



Epidemiologisches Bulletin

5. Oktober 2015 / Nr. 40

AKTUELLE DATEN UND INFORMATIONEN ZU INFEKTIONSKRANKHEITEN UND PUBLIC HEALTH

Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) in Deutschland

Update 2013/2014

DOI 10.17886/EPIBULL-2015-010

Einleitung

Hinsichtlich Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken gehört Deutschland zu den wenigen Ländern in Europa mit (a) vergleichsweise hohen VRE-Raten und (b) einem ansteigenden VRE-Trend. Nach wie vor tritt die erworbene Vancomycin-Resistenz nahezu ausschließlich in Isolaten der Spezies *Enterococcus faecium* auf, Vancomycin-resistente *Enterococcus faecalis* sind in Deutschland und Europa weiterhin sehr selten. Die europäische EARS-Net-Studie (EARS-Net – *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) erfasst die Vancomycin-Resistenz bei *E.-faecium*-Blutkulturisolaten und dokumentiert für Deutschland Häufigkeiten über 10 % (2012: 16,2 %; 2013: 14,5 %), signifikant ansteigend in den letzten 5 Jahren und mit einem leichten Rückgang zwischen 2012 und 2013.

Daten aus deutschen Intensivstationen – zusammengetragen im Rahmen des SARI-Projekts (SARI – Surveillance der Antibiotika-Anwendung und bakteriellen Resistenzen auf Intensivstationen) – belegen für VRE in den letzten Jahren eine Zunahme von VRE/1.000 Patiententage mit einer signifikant erhöhten Präsenz von VRE in der Mitte Deutschlands, d.h. einem „Gürtel“ von Nordrhein-Westfalen über Hessen, Thüringen und Sachsen.¹ Andere Surveillance-Systeme wie ARS (Antibiotika-Resistenz-Surveillance in Deutschland; <https://ars.rki.de>) und die Resistenzstudien der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V., PEG (<http://www.p-e-g.de/econtext/resistenzdaten>) bilden ähnliche Entwicklungen ab. In ARS sind nur Daten bis 2012 abrufbar (ab 2013 nur noch Daten zu VRE-Isolaten aus Blutkulturen); bis zu diesem Zeitpunkt war der VRE-Trend ansteigend. Die letzte Studie der PEG hat gemäß ihres 3-Jahresrhythmus für 2013 ansteigende Häufigkeiten der Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium* dokumentiert (16,6 %), verglichen mit den Zahlen aus 2010 (12,6 %). In Niedersachsen lässt sich hingegen kein eindeutiger Trend in der Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium* in den letzten Jahren erkennen (2011: 5,9 %; 2012: 7,1 %; 2013: 5,8 %; 2014: 6,5 %; ARMIN – Antibiotika-Resistenz-Monitoring in Niedersachsen; http://www.nlga.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=33224&_psmand=20).

Die beschriebenen Entwicklungen nimmt das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken in Form einer steigenden Anzahl von VRE-Einsendungen wahr. Dabei hatten Einsendungen von VanA-Typ und VanB-Typ VRE nahezu gleiche Anteile (s. ff.).

Auffällig ist der ansteigende Trend von Einsendungen Linezolid-resistenter *E.-faecium*-Isolate seit ca. 2010 (s. ff.), wobei die Mehrzahl dieser Stämme Glycopeptid-sensibel ist, also keine VRE sind. Dieser Trend bildet sich (noch) nicht in Resistenz-Surveillance-Systemen wie ARS, den Resistenzstudien der PEG oder ARMIN ab. Vermutete Häufungen (Ausbrüche) mit Linezolid-resistenten VRE

Diese Woche 40/2015

Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von VRE in Deutschland – Update 2013/2014

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten
37. Woche 2015

ARE/Influenza
Zur aktuellen Situation in der
37.–39. Kalenderwoche 2015



konnten für einige Kliniken mittels molekularer Typisierung bestätigt werden.

Im NRZ wurden in den Jahren 2013 und 2014 insgesamt 1.972 Enterokokken-Isolate bearbeitet, die uns von 116 Einsendern zur Bearbeitung zugesandt wurden (6 aus dem Ausland: Irland, Kroatien, Spanien, Australien, die Niederlande und Österreich).

Die überwiegende Zahl der Stämme sind *E. faecium* (90–94%) gefolgt von *E. faecalis* (5–10%) und je anteilig $\leq 1\%$ von VanC-Typ Enterokokken (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) und Vertretern anderer Spezies (*E. avium/pseudoavium*, *E. hirae*, *E. durans*, u. a.). Die meisten Einsendungen waren VRE (n = 1.662), die in erster Linie der Spezies *E. faecium* (n = 1.619; 97,4%) zuzuordnen waren. Die häufigsten diagnostischen Anfragen zu den an das NRZ eingesandten Isolaten waren (i) eine Bestätigung der Glycopeptid-Resistenz bzw. des Glycopeptid-Resistenztyps (*vanA*, *vanB*; ggf. weitere Glycopeptid-Resistenzgene); eine Bestimmung und/oder Bestätigung von Resistenzen gegen Reserveantibiotika (Linezolid, Tigecyclin, z. T. auch Daptomycin) sowie eine Anfrage nach klonaler Verwandtschaft mehrerer Isolate.

Genotypisierung wird hierbei in einem steigenden Maße in Anspruch genommen aufgrund eines Verdachts eines möglichen gehäuften Auftretens verwandter Isolate von zumeist *E. faecium*-VRE-Isolaten (Ausbruch).

Bei wenigen Einsendungen stand die Klärung der genauen Enterokokken-Spezies im Vordergrund, die gegebenenfalls bei unklarem, biochemischem Ergebnis mittels rDNS-Sequenzierung ermittelt wurde. Im NRZ werden routinemäßig alle Enterokokken-Isolate bis zur Speziesebene differenziert.

Tabelle 1 stellt eine Übersicht zu den 2013 und 2014 im NRZ erhaltenen Enterokokken-Einsendungen und den damit durchgeführten phänotypischen und molekularen Untersuchungen vor.

Enterokokken-Einsendungen und durchgeführte Untersuchungen	n
Anzahl aller bearbeiteten Isolate	1.972
Anzahl der durchgeführten Untersuchungen:	
Phänotypische Identifizierung als Speziesbestätigung	1.972
Genotypische Identifizierung (PCRs) Speziesbestätigung	22
Resistenzbestimmung mittels Mikrobouillonverdünnungstest	1.972
Resistenzbestimmung mittels Etest® (Bestätigungstest) ^a	341
Multiplex-PCRs für <i>vanA</i> , <i>vanB</i> (und zusätzliche <i>van</i> -Gene)	1.915
Multiplex-PCRs für <i>esp</i> , <i>hyl</i> (Virulenzmarker) und IS16	1.911
Genotypisierung mittels Makrorestriktionsanalyse (PFGE)	1.035
Multilocus-Sequenztypisierung	158

Tab. 1: Übersicht der Enterokokken-Einsendungen und der durchgeführten Untersuchungen (2013–2014)

^a Etests® (n): Linezolid (212), Tigecyclin (46), Vancomycin (33), Teicoplanin (28), Daptomycin (15), u. a.

Aufbau und Pflege eines Netzwerkes einsendender diagnostischer Einrichtungen

Das NRZ bekam in 2013 und 2014 von 110 klinisch-mikrobiologischen Laboren aus allen Bundesländern Stämme eingesandt. Aus weiteren 6 Laboren aus dem Ausland erhielten wir Referenzstämme bzw. einzelne Isolate zur Bestätigung (s. ff.). In 2013 und 2014 erhielten wir im Rahmen einer Kooperation mit einem klinisch-mikrobiologischen Labor in Dublin (Irland) insgesamt 83 VRE-Isolate aus drei Dubliner Krankenhäusern zur Genotypisierung (inkl. 50 VRE-Blutkulturisolate, s. ff.). Darüber hinaus bekamen wir u. a. aus anderen europäischen Ländern zur Bestätigung zugesandt: 2 *vanD*-positive *E. faecium* aus Utrecht (Niederlande), 3 *vanA*-positive und Linezolid-resistente *E. faecium* sowie einen Linezolid-resistenten *E. faecalis* aus Zagreb (Kroatien) und 2 Linezolid-resistente *E. faecium* aus Linz (Österreich).

Klinische Disziplinen und Materialien, in bzw. aus denen die VRE-Stämme isoliert wurden

In 2013 und 2014 wurden 1.662 Einsendungen als VRE eingesandt. Diese VRE-Erreger waren zumeist (> 95%) *E. faecium* und wurden bei Infektionen und Besiedlungen von Patienten vor allem aus den intensivmedizinischen Stationen (besonders der Chirurgie), aus der Inneren Medizin und aus der Hämatologie/Onkologie als den hauptsächlichsten Risikobereichen für VRE isoliert (s. Tab. 2).

Klinische Disziplin	Anzahl (n/%)	
Ambulanter Bereich	14	0,8
Anästhesie	11	0,7
Chirurgie	76	4,5
Dialyse	2	0,1
Geriatric	31	1,9
Gynäkologie	5	0,3
Hämatologie/Onkologie	93	5,6
Herzchirurgie	8	0,5
HNO	6	0,4
Innere Medizin	220	13,2
ITS, interdisziplinäre	165	9,9
ITS, Chirurgie	305	18,4
ITS, Innere Medizin	148	8,9
ITS, Transplant.-Chirurgie	41	2,5
Neonatologie	32	1,9
Nephrologie/Urologie	44	2,6
Neurochirurgie/Neurologie	45	2,7
Orthopädie	15	0,9
Pädiatrie	16	1,0
Psychiatrie	2	0,1
Rehabilitation	114	6,9
Unfallchirurgie	4	0,2
Andere	265	16,0
Summe	1.662	100,00

Tab. 2: Auftreten von 1.662 VRE (zumeist *E. faecium*) aus Infektionen und Besiedlungen bei Patienten in Gesundheitseinrichtungen, alphabetisch aufgeschlüsselt nach klinischen Disziplinen

Materialart	Anzahl (n/%)	
Abstrich (ohne nähere Bezeichnung)	190	11,4
Biopsie	14	0,9
Blutkultur	128*	7,7
Bronchiallavage (BAL)	13	0,8
Drainage	20	1,2
Hautabstrich	6	0,4
Katheter (Harnweg)	4	0,2
Katheterspitze (ZVK)	27	1,6
Punktat	31	1,9
Rektalabstrich/Stuhl	579	34,8
Sekret (ohne nähere Bezeichnung)	11	0,7
Trachealsekret	12	0,7
Urin (Katheterurin)	121	7,3
Urin (nativ)	248	14,9
Wundabstrich	126	7,6
Andere/unbekannt	132	7,9
Summe	1.662	100,0

Tab. 3: Klinische Materialien, aus denen 1.662 VRE (zumeist *E. faecium*) bei infizierten/besiedelten Krankenhaus-Patienten in 2013 und 2014 isoliert wurden

* 50 VRE aus Blutkulturen resultierten aus einer Kooperation mit dem Labor in Dublin (Irland)

Als Bestandteil der natürlichen Flora des Darmes stammten die Einsendungen von Enterokokken vor allem aus Stuhlproben/Rektalabstrichen (34,8%), gefolgt von Isolaten aus Urin (MSU, Katheter-Urin) und Abstrichen (ohne nähere Bezeichnung seitens der Einsender). Aber auch Isolate aus Blutkulturen (7,7%) und Wundabstrichen (7,6%) waren vergleichsweise häufig vertreten (s. Tab. 3).

Spezies und Glycopeptid-Resistenztypen der im NRZ bearbeiteten Enterokokken-Einsendungen

In den Jahren 2013 und 2014 waren innerhalb der VRE-Einsendungen an das NRZ nahezu gleiche Anteile von *vanA*- bzw. *vanB*-positiven *E. faecium*-Isolaten zu verzeichnen (s. Tab. 4). Dies bedeutet, dass bei gleichzeitig steigenden VRE-Zahlen insgesamt in den letzten Jahren der allgemein ansteigende Trend größtenteils durch einen Anstieg im Auftreten und der Verbreitung von *vanB*-Typ VRE begründet ist. Die Ursache dieses vermehrten Auftretens *vanB*-positiver *E. faecium*-Stämme in deutschen (und anderen europäischen) Kliniken ist noch unklar, und wird am NRZ weiter untersucht. U. a. ist erkennbar, dass bestimmte Stammlinien von *vanB*-VRE hier überproportional erfolgreich verbreitet sind (s. MLST-Typisierung von Blutkulturisolaten).

Spezies (Glycopeptid-Resistenztyp)	n (%)
<i>E. faecium (vanA)</i>	809 (41,0)
<i>E. faecium (vanB)</i>	819 (41,5)
<i>E. faecium (vanA + vanB)</i>	5 (0,2)
<i>E. faecium (vanD)</i> ^a	2 (0,1)
<i>E. faecium (van-neg.)</i>	181 (9,2)
<i>E. faecalis (vanA)</i>	18 (0,9)
<i>E. faecalis (vanB)</i>	11 (0,6)
<i>E. faecalis (van-neg.)</i>	98 (5,0)
<i>E. gallinarum (vanC1 + vanB)</i> ^b	1 (0,1)
<i>E. gallinarum (vanC1 + vanA)</i> ^b	4 (0,2)
<i>E. avium (van-neg., vanA oder vanB)</i>	12 (0,6)
andere	12 (0,6)
Summe	1.972 (100,00)

Tab. 4: Spezies-Identifizierung und Glycopeptid-Resistenztypen der Enterokokken-Einsendungen (2013–2014)

^a Einsendungen aus dem University Medical Centre Utrecht, Niederlande;

^b Seltene Isolate von *E. gallinarum*, die neben ihrer natürlichen *vanC1*-kodierte *low-level*-Vancomycin-Resistenz zusätzlich ein *vanA*- bzw. ein *vanB*-Gencluster erworben haben und dadurch (hoch)resistent gegen Vancomycin und Teicoplanin (bei *vanA*-Erwerb) bzw. nur gegen Vancomycin (bei *vanB*-Erwerb) sind.

Der deutliche Rückgang in den Einsendungen von *E. gallinarum*- oder *E. casseliflavus*-Stämmen im Vergleich zu den Vorjahren deutet auf eine verbesserte Enterokokken-Diagnostik (z. B. über MALDI-TOF MS und/oder chromogene Medien) in den Einsendelaboren. In den Enterokokken-Einsendungen waren auch seltene Einsendungen von *E. gallinarum*-Isolaten, die neben der natürlichen *vanC1*-kodierte *low-level*-Vancomycin-Resistenz ein *vanA*- bzw. *vanB*-Gencluster besaßen. Solche Isolate sind dann hochresistent gegen Vancomycin (bei zusätzlichem *vanB*-Besitz) und auch gegen Teicoplanin (bei zusätzlichem *vanA*-Besitz) und können u. U. im primär diagnostischen Labor zu Fehldiagnosen führen.

Antibiotikaresistenzen *vanA*- bzw. *vanB*-positiver *E. faecium*

Die Resistenzhäufigkeiten der *vanA*- bzw. *vanB*-positiven *E. faecium*-Isolate aus den Einsendungen an das NRZ in 2013 und 2014 gegen 18 verschiedene Antibiotika sind in Tabelle 5 dargestellt (Einschätzung nach EUCAST-Grenzwerten (EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) bzw. ECOFF-Werten (ECOFF – Epidemiological cut-off). Nahezu alle VRE sind ebenso Ampicillin-/Penicillin-resistent und „hochresistent“ gegen Ciprofloxacin (MHK > 16 mg/l). Auffällig sind vor allem die im Jahr 2014 gestiegenen Resistenzraten gegen die Reserveantibiotika Linezolid (10,2%) und Tigecyclin (3,1%) bei *vanA*-positiven *E. faecium* sowie die 2014 höheren Resistenzraten gegen Quinupristin/Dalfopristin (3,8%) und

Antibiotikum	<i>E. faecium</i> (2013)		<i>E. faecium</i> (2014)	
	<i>vanA</i> (n = 418)	<i>vanB</i> (n = 424)	<i>vanA</i> (n = 391)	<i>vanB</i> (n = 393)
Penicillin	99,5	100,0	100,0	100,0
Ampicillin	99,5	100,0	100,0	100,0
Gentamicin ^a	55,7	24,5	38,4	32,1
Streptomycin ^a	63,9	81,1	72,6	75,3
Vancomycin	100,0	98,1	100,0	99,5
Teicoplanin	100,0	0,2 ^b	100,0	1,5 ^b
Daptomycin	0,0	0,0	0,0	0,3
Quinupristin/Dalfopristin	0,7	0,7	1,3	3,8
Clindamycin	96,9	96,9	97,2	95,4
Erythromycin	97,4	97,9	96,7	98,7
Ciprofloxacin ^c	99,0	99,8	100,0	100,0
Moxifloxacin	99,0	99,5	100,0	100,0
Linezolid	4,5	2,4	10,2	1,8
Tetracyclin	64,6	14,9	62,7	16,0
Tigecyclin	0,7	0,2	3,1	0,5
Rifampicin	93,3	93,6	99,7	98,7
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	61,7	84,0	67,5	57,5
Chloramphenicol	0,0	0,0	3,6	1,5

Tab. 5: Antibiotika-Resistenzraten (%) der an das NRZ eingesandten *vanA*- bzw. *vanB*-positiven *E. faecium*-Isolate aus 2013 und 2014. Die Einschätzung erfolgt anhand klinischer EUCAST-Grenzwerte bzw. den angegebenen EUCAST ECOFF-Werten (Ausnahmen s. Legende).

^a Angabe der prozentualen Häufigkeiten von *high-level*-Aminoglycosid-Resistenzen, die entsprechend der klinischen MHK-Grenzwerte von EUCAST ausgewertet wurden.

^b Ein Stamm besaß ein konstitutiv exprimiertes *vanB*-Gencluster; solche seltenen Stämme sind dann auch gegen Teicoplanin resistent.

^c Wir bestimmen eine Hochresistenz gegen Ciprofloxacin als MHK > 16 mg/l, vermittelt vor allem durch Mutationen in *gyrA* und *parC*.

Tigecyclin (0,5%) bei *vanB*-positiven *E. faecium*. In einem *vanB*-positiven *E. faecium*-Stamm wurde die Daptomycin-Resistenz entsprechend MHK-Grenzwert laut CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, USA) bzw. ECOFF-Wert von EUCAST für Daptomycin bestätigt (s. auch nächstes Kapitel).

Antibiotikaresistenzen von *E. faecium* gegen Linezolid, Tigecyclin und Quinupristin/Dalfopristin

Neben den seit einigen Jahren deutlich gestiegenen Einsendezahlen von Enterokokken (zumeist VRE) ist auch ein gehäuftes Auftreten von Resistenzen gegen Linezolid, Tigecyclin und Quinupristin/Dalfopristin festzustellen (s. Tab. 6). Resistenzen gegen Linezolid, Tigecyclin (und ggf. Daptomycin) werden jeweils in zwei unabhängigen

Verfahren am NRZ bestätigt (MHK-Werte im Mikrobouillonverdünnungstest und im Etest®).

Die Gesamtresistenzrate gegen Linezolid lag bei allen an das NRZ eingesandten *E. faecium*-Isolaten in 2014 bei 12% (104 von 870 Isolaten). Der größere Anteil dieser Linezolid-resistenten *E. faecium*-Isolate war, wie in 2013 auch, Glycopeptid-sensibel (*vanA*- und *vanB*-negativ). Insgesamt lässt sich ein deutlich ansteigender Trend an Einsendungen mit Linezolid-resistenten *E. faecium*-Isolaten in den letzten Jahren erkennen (s. Tab. 7).

	Resistenztyp	Resistenzraten 2013 n (%)	Resistenzraten 2014 n (%)
Quinupristin/ Dalfopristin	<i>vanA</i>	3/418 (0,72)	5/391 (1,28)
	<i>vanB</i>	3/426 (0,70)	15/393 (3,82)
	VAN-s	0/97 (0,00)	7/86 (8,14)
Linezolid	<i>vanA</i>	19/418 (4,55)	40/391 (10,23)
	<i>vanB</i>	10/426 (2,35)	7/393 (1,78)
	VAN-s	52/97 (53,61)	57/86 (66,28)
Tigecyclin	<i>vanA</i>	3/418 (0,72)	12/391 (3,07)
	<i>vanB</i>	1/426 (0,23)	2/393 (0,51)
	VAN-s	7/97 (7,22)	7/86 (8,14)

Tab. 6: Resistenzraten der in 2013 bzw. 2014 an das NRZ eingesandten *E. faecium*- und *E. faecalis*-Isolate gegen Reserveantibiotika

	Resistent	%	Empfindlich	%	Gesamt
2014	74	9,4	714	90,6	788
2013	78	8,7	823	91,3	901
2012	39	4,0	933	96,0	972
2011	45	5,7	740	94,3	785
2010	10	3,0	327	97,0	337
2009	3	0,8	352	99,2	355
2008	2	0,6	321	99,4	323

Tab. 7: Resistenz von *E. faecium* gegen Linezolid bei NRZ-Einsendungen aus Deutschland, 2008–2014

Insgesamt 2,4%, d.h. 21 von 870 in 2014 eingesandten *E. faecium*-Isolaten waren Tigecyclin-resistent, in 2013 waren es 11 von 941 (1,2%). In 2013 war ein Großteil der Tigecyclin-resistenten Enterokokken-Isolate Glycopeptid-sensibel; in 2014 waren 14 der insgesamt 21 Tigecyclin-resistenten *E. faecium*-Isolate VRE.



Abb. 1: Die Genotypisierung von zumeist *vanA*-positiven *E. faecium*-Isolaten mit zusätzlicher Linezolid-Resistenz mittels *SmaI*-Makrorestriktionsanalyse verweist auf das Vorliegen einer Ausbruchssituation.

Diese 9 *E. faecium*-Isolate, die 8 Patienten aus der Hämatologie/Onkologie eines Universitätsklinikums kolonisierten, verkörpern die Verbreitung des gleichen Stammes.

van-neg., *van*-negativ; *esp*, *hyl* (zwei Virulenzmarker) kodieren das *Enterococcal surface protein* bzw. eine putative Hyaluronidase; m, männlich; w, weiblich.

Die *E. faecium*-Isolate (VanA-Typ, VanB-Typ und Glycopeptid-sensible Isolate) der Einsendungen an das NRZ zeigten 2014 eine Gesamtresistenzrate gegen Quinupristin/Dalfopristin von 3,1% (27 von 870 Isolaten). Die Mehrzahl Quinupristin/Dalfopristin-resistenter *E. faecium*-Isolate war jedoch Glycopeptid-sensibel (s. Tab. 6). Quinupristin/Dalfopristin (Synercid®) ist seit 2007 in Deutschland nicht mehr zur Therapie verfügbar, in den USA ist diese Antibiotika-Kombination noch zu beziehen.

Die Fallzahlen an eingesandten *E. faecalis*-Isolaten sind vergleichsweise gering, weswegen wir von Trendanalysen absehen.

Das rechtzeitige Erkennen von Resistenz-Trends gegen Reserveantibiotika ist eine wichtige Aufgabe eines NRZ (Frühwarnfunktion); die Daten des Resistenz-Surveillance-Systems ARS am Robert Koch-Institut (RKI), der PEG-Resistenzstudien sowie regionaler Systeme wie ARMIN zeigen für Linezolid und die anderen Reserveantibiotika bei Enterokokken keinen Trend (< 1% bei allen klinischen *E. faecium*- bzw. *E. faecalis*-Isolaten; <https://ars.rki.de/>).

Das verstärkte Auftreten von Einsendungen mit Linezolid-resistenten Enterokokken seit 2010 veranlasste uns, ab 2012 routinemäßig MHK-Werte für Linezolid bei allen Einsendungen mittels Etest® zu bestätigen und die Isolate molekular zu untersuchen. Dabei ist der Trend eindeutig Spezies-spezifisch; wenigen Einsendungen an Linezolid-resistenten *E. faecalis* pro Jahr steht ein zunehmender Trend von Linezolid-resistenten *E. faecium*-Isolaten gegenüber. Wir haben im Zeitraum 2008–2014 insgesamt 251 Linezolid-resistente *E. faecium*-Isolate erhalten und molekular charakterisiert.² Einzelne Einsender schickten Isolate aus Häufungen von Infektionen und Besiedlungen mit Linezolid-resistenten *E. faecium*, bei denen wir per Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) einen klonalen Zusammenhang nachweisen konnten (Bsp. s. Abb. 1). Linezolid-Resistenz wird in Enterokokken meist durch eine Punktmutation G2576T in der 23S rDNA vermittelt, wobei das ribosomale Gen in *E. faecium* in sechs Kopien vorkommt. Linezolid-resistente Isolate zeigen

üblicherweise eine Mischung aus Wildtyp- und Mutanten-Alleltypen, was einen molekularen Nachweis, selbst unter Verwendung von DNS-Sequenzierung erschwert. Deswegen nutzen wir ein Testsystem unter Verwendung eines Gelchip-Arrays. In 232 Linezolid-resistenten *E. faecium* (92%) konnten wir die bekannten 23S-Punktmutationen nachweisen; die anderen 19 *E. faecium*-Isolate besaßen anscheinend andere Mutationen, die Linezolid-Resistenz vermitteln können. In 5 Isolaten wurde das *cf*-Gen mittels PCR nachgewiesen. Das *cf*-Gen kodiert in Koagulase-negativen Staphylokokken für eine Gen-vermittelte Linezolid-Resistenz und wurde bisher weltweit vereinzelt auch in Enterokokken beschrieben.³ Molekulare Analysen zur Lokalisation und Funktionalität von *cf* werden momentan durchgeführt.

Genotypisierung von Enterokokken-Isolaten mittels PFGE

Im Jahr 2013 wurden 540 Enterokokken-Isolate (zumeist VRE der Spezies *E. faecium*), die von 56 Einsendern stammten, mittels *SmaI*-Makrorestriktionsanalyse (PFGE) genotypisiert. Dabei wurden von 9 Einsendern mehr als 17 Enterokokken-Isolate je Einsender und jeweilig auch ein gehäuftes Auftreten verwandter oder identischer Isolate innerhalb der jeweiligen Klinik bzw. des jeweiligen Krankenhauses nachgewiesen. Im Jahr 2014 wurden 495 Enterokokken-Isolate (zumeist VRE der Spezies *E. faecium*), die von 40 Einsendern stammten, mittels PFGE genotypisiert. Dabei wurden bei 14 Einsendern (klinisch-mikrobiologische Labore von Krankenhäusern/Kliniken bzw. Privatlabore) mit ≥ 10 Enterokokken-Isolaten je Einsender entsprechend ein gehäuftes Auftreten verwandter oder identischer Isolate innerhalb des jeweiligen Krankenhauses nachgewiesen.

Der steigende Bedarf an Genotypisierung im Zusammenhang mit ansteigendem Auftreten von VRE führt zu einer erheblichen Mehrbeanspruchung des NRZ. Wir haben geprüft, inwieweit Methoden wie MALDI TOF MS und DiversiLab Enterococcus® hier eine Entlastung bringen können und als Alternativen zur Stammtypisierung mittels PFGE geeignet wären.

MALDI TOF MS zur Typisierung von Enterokokken

MALDI-TOF Massenspektrometrie ist in primär-diagnostischen Laboren die Methode der Wahl zur Speziesdiagnostik von Bakterien. Es mehren sich Berichte, Tagungsbeiträge und Veröffentlichungen, dass die Methode darüber hinaus auch zur Stammcharakterisierung und -typisierung eingesetzt werden kann. Wir haben an einer umfangreichen Kollektion von Referenz-, Typ- und Teststämmen von *E. faecium*/VRE festgestellt (n = 112; Isolate mit 52 MLST-Typen, u. a. häufige MLST-Typen von Mensch und Tier), dass MALDI-TOF MS auch gegenüber etablierten Methoden wie MLST, PFGE, usw. nur eine sehr begrenzte Diskriminierungsfähigkeit – auch bei Verwendung komplexer Auswertemodi – besitzt und somit für eine Stammcharakterisierung nicht geeignet ist. Auch lässt sich der Resistenzstatus *vanA/vanB* nicht aus dem MALDI TOF MS Spektrum ableiten.^{4,5}

Evaluierung von DiversiLab® Enterococcus kit zur Stammtypisierung von Enterokokken

Wir haben eine kommerzielle repPCR-basierte Typisierungsmethode als Alternative für eine Typisierung von VRE-Isolaten getestet (DiversiLab® Enterococcus, bioMérieux, Nürtingen, DE).⁶ Zunächst wurden Wiederholungsmessungen von ausgewählten Teststämmen durchgeführt, welche alle eine sehr gute Reproduzierbarkeit ergaben. Für eine anschließende Studie wurde eine repräsentative Auswahl von 65 *E. faecium*-Stämmen, die alternativ auch mittels Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) und PFGE typisiert wurden, verwendet. Die Isolate waren klinisch-epidemiologisch gut charakterisiert und aus Häufungen von Infektionen und Besiedlungen (Ausbrüchen) und aus einzelnen Infektionen (meist Blutkulturisolat). MLST hat 15 verschiedene Typen, DiversiLab® Enterococcus 18 unterscheidbare Clustertypen und die Makrorestriktion in der PFGE 40 Cluster generiert. Offensichtlich bietet PFGE-Typisierung nach wie vor die höchste Diskriminierungsfähigkeit. In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus bereits publizierten Studien konnten wir zeigen, dass DiversiLab® Enterococcus mitunter nicht-verwandte Stämme nicht unterscheiden kann. Es wird angeregt, die Ergebnisse der Clusteranalyse durch weitere Typisierungsergebnisse (Antibiogramm, Nachweis bestimmter PCR-Marker) zu konkretisieren und zu unterstützen. Trotz aller Beschränkungen

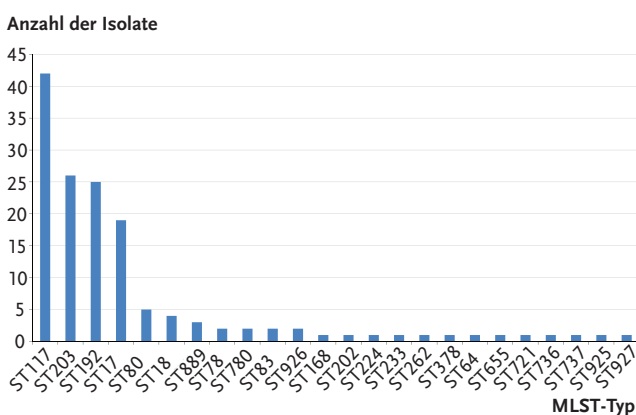


Abb. 2: MLST-Typen von *E. faecium*-Einsendungen aus Blutkulturen mit klinischer Diagnose Bakteriämie/Sepsis aus den Jahren 2011–2014 (n = 145).

hat DiversiLab® Enterococcus einen gewissen Mehrwert aufgrund der Automatisierbarkeit, vorgegebener Auswerteparameter, kommerzieller Software und vor allem Schnelligkeit im Vergleich zu anderