie, dass CRE, welche eine Carbapenemase besitzen, virulenter sein könnten als CRE ohne eine Carbapenemase. Sie schlussfolgern, dass im Falle von CRE weitergehende Untersuchungen auf das Vorliegen einer Carbapenemase unabdingbar seien: Es müsse verhindert werden, dass neu zugelassene Substanzen mit antimikrobiellen Mechanismen gegen Carbapenemasen bei CRE ohne Carbapenemase-Nachweis zur Anwendung kämen, um eine Resistenzentwicklung abzuwenden (75).

Die Resistenzgene für die Kodierung von Carbapenemasen können sowohl im bakteriellen Genom integriert sein als auch auf mobilen genetischen Elementen, wie Plasmiden oder Integrons, vorkommen, so auch im Falle von *bla*<sub>GIM-1</sub>. Die horizontale Übertragung durch Plasmid-vermittelten Gentransfer ermöglicht eine Ausbreitung der Resistenzgene innerhalb der eigenen und zwischen unterschiedlichen bakteriellen Spezies. In der erstmaligen Beschreibung und Untersuchung der Metallo-β-Laktamase GIM-1 belegten Castanheira et al. die Präsenz von *bla*<sub>GIM-1</sub> auf dem 22 kb großen Plasmid des *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms M0, konnten jedoch keinen Erfolg bei der Konjugation feststellen (34). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Konjugationsexperimente der klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Isolate konnten nur im Falle des *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden *E. coli* M17 als Donor- und des *E. coli* C600 als Akzeptorkeim einen erfolgreichen *In-vitro*-Gentransfer bestätigen (Kapitel 3.1.2). Die Anwendung des gleichen Konjugationsmodells und -methode bei der Konjugation der Umweltkeime durch die Arbeitsgruppe war ebenfalls nur in einem Fall erfolgreich: der Donorkeim war das *C. freundii*-Isolat 2157-0 (41).

Konjugationsexperimente werden häufig im Rahmen von Charakterisierungen von Carbapenemasen durchgeführt und dienen der Simulation einer *In-vitro*-Genübertragung. Das in dieser Arbeit verwendete Konjugationsmodell mit den Akzeptorkeimen *E. coli* J53 und *E. coli* C600, auch als *E. coli* K-12 bekannt (76), ist ein etabliertes Konjugationsmodell und wurde häufig in anderen Arbeiten verwendet (57, 77–79). Für die Akzeptoren *E. coli* J53 und *E. coli* C600 ist belegt, dass ihre Bereitschaft zur Aufnahme von Plasmiden hoch ist, dies hat sich unter experimentellen Bedingungen über viele Jahre hinweg bewährt (80, 81). Unter Anwendung von zwei unterschiedlichen Konjugationsmethoden ist es Hamprecht et al. in ihrer Arbeit gelungen, positive Ergebnisse bei der Konjugation von zwei *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden *E. cloacae*-Isolaten als Donorkeime zu erzielen (37). Jedes *E. cloacae*-Isolat verfügte über ein *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragendes Plasmid unterschiedlicher Größe. Als Akzeptor wurde wie im Rahmen dieser Arbeit der *E. coli* J53 verwendet. Mithilfe einer in Flüssigkultur durchgeführten Konjugation konnte für beide Plasmide eine Übertragung in den *E. coli* J53 erreicht werden. Zudem konnte unter Anwendung einer Elektroporationsmethode das 24 kb große und damit das kleinere der beiden *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Plasmide in ein *P. aeruginosa*-Akzeptorkeim übertragen werden (37). Bei dieser Methode kommt es nach Anlegen eines elektrischen Feldes zur vorübergehenden Porenbildung in der bakteriellen Membran, wodurch der Durchtritt exogener DNA ermöglicht wird (82, 83). Bezogen auf die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Konjugationsexperimente muss erwähnt werden, dass die Methode zur Detektion von Plasmiden in den Donorkeimen durch die Arbeitsgruppe später angewendet worden ist. Die Information, dass das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Resistenzgen in einigen klinischen Isolaten auf einem Plasmid lokalisiert ist, lag vor Durchführung der Konjugationsexperimente nicht vor. Des Weiteren ist zu erwägen, inwiefern im nächsten Schritt eine weitere Untersuchung bezüglich der Art der Plasmide durch Sequenzierung sinnvoll ist. Das Ergebnis eines Konjugationsversuchs ist wesentlich von der Art des vorhandenen

Plasmids abhängig. Nur konjugierbare Plasmide sind aus eigenem Antrieb heraus durch Konjugation übertragbar. Weiterhin unterscheiden sich Plasmide in Bezug auf ihre Wirtsspezifität: Konjugierbare Plasmide mit breiter Wirtsspezifität können innerhalb von unterschiedlichen bakteriellen Spezies weitergegeben werden. Dagegen können konjugierbare Plasmide mit schmaler Wirtsspezifität nur zwischen eng verwandten bakteriellen Spezies bzw. innerhalb der gleichen Gruppe übertragen werden (29), z. B. innerhalb von *Enterobacteriales*. Es bestätigt sich, dass der Erfolg von Konjugationsexperimenten wesentlich von der Spezies des Donor- und Akzeptorkeims abhängt; die Konjugation innerhalb gleicher oder ähnlicher Spezies war im o. g. Fall im Rahmen dieser Arbeit sowie in anderen Publikationen betreffend andere Resistenzgene erfolgreich (37, 77, 84).

Die von der Arbeitsgruppe im späteren Verlauf durchgeführten genotypischen Untersuchungen der klinischen Isolate konnten das von Castanheira et al. beschriebene 22 kb große *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragende Plasmid des *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms M0 nicht nachweisen. Möglicherweise ist das Plasmid im Laufe der Subkultivierung und Lagerung nicht mehr in den Bakterien vorhanden. Diese Hypothese wird gestützt durch den Nachweis des o. g. Plasmids im genetischen Klon des M0-Ausbruchsstamms, dem klinischen *P. aeruginosa*-Isolat M58, welcher zum gleichen Cluster PSA-A zählt. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit ein 25 kb großes *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragendes Plasmid in den *P. aeruginosa*-Umweltisolaten 1562-1 und 1564-h nachgewiesen werden (Abb. 15). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Lokalisation des *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gens in Umweltisolaten untersucht, und die Größe der festgestellten Plasmide wurde bestimmt. Eine weitere Charakterisierung der Plasmide im Sinne einer Plasmidsequenzierung ist hier nicht erfolgt. Zwischenzeitlich wurde ein 26 kb großes *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragendes Plasmid des klinischen Isolats *E. cloacae* M15 durch Wendel et al. sequenziert. Das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Resistenzgen dieses Isolats befindet sich auf einem Klasse-1-Integron In770, welches in ein Tn6061-like Transposon eingebettet ist (GenBank-Zugangsnummer: KC511628.1).

In einigen Umweltisolaten wurde das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen neben der Lokalisation im bakteriellen Genom auch in Plasmiden detektiert, welche unterschiedlich groß sind. Die Größenunterschiede hängen mit dem Erwerb und Verlust von mobilen genetischen Elementen zusammen. Besondere Aufmerksamkeit bei der Weitergabe von Resistenzen gilt den Integrons, die als mobile DNA-Elemente in Genkassetten eingebaute Resistenzgene beherbergen und mithilfe von Transposons an Plasmide übertragen können. Bei erstmaliger Erwähnung durch Castanheira et al. wurde *bla*<sub>GIM-1</sub> in einem 6 kb großen Klasse-1-Integron In77 beschrieben (34). Die Arbeitsgruppe von Wendel et al. führte molekulargenetische Untersuchungen mit den in dieser Arbeit aufgeführten Umweltisolaten durch: Das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Gen wurde in zwölf unterschiedlichen Klasse-1-Integrons gefunden (41). Ein Klasse-1-Integron ist üblicherweise aus einem Integrase-kodierenden *IntI1*-Gen, einer *attC*-Rekombinationsstelle sowie einem Promotor aufgebaut (85). Von den zwölf detektierten Integrons

sind fünf Integrons durch die Arbeitsgruppe bereits in klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-Isolaten festgestellt worden: Vier Integrons In77b, In851, In852, In853 wurden in den klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-Isolaten neu detektiert (39), das Integron In77 war zuvor von Castanheira et al. beschrieben worden (34). Bei den sieben neuen in den Umweltisolaten entdeckten Integrons handelt es sich um In1014, In1016, In1238, In1239, In1240, In1241 und In1242. Hiervon wurden die Integrons In1014, In1241 und In1242 in *P. aeruginosa*-Umweltisolaten festgestellt. Im *C. freundii*-Umweltisolat 2157-0 wurde mit dem Integron In852b eine neue Variante des zuvor im klinischen Isolat *E. coli* M17 beschriebenen Integrons In852 vorgefunden, das Integron In852b wies jedoch die Insertionssequenz IS1600Δ nicht mehr auf (41). Der Struktur der Integrons der klinischen Isolate und der Umweltisolate ist gemein, dass stromabwärts vom *IntI1*-Gen die Gene *bla*<sub>GIM-1</sub> und *aacA4* als fusionierte Genkassette zusammen auftreten. Diese strukturelle Gemeinsamkeit findet sich in der überwiegenden Anzahl der Integrons und weist auf eine erhöhte Mobilität dieser fusionierten Genkassette hin (39, 41). Das *aacA4*-Gen kodiert eine Aminoglykosid-Acetyltransferase, welche eine Resistenz gegenüber Netilmicin, Gentamicin und Tobramycin vermittelt (34). Des Weiteren wurden in zwei Integrons von Umweltisolaten Insertionssequenzen nachgewiesen, die bereits in klinischen Isolaten dokumentiert worden waren. Hierbei handelt es sich um die im *aadA1*-Gen vorkommende Insertionssequenz IS1394, die in den Integrons In77 und In77b der klinischen *P. aeruginosa*-Isolate und im Integron In1241 der Umweltisolate *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. nitroreducens* nachgewiesen wurde. Die im *bla*<sub>OXA-2</sub>-Gen vorkommende Insertionssequenz IS1600Δ wurde im Integron In852 des klinischen Isolats *E. coli* M17, im Integron In1014 des Umweltisolats *P. aeruginosa* und im Integron In1241 der Umweltisolate *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. nitroreducens* festgestellt (39, 41).

Der Nachweis von gemeinsamen Insertionssequenzen in *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden klinischen sowie Umweltisolaten deutet darauf hin, dass ein genetischer Übertragungsmechanismus stattgefunden hat. Aufgefallen ist, dass Integrons der Umweltisolate zwei bis vier und damit mehr Genkassetten als die Integrons der klinischen Isolate beherbergen. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass Erreger in der Umwelt mobile genetische Elemente sammeln, welche Resistenzgene enthalten. Die hohe Anzahl der in Umweltisolaten nachgewiesenen Integrons und die Mehrzahl an Genkassetten im Vergleich zu klinischen Isolaten lassen darauf schließen, dass die Umweltisolate einen sehr regen Austausch von Resistenzgenen pflegen und Resistenzgene akkumuliert werden. Das Vorhandensein von mehreren unterschiedlichen Insertionssequenzen in den Integrons der Umweltisolate bestätigt dies ebenfalls und weist auf eine hohe genetische Variabilität und Plastizität der Integrons hin.

Die Ausbreitung von Resistenzgenen mithilfe von mobilen genetischen Elementen, insbesondere von Plasmiden, ist ursächlich für Carbapenemase-assoziierte Ausbrüche im klinischen Alltag. Durch Verbreitung eines Resistenzgens über unterschiedliche bakterielle Spezies hinweg entstehen polyklonale Ausbrüche (86, 87). Bei den monoklonalen Ausbrüchen handelt es sich um die

Ausbreitung eines bakteriellen Klons, welcher ein Carbapenemase-Träger ist. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden ermöglichten den erstmaligen Nachweis eines protrahierten monoklonalen klinischen Ausbruchsgeschehens mit *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden *P. aeruginosa* assoziiert mit der unmittelbaren klinischen Umgebung des Patienten. Im Rahmen der Umweltuntersuchungen auf der chirurgischen Intensivstation des UKD wurden insgesamt elf Isolate entdeckt, welche nach Genotypisierung als Klone des in dieser Arbeit als Isolat M0 bezeichneten *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms identifiziert worden sind. Diese Isolate wurden aus Umweltproben von neun Waschbeckensiphons der Patientenzimmer, einem Waschbeckensiphon eines Arbeitsraums und einer Haarwaschwanne detektiert (40). Die Diskrepanz zum in der gemeinsamen Publikation von Wendel et al. aufgeführten Nachweis des Ausbruchsstamms in neun Isolaten kommt durch die strengere Einstellung bei der Auswertung durch die Software GelCompar II für die Publikation zustande: Dabei wurden eine Positionstoleranz von 1 %, Optimierung von 0,5 % sowie die Clusterdefinition ab 90 % Bandenmusterübereinstimmung vorgenommen (41).

Die Studienlage belegt, dass das Wassersystem des Krankenhauses eine relevante Quelle für Erreger darstellt. Hieraus findet eine Übertragung auf immunkompromittierte und kritisch kranke Patienten statt assoziiert mit dem Auftreten nosokomialer Infektionen (88–90). Mehrheitlich handelt es sich bei den isolierten *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Umweltisolaten um sog. „Wasser- bzw. Nasskeime“, die vorwiegend in feuchter Umgebung vorkommen. Es kommt zur Bildung von Biofilmen, in denen diese Keime persistieren. Durch horizontalen Gentransfer tauschen sie ihre Resistenzen untereinander aus, durch vertikalen Gentransfer werden die Resistenzen an die nächste Generation weitergegeben. Der horizontale Gentransfer findet hauptsächlich durch Konjugation, genauer den Plasmid-vermittelten Gentransfer statt, welcher als ursächlich für Ausbruchsgeschehen konstatiert worden ist (91–93). Die Vielfalt der bakteriellen Spezies der in dieser Arbeit detektierten Umweltisolate sowie der Nachweis von *bla*<sub>GIM-1</sub> auf fünf verschiedenen Plasmiden unterschiedlicher Größe (Abb. 15) deuten auf ein hohes Potenzial des Gentransfers in Biofilmen hin (41, 94). Es wurde bereits berichtet, dass die strukturelle Beschaffenheit der Biofilme aufgrund der dort herrschenden hohen Populationsdichte den Plasmid-vermittelten Gentransfer begünstigt, wodurch die Struktur der bestehenden sowie die Bildung neuer Biofilme gefördert wird (94, 95). In seiner experimentellen Arbeit mit *E. coli* schlussfolgerte Ghigo, dass das F-Pilus konjugierbarer Plasmide als Adhäsionsfaktor zum Wachstum der Biofilme beitrage, wodurch konjugierbare Plasmide die Wahrscheinlichkeit der eigenen Übertragung in mehrere Erreger erhöhten (96). Madsen et al. berichteten davon, dass Biofilme die Stabilität der Plasmide begünstigten (95). Zusammenfassend zeigt sich, dass der Plasmid-vermittelte Gentransfer und die Biofilmbildung sowie -struktur ein sich gegenseitig verstärkendes System darstellen. Für Resistenzgene akkumulierende Umwelterreger ist dies mit einem Überlebensvorteil verbunden, da sie durch die Existenz in einem Biofilm vor chemischen und physischen Einflüssen geschützt sind und ihre Resistenzen ungehindert

untereinander austauschen können. Dies sind sowohl Resistenzen gegen Antibiotika als auch gegen Wirkstoffe von Desinfektionsmitteln (97). Offensichtlich ist, dass in Biofilmen Faktoren vorliegen, die den *in vivo* stattfindenden Plasmid-vermittelten Resistenztransfer ermöglichen und fördern, die jedoch *in vitro* im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Konjugationsexperimente der klinischen Isolate nicht nachgebildet werden können. Zusammenfassend sind Biofilme aufgrund der o. g. Aspekte als ein relevantes Risiko für nosokomiale Ausbrüche zu werten.

Unvorteilhaft konzipierte Raumgestaltung wurde in zahlreichen Arbeiten als relevanter Faktor für die Entstehung von klinischen Ausbrüchen thematisiert. Hota et al. zeigten, dass dadurch auf einer Intensivstation in Toronto ein Ausbruch mit multiresistentem *P. aeruginosa* und folglich nosokomiale Infektionen begünstigt wurden mit signifikanter Steigerung der Morbidität und Mortalität (98). Im Rahmen von Pflegemaßnahmen wird das nach Patientenkontakt kontaminierte Wasser im Waschbecken entsorgt, wodurch Biofilme zerreißen (98, 99). Die abgesprengten Biofilmtelchen werden durch das spritzende Wasser in der Umgebung verteilt und gelangen auf Pflegeutensilien oder die Hände des Pflegepersonals. Mithilfe von fluoreszierendem Marker wiesen Hota et al. eine Reichweite der mit Biofilmen kontaminierten Wasserspritzer ausgehend vom Waschbeckenausguss von bis zu einem Meter nach. Die von Hota et al. untersuchte Intensivstation in Toronto zeigte einen ähnlichen Einzelzimmeraufbau wie die in dieser Arbeit untersuchte Intensivstation. Anders als auf der chirurgischen Intensivstation des UKD befand sich das Waschbecken der untersuchten Intensivstation in Toronto jedoch unmittelbar am Medikamententisch sowie mit einem Abstand von 1,3 m näher am Patientenbett (98). Wie bereits berichtet, überlebt *P. aeruginosa* auf Oberflächen zwischen 6 Stunden und 16 Monaten (100), somit kommen Oberflächen durchaus als weitere Kontaminationsquelle in Betracht oder deuten auf einen möglichen Übertragungsweg hin. Dies konnte auch im Rahmen der Umweltuntersuchungen dieser Arbeit bestätigt werden: 2012 und 2013 wurde das *bla*<sub>GIM-1</sub>-Resistenzgen in einigen wenigen Proben nachgewiesen, welche von Oberflächen entnommen worden waren (Kapitel 3.2, Tab. 10 und 11).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach Einführung der neuen Hygienemaßnahmen 2012 keine klinischen *bla*<sub>GIM-1</sub>-positiven Isolate im Patientenmaterial der chirurgischen Intensivstation mehr festgestellt. Die Beprobung im Jahr 2013 zeigte allerdings die Persistenz der *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Keime in den Ausgüssen der Waschbecken, sodass eine erneute Kontamination der neuen Abflüsse nach Austausch der Waschbeckensiphons anzunehmen war. Biofilme können sich über komplette Rohr- bzw. Abwassersysteme erstrecken und haben eine hohe Widerstandsfähigkeit. Mehrere Arbeiten zeigten, dass diese durch chemische und thermische Maßnahmen sehr erschwert bis gar nicht zu beseitigen sind (91, 98, 101–103). Hota et al. konnten den Ausbruch durch Änderung der Raumgestaltung sowie Installation eines speziellen Spritzschutzes in den Waschbecken beenden (98). Dagegen veranschaulichte die Arbeit von Vergara-López et al., dass die Entfernung bzw.

Umleitung eines kompletten horizontal ausgerichteten Abflusssystemes notwendig wurde, um im Fall einer MBL-produzierenden *K. oxytoca* den Ausbruch zu unterbinden (102). Hopman et al. gingen noch einen Schritt weiter: Nach einem im Jahr 2014 stattgefundenen Ausbruch mit einem ESBL-bildenden *E. cloacae* wurden auf einer niederländischen Intensivstation alle Waschbecken aus den Patientenzimmern entfernt, und Pflegemaßnahmen unter Vermeidung des direkten Wasserkontakts wurden eingeführt, u. a. wurde in Flaschen abgefülltes Wasser zur Medikamentenverabreichung benutzt. Hierunter wurde eine statistisch signifikant erniedrigte Rate von Patientenkolonisationen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien festgestellt (104). Nicht selten sind mehrere Maßnahmen notwendig, um einen Ausbruch zu beenden (98, 105) oder das Infektionsrisiko zu minimieren. Kossow et al. berichteten in ihrer Publikation, am Zentrum für Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Münster mehrere baulich strukturelle Veränderungen sowie organisatorisch und verhaltensorientierte Maßnahmen zur Infektionsprävention getroffen zu haben, welche gemeinsam zu einer deutlichen Reduktion des Infektionsrisikos sowie der Mortalität verursacht durch multiresistenten *P. aeruginosa* auf der Station der allogenen Stammzelltransplantierten geführt hätten (106). Im Rahmen von ausgedehnten Renovierungsmaßnahmen wurden Waschbecken mit eingebautem Desinfektionsmechanismus in Siphons installiert, welche zur Prävention der Biofilmbildung zusätzlich UV-Licht, Vibration sowie Hitze anwenden. In den Duschen wurden u. a. spezielle leicht zu reinigende Abflüsse installiert, Wasserfilter an Duschköpfe angebracht, zusätzlich wurden Toiletten ohne Spülrand eingebaut. Abgesehen von der Isolation der Patienten sowie der Verbesserung von Handhygienemaßnahmen erfolgte eine aktive Surveillance u. a. durch Patientenscreening, regelmäßige systematische Sammlung von Umweltproben in den Patientenzimmern sowie die tägliche Reinigung der Zimmer mit anschließender Desinfektion unter zusätzlicher Supervision der Maßnahmen durch Hygienefachkräfte (106).

Die Beobachtungen der Hygienefachkräfte während der ersten Umweltuntersuchung auf der chirurgischen Intensivstation des UKD im Jahr 2012 sowie solche in bereits publizierten Studien (107, 108) brachten zutage, dass das Verhalten des Pflegepersonals als zusätzlicher Faktor waschbeckenassoziierte Ausbrüche durch Übertragung von Pathogenen begünstigen kann. Bereits 1991 stellten Döring et al. fest, dass eine Kontamination der Hände des Pflegepersonals mit einem *P. aeruginosa* durch Aerosolbildung während des Händewaschens stattgefunden habe, welcher zuvor in den kontaminierten Abflüssen nachgewiesen worden war (109). Die Entsorgung des nach Patientenpflege kontaminierten Wassers im Waschbecken des jeweiligen Patientenzimmers sowie die Lagerung von Pflege- oder Patientenmaterial im oder in unmittelbarer Nähe des Waschbeckens führten zur Kolonisation der Abflüsse mit pathogenen Erregern. Im nächsten Schritt fand durch Gegenstände oder Hände des Pflegepersonals eine Rückübertragung dieser Erreger zum Patienten statt, welche eine Kolonisation des Patienten mit dem Risiko für Entstehung von Infektionen nach

sich zog. Aufgrund der Tatsache, dass Umweltuntersuchungen in den meisten Fällen erst nach Ausbruch eines nosokomialen Geschehens unternommen werden, ist es nicht möglich, eine definitive Ursache festzustellen: Eine Aussage, ob die kolonisierten Waschbecken tatsächlich Ausbruchsquelle sind oder diese erst während des Ausbruchs kolonisiert worden sind, ist in Anlehnung an das Henne-Ei-Problem nicht zu tätigen. Damit ist der im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Nachweis von elf Umweltisolaten, welche sich nach Genotypisierung als Klone des klinischen *P. aeruginosa*-Ausbruchsstamms M0 bestätigen ließen, ein Hinweis auf einen stattgefundenen umweltassoziierten Ausbruch, jedoch kein Beweis dafür.

Eine große Anzahl von Arbeiten wurde bereits veröffentlicht, die von Ausbrüchen verschiedener Carbapenemasen ausgehend von abwasserassoziierten Systemen des Krankenhauses berichten und ähnliche Umweltuntersuchungen wie die in der vorliegenden Dissertation durchgeführt haben (91, 101, 102, 104). Sie alle haben die Gemeinsamkeit, dass sie sowohl technisch als auch zeitlich aufwendig sind. Ein standardisiertes Verfahren zur Durchführung derartiger Umweltstudien existiert nicht. Das ist einerseits von Vorteil, da der Studienaufbau und die Methoden nach der jeweiligen epidemiologischen Fragestellung ausgerichtet werden können. Andererseits ist es nachteilig, dass ein Vergleich der Umweltstudien untereinander aus demselben Grund nicht möglich ist. Sie alle unterscheiden sich in Bezug auf den experimentellen Aufbau, die Art und Weise der Probensammlung, die Methoden der Keimisolation sowie die genotypischen Methoden.

In ihrer Übersichtsarbeit betreffend die bereits erfolgten Umweltuntersuchungen stellten Kizny Gordon et al. fest, dass *P. aeruginosa* der am häufigsten detektierte Umwelterreger sei, gefolgt von *A. baumannii* und *Enterobacterales*. Als Reservoir für Carbapenemase-produzierende Umwelterreger wurden in den Umweltstudien am häufigsten Abflüsse, Spülbecken sowie Wasserhähne identifiziert (88). Typisierungsmethoden haben einen großen Stellenwert im Hinblick auf epidemiologische Fragestellungen. Kizny Gordon et al. haben in ihrer Übersichtsarbeit die PFGE als die am häufigsten angewandte Typisierungsmethode bestätigt (88). Als lang etablierte und gute Methode der Genotypisierung bietet die PFGE Vorteile aufgrund der hohen Auflösung und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Von Nachteil ist jedoch, dass diese Methode zeitlich und technisch aufwendig ist (110).

Volling et al. analysierten in ihrem Review 52 Umweltstudien auf die Evidenzqualität und konstatierten, dass viele dieser Studien eingeschränkten Beitrag zum Verständnis der potenziellen kausalen Infektionswege sowie zur Entwicklung bestmöglicher Präventionsmaßnahmen leisteten (90). Die Autoren halten es für sinnvoll, Umweltstudien außerhalb von Ausbruchssituationen durchzuführen im Sinne eines prospektiven Screenings der Patienten und der Umwelt, um u. a. die potenziellen kausalen Infektionswege identifizieren, die Liegedauer im Verhältnis zu den kontaminierten Abflusssystemen erfassen und standardisierte Methoden zur Durchführung solcher Studien einführen zu können (90).

Die bisher publizierten Umweltstudien haben häufig gemein, dass, nachdem ein nosokomiales Ausbruchsgeschehen festgestellt, analysiert und eingedämmt worden ist, erst im nächsten Schritt Präventionsmaßnahmen entwickelt und umgesetzt werden. Erst im Jahr 2020 veröffentlichte die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) am Robert Koch-Institut eine Empfehlung zum Umgang mit abwasserführenden Systemen in medizinischen Einrichtungen, welche u. a. Pflegeheime implizieren. Nach Darstellung von u. a. abwasserassozierten Infektionsrisiken und Wirksamkeit abwasserassoziierter Hygienemaßnahmen anhand der gegebenen breiten Studienlage, sind Empfehlungen für Präventionsmaßnahmen aufgeführt. Diese beziehen sich auf Wascheinrichtungen, wie Waschbecken und Duschen, auf Sanitätsanlagen, wie Toiletten und Steckbeckenspüler, zudem auf Abflüsse in zentralen Küchen. Zusätzlich sind Empfehlungen zu Präventionsmaßnahmen bei Ausbrüchen sowie Havariefällen von Abwasserleitungen enthalten (111).

Diese Dissertationsarbeit unterliegt einigen Einschränkungen. Die Sammlung von Carbapenemase-produzierenden klinischen Erregern am Institut erfolgte bis 2008 diskontinuierlich. Erst 2009 wurde eine systematische Erfassung eingeführt (Kapitel 2.2.1.1). Betreffend die Umweltuntersuchungen ist relevant, dass zum Zeitpunkt ihrer Durchführung auf der chirurgischen Intensivstation kein Patientenscreening durch Rektalabstriche auf MRE inkl. MRGN etabliert war. Insofern kann keine Aussage über die Anzahl von kolonisierten asymptomatischen Patienten getroffen werden. Des Weiteren wurde im Studienzeitraum kein Screening des medizinischen Personals auf MRGN durchgeführt. *P. aeruginosa* kommt selten in der bakteriellen Flora gesunder Personen vor (112). Die Studienlage zeigt außerdem, dass das Krankenhauspersonal in der Regel keine relevante Quelle von nosokomialen Ausbrüchen darstellt (15, 102, 113). Es ist jedoch bekannt, dass das medizinische Personal aufgrund von unzureichenden Handhygienemaßnahmen häufig Überträger von nosokomialen Erregern ist und die Verbesserung der Handhygiene das Auftreten nosokomialer Infektionen wesentlich reduziert (114, 115).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Methoden dieser Arbeit die Durchführung einer monozentrischen molekularen Surveillance von multiresistenten Carbapenemase-GIM-1-tragenden *P. aeruginosa* am Universitätsklinikum Düsseldorf ermöglichten. Nach Abschluss der in dieser Arbeit aufgeführten Umweltuntersuchungen wurde die Surveillance bezogen auf multiresistente Carbapenemase-produzierende klinische Erreger fortgeführt genauso wie das seit 2014 auf den Intensivstationen eingeführte Rektalabstrichscreening auf MRE, inkl. 3MRGN und 4MRGN. Auf Intensivstationen wird das Screening erstmalig bei Aufnahme durchgeführt und anschließend wöchentlich wiederholt. Mit Einführung des Rektalabstrichscreenings und damit einhergehendem Erstnachweis der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-2 im Jahr 2014 (50) wurde die Surveillance zusätzlich auf die Detektion dieser MBL in klinischen Carbapenemase-produzierenden Erregern ausgedehnt.

Bei Feststellung von erhöhten Inzidenzen im Rahmen der Surveillance wird durch die Krankenhaushygiene eine Ortsbegehung initiiert mit genauen Untersuchungen zur Ermittlung der Übertragungswege und der Infektionsquelle. Bis zum aktuellen Zeitpunkt gibt es am UKD keinen Nachweis eines ähnlichen klinischen Ausbruchs mit *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden *P. aeruginosa* oder anderem *bla*<sub>GIM-1</sub>-tragenden Erreger ausgehend von unmittelbarer Krankenhausumgebung.

## **5. Schlussfolgerung**

Diese Arbeit verdeutlicht die Wichtigkeit der lokalen epidemiologisch-mikrobiologischen Surveillance. Die Erhebung von epidemiologischen Zusammenhängen in Kenntnis der aktuellen lokalen infektiologischen Situation sowie die molekulargenetische Untersuchung der unmittelbaren Patientenumgebung sind Maßnahmen, die Ausbruchsgeschehen aufzeigen können. Zusätzlich ist eine regelmäßige Beaufsichtigung von bereits etablierten Hygienemaßnahmen sinnvoll. Dabei können Fehlerquellen erfasst werden, aus denen Infektionswege resultieren, z. B. Hygienefehler im Rahmen von Pflegemaßnahmen, mit der Absicht, diese durch gezielte Verhaltensänderungen zu unterbinden. Derartige Umweltuntersuchungen sind in bestimmten Bereichen der stationären Patientenversorgung mit erhöhtem Risiko für MRE wie v. a. auf Intensivstationen, sinnvoll. Es ist eine Überlegung wert, ob sie trotz aufwendiger molekularbiologischer Methoden und Kosten routinemäßig mit dem Ziel der Prävention von Ausbruchsgeschehen durchgeführt werden sollten. Zur Realisierung der Umweltuntersuchungen im Sinne einer internen Qualitätskontrolle bedarf es jedoch der Einführung einer standardisierten Empfehlung bzw. Vorgabe. Diese sollte den Studienaufbau, die Art und Weise der Probensammlung, sowie die anzuwendenden Methoden betreffend die Isolation der Erreger umfassen. Es wäre vorteilhaft, die Methoden zur Genotypisierung auf die Anwendung von einer oder wenigen Methoden zu begrenzen. Aus epidemiologischer Sicht erscheint es ebenfalls sinnvoll, die routinemäßige Charakterisierung der Resistenzgene sowie der mobilen genetischen Elemente vorzunehmen. Hierbei ist das Ziel, genetische Veränderungen im Blick zu behalten, um rechtzeitig Variationen feststellen und bewerten zu können. Der übergeordnete Auftrag und der Vorteil einer standardisierten Vorgabe bestehen darin, eine einheitliche Vorgehensweise zu entwickeln, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse und damit eine Bewertung zu ermöglichen, welche als Grundlage zur Erarbeitung von Präventionsmaßnahmen notwendig sind.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, Robert Koch-Institut. Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS-Definitionen). Robert Koch-Institut. Berlin 2017.
2. Behnke, M., Aghdassi, S. J., Hansen, S., Diaz, L. A. P., Gastmeier, P., Piening, B. The prevalence of nosocomial infection and antibiotic use in german hospitals. *Dtsch Arztebl Int.* 2017; 114(50): 851–857.
3. Welte, T. Pleuropulmonale Infektionen. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. S. 851–858.
4. Stephan, C., Brodt, H. R. Haut- und Weichgewebeinfektionen. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Lehrbuch. 8. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. S. 887–896.
5. Gersdorff, G. v. Harnwegsinfektionen. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. S. 859–864.
6. Gastmeier, P. Nosokomiale Infektionen. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2016. S. 913–915.
7. Geffers, C., Maechler, F., Behnke, M., Gastmeier, P. Multiresistente Erreger – Epidemiologie, Surveillance und Bedeutung. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2016; 51(2): 104–110.
8. Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008; 197(8): 1079–1081.
9. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(1): 1–12.
10. Peterson, L. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(6): 992–993.
11. Zavaski, A. P., Barth, A. L., Gaspareto, P. B., Goncalves, A. L., Moro, A. L., Fernandes, J. F., Goldani, L. Z. Risk factors for nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamase in two tertiary-care teaching hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(4): 882–885.
12. Rodriguez-Acelas, A. L., de Abreu Almeida, M., Engelman, B., Canon-Montanez, W. Risk factors for health care-associated infection in hospitalized adults: Systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* 2017; 45(12): 149–156.
13. Reichard, U., Rettkowski, R., Scheithauer, S. Multiresistente Erreger – Prävention und Diagnostik. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2016; 51(2): 112–119.
14. Pletz, M. W., Eckmann, C., Hagel, S., Heppner, H. J., Huber, K., Kammerer, W., Schmitz, F. J., Wilke, M. et al. Multiresistente Erreger – Infektionsmanagement 2015. *Dtsch Med Wochenschr.* 2015; 140(13): 975–981.
15. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2012; 55(10): 1311–1354.
16. Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., Kapaskelis, A., Falagas, M. E. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(3): 321–331.
17. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut (KRINKO). Definition der Multiresistenz gegenüber Antibiotika bei gramnegativen Stäbchen im Hinblick auf Maßnahmen zur Vermeidung der Weiterverbreitung. *Epidemiologisches Bulletin.* 2011; 36: 336–339.
18. Robert Koch-Institut: EUCAST definiert die Kategorie „I“ im Rahmen der Antibiotika-Resistenzbestimmung neu. *Epidemiologisches Bulletin.* 2019; (9): 81–88.

19. Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Herold, S., Wagenlehner, F. M., Zimmer, K. P., Chakraborty, T. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections. *Dtsch Arztebl Int.* 2018; 115(20–21): 345–352.
20. Maechler, F., Geffers, C., Schwab, F., Pena Diaz, L. A., Behnke, M., Gastmeier, P. Development of antimicrobial resistance in Germany: What is the current situation? *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2017; 112(3): 186–191.
21. Santajit, S., Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 1–8.
22. Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289(1036): 321–331.
23. Bush, K., Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 969–976.
24. Abraham, E. P., Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988; 10(4): 677–678.
25. Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, G. M. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *The Lancet Infectious Diseases.* 2011; 11(5): 381–393.
26. Bebrone, C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74(12): 1686–1701.
27. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2): 306–325.
28. Hall, R. M., Collis, C. M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates.* 1998; 1(2): 109–119.
29. Bennett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 Suppl 1: 347–357.
30. Toleman, M. A., Bennett, P. M., Walsh, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70(2): 296–316.
31. Tato, M., Coque, T. M., Ruiz-Garbajosa, P., Pintado, V., Cobo, J., Sader, H. S., Jones, R. N., Baquero, F. et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007; 45(9): 1171–1178.
32. Rogers, B. A., Aminzadeh, Z., Hayashi, Y., Paterson, D. L. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(1): 49–56.
33. Pfennigwerth, N. Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger, 2019. *Epidemiologisches Bulletin.* 2020; 26: 3–10.
34. Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., Walsh, T. R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4654–4661.
35. Rieber, H., Frontzek, A., Pfeifer, Y. Emergence of metallo-beta-lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(9): 4945–4947.
36. Rieber, H., Frontzek, A., von Baum, H., Pfeifer, Y. Emergence of metallo-beta-lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine-Westphalia, Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(4): 1043–1045.
37. Hamprecht, A., Poirel, L., Gottig, S., Seifert, H., Kaase, M., Nordmann, P. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(3): 558–561.
38. Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A. B., Rossler, S., Lang, U., et al. Description of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(1): 81–84.
39. Wendel, A. F., Brodner, A. H., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeiffer, K., Toleman, M. A., MacKenzie, C. R. Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(10): 5162–5165.
40. Wendel, A. F., Kolbe-Busch, S., Ressina, S., Schulze-Robbeke, R., Kindgen-Milles, D., Lorenz, C., Pfeiffer, K., MacKenzie, C. R. Detection and termination of an extended low-frequency

hospital outbreak of GIM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Germany. *Am J Infect Control*. 2015; 43(6): 635–639.

41. Wendel, A. F., Ressina, S., Kolbe-Busch, S., Pfeffer, K., MacKenzie, C. R. Species diversity of environmental GIM-1-producing bacteria collected during a long-term outbreak. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82(12): 3605–3610.

42. Wendel, A. F., Kaase, M., Autenrieth, I. B., Peter, S., Oberhettinger, P., Rieber, H., Pfeffer, K., MacKenzie, C. R. et al. Protracted regional dissemination of GIM-1-producing *Serratia marcescens* in Western Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(3).

43. Wendel, A. F. Long-term, low-frequency cluster of a German-Imipenemase-1-producing *Enterobacter hormaechei* ssp. *steigerwaltii* ST89 in a tertiary care hospital in Germany. *Microb Drug Resist*. 2018; 24(9): 1305–1315.

44. Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., Walsh, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50(5): 673–679.

45. Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Al Naiemi, N., Debets-Ossenkopp, Y. J., Nordmann, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(6): 2420–2424.

46. Hashem, H., Hanora, A., Abdalla, S., Shaeky, A., Saad, A. Dissemination of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt: mutation in *bla<sub>VIM-4</sub>*. *APMIS*. 2017; 125(5): 499–505.

47. Abdeltwab, N. M., Emara, M., El-Mahdy, T. S., El-Magd, M. A., Moustafa, W. H., El-domany, R. A. First report of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates harboring *bla<sub>GIM-1</sub>* Gene in the Middle East region. *N Egypt J Microbiol* 2019; 52: 105–112.

48. Manohar, P., Babu, S., Bozdogan, B., Ramesh, N. Identification of *bla<sub>DIM-1</sub>* metallo-beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Tamil Nadu, India. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 13: 7–8.

49. Tada, T., Hishinuma, T., Watanabe, S., Uchida, H., Tohya, M., Kuwahara-Arai, K., Mya, S., Zan, K. N. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(5).

50. Wendel, A. F., MacKenzie, C. R. Characterization of a novel metallo-beta-lactamase variant, GIM-2, from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(3): 1824–1825.

51. Alkasaby, N. M., El Sayed Zaki, M. Molecular study of *Acinetobacter baumannii* isolates for metallo-beta-lactamases and extended-spectrum-beta-lactamases genes in intensive care unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *Int J Microbiol*. 2017; 2017: 3925868.

52. Swayne, R. L., Ludlam, H. A., Shet, V. G., Woodford, N., Curran, M. D. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo-(class A and D) carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 38(1): 35–38.

53. Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19: 6823–6831.

54. Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S., Speert, D. P. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(5): 1129–1135.

55. Madico, G., Akopyants, N. S., Berg, D. E. Arbitrarily Primed Pcr DNA-Fingerprinting of Escherichia-Coli O157/H7 Strains by Using Templates from Boiled Cultures. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(6): 1534–1536.

56. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. Zugriffsdatum 01.03.2013. Im Internet: <http://www.eucast.org>.

57. Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., Toleman, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(5): 355–362.

58. Anuj, S. N., Whiley, D. M., Kidd, T. J., Bell, S. C., Wainwright, C. E., Nissen, M. D., Sloots, T. P. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63(2): 127–131.
59. Hardegen, C., Messler, S., Henrich, B., Pfeffer, K., Würthner, J., MacKenzie, C. R. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2010; 9:5.
60. Kamolovit, W., Higgins, P. G., Paterson, D. L., Seifert, H. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(4): 959–963.
61. Maule, J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol.* 1998; 9(2): 107–126.
62. Vogt, V. M. Purification and properties of S1 nuclease from *Aspergillus*. *Methods in Enzymology.* 1980; 65: 248–255.
63. Barton, B. M., Harding, G. P., Zuccarelli, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226(2): 235–240.
64. Silbert, S., Boyken, L., Hollis, R. J., Pfaller, M. A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(4): 619–621.
65. O'Reilly, L. C. A method for overcoming DNA degradation during PFGE for *Serratia marcescens*. *J Microbiol Methods.* 2011; 85(2): 173–174.
66. Römling, U., Tümmler, B. Achieving 100 % typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 464–465.
67. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9): 2233–2239.
68. Surveillance von nosokomialen Infektionen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2020; 63(2): 228–241.
69. Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 4a des Gesetzes vom 21. Dezember 2020 (BGBl. I S. 3136) geändert worden ist. BGBl. Zugriffsdatum: 16.01.2021. Im Internet: [http://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/\\_23.html](http://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/_23.html).
70. Maechler, F. Surveillance von Infektionserregern am Beispiel der Erregersurveillance im KISS. *Krankenhaushygiene up2date.* 2018; 13(02): 227–246.
71. Poole, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011; 2: 65.
72. Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(5): 413–431.
73. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(2): 161–168.
74. Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(27).
75. Tamma, P. D., Goodman, K. E., Harris, A. D., Tekle, T., Roberts, A., Taiwo, A., Simner, P. J. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2017; 64(3): 257–264.
76. Poirel, L., Girlich D., Nass, T., Nordmann, P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001: 447–453.
77. Liu, J., Li, G. M., Lin, L. Y., Wu, X. L., Huang, S. L., Zhou, Y., Zhao, Z. G. Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Exp Ther Med.* 2016; 11(1): 269–276.

78. Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T. A., Gatermann, S. G., Bonnin, R. A., Poirel, L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(6): 1260–1262.
79. Gottig, S., Gruber, T. M., Stecher, B., Wichelhaus, T. A., Kempf, V. A. In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(12): 1808–1815.
80. Yi, H., Cho, Y. J., Yong, D., Chun, J. Genome sequence of *Escherichia coli* J53, a reference strain for genetic studies. *J Bacteriol.* 2012; 194(14): 3742–3743.
81. Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(1): 1–9.
82. Cadoret, F., Soscia, C., Voulhoux, R. Gene transfer: transformation/electroporation. *Methods Mol Biol.* 2014; 1149: 11–15.
83. Smith, A. W., Iglewski, B. H. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(24): 10509.
84. Hawkey, P. M., Xiong, J., Ye, H., Li, H., M'Zali, F. H. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 194(1): 53–57.
85. Fluit, A. C., Schmitz, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(4): 272–288.
86. Schweizer, C., Bischoff, P., Bender, J., Kola, A., Gastmeier, P., Hummel, M., Klefisch, F. R., Schoenrath, F. et al. Plasmid-mediated transmission of KPC-2 carbapenemase in *Enterobacteriaceae* in critically ill patients. *Front Microbiol.* 2019; 10: 276.
87. Hamprecht, A., Sommer, J., Willmann, M., Brender, C., Stelzer, Y., Krause, F. F., Tsvetkov, T., Wild, F., et al. Pathogenicity of clinical OXA-48 isolates and impact of the OXA-48 IncL plasmid on virulence and bacterial fitness. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2509.
88. Kizny Gordon, A. E., Mathers, A. J., Cheong, E. Y. L., Gottlieb, T., Kotay, S., Walker, A. S., Peto, T. E. A., Crook, D. W. et al. The hospital water environment as a reservoir for carbapenem-resistant organisms causing hospital-acquired infections – a systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2017; 64(10): 1435–1444.
89. Hayward, C., Ross, K. E., Brown, M. H., Whiley, H. Water as a source of antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. *Pathogens.* 2020; 9(8).
90. Volling, C., Ahangari, N., Bartoszko, J. J., Coleman, B. L., Garcia-Jeldes, F., Jamal, A. J., Johnstone, J., Kandel, C., et al. Are sink drainage systems a reservoir for hospital-acquired Gammaproteobacteria colonization and infection? A systematic review. *Open Forum Infect Dis.* 2021; 8(2): ofaa590.
91. Kotsanas, D., Wijesooriya, W. R., Korman, T. M., Gillespie, E. E., Wright, L., Snook, K., Williams, N., Bell, J. M. et al. "Down the drain": carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *Med J Aust.* 2013; 198(5): 267–269.
92. Betteridge, T., Merlino, J., Natoli, J., Cheong, E. Y., Gottlieb, T., Stokes, H. W. Plasmids and bacterial strains mediating multidrug-resistant hospital-acquired infections are coresidents of the hospital environment. *Microb Drug Resist.* 2013; 19(2): 104–109.
93. Tofteland, S., Naseer, U., Lislevand, J. H., Sundsfjord, A., Samuelsen, O. A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS One.* 2013; 8(3): e59015.
94. Molin, S., Tolker-Nielsen, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology.* 2003; 14(3): 255–261.
95. Madsen, J. S., Burmolle, M., Hansen, L. H., Sorensen, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 65(2): 183–195.
96. Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 2001; 412(6845): 442–445.

97. Soto-Giron, M. J., Rodriguez, R. L., Luo, C., Elk, M., Ryu, H., Hoelle, J., Santo Domingo, J. W., Konstantinidis, K. T. Biofilms on hospital shower hoses: characterization and implications for nosocomial infections. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82(9): 2872–2883.
98. Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., Gardam, M. A. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30(1): 25–33.
99. Khan, A. Priorities in the prevention and control of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitals. *J Hosp Infect.* 2012; 82(2): 85–93.
100. Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 130.
101. Trautmann, M., Halder, S., Lepper, P. M., Exner, M. Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation. Die Bedeutung des Wassers als Infektionsquelle. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2009; 52(3): 339–344.
102. Vergara-López, S., Domínguez, M. C., Conejo, M. C., Pascual, Á., Rodríguez-Baño, J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013; 19(11): E490–E498.
103. Lowe, C., Willey, B., O'Shaughnessy, A., Lee, W., Lum, M., Pike, K., Larocque, C., Dedier, H. et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(8): 1242–1247.
104. Hopman, J., Tostmann, A., Wertheim, H., Bos, M., Kolwijck, E., Akkermans, R., Sturm, P., Voss, A. et al. Reduced rate of intensive care unit acquired gram-negative bacilli after removal of sinks and introduction of 'water-free' patient care. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017; 6: 59.
105. Shaw, E., Gavalda, L., Camara, J., Gasull, R., Gallego, S., Tubau, F., Granada, R. M., Ciercoles, P. et al. Control of endemic multidrug-resistant gram-negative bacteria after removal of sinks and implementing a new water-safe policy in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2018; 98(3): 275–281.
106. Kossow, A., Kampmeier, S., Willems, S., Berdel, W. E., Groll, A. H., Burkhardt, B., Rossig, C., Groth, C. et al. Control of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients by a novel bundle including remodeling of sanitary and water supply systems. *Clin Infect Dis.* 2017; 65(6): 935–942.
107. Balm, M. N., Salmon, S., Jureen, R., Teo, C., Mahdi, R., Seetoh, T., Teo, J. T., Lin, R. T. et al. Bad design, bad practices, bad bugs: frustrations in controlling an outbreak of *Elizabethkingia meningoseptica* in intensive care units. *J Hosp Infect.* 2013; 85(2): 134–140.
108. Ashraf, M. S., Swinker, M., Augustino, K. L., Nobles, D., Knupp, C., Liles, D., Christie, J., Ramsey, K. M. Outbreak of *Mycobacterium mucogenicum* bloodstream infections among patients with sickle cell disease in an outpatient setting. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012; 33(11): 1132–1236.
109. Döring, G., Ulrich, M., Müller, W., Bitzer, J., Schmidt-Koenig, L., Müntz, L., Grupp, H., Wolz, C. et al. Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel, and its prevention by use of a new heating device. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1991; 191(5–6): 494–505.
110. Wichelhaus, T. A. Typisierungungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemotherapie Journal.* 2000; 2: 93–98.
111. Anforderungen der Hygiene an abwasserführende Systeme in medizinischen Einrichtungen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) am Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2020; 63(4): 484–501.
112. Paterson, D. L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis.* 2006; 43 Suppl 2: S43–48.
113. Tacconelli, E., Cataldo, M. A., Dancer, S. J., De Angelis, G., Falcone, M., Frank, U., Kahlmeter, G., Pan, A., et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 1: 1–55.

114. Allegranzi, B., Pittet, D. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J Hosp Infect.* 2009; 73(4): 305–315.
115. Kampf, G., Löffler, H., Gastmeier, P. Hand hygiene for the prevention of nosocomial infections. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106(40): 649–655.

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und seinem Leiter Professor Klaus Pfeffer für die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit. Besonders danke ich meinem Doktorvater Professor Colin R. MacKenzie und meinem Betreuer Dr. med. Andreas F. Wendel für die großartige Betreuung und Unterstützung.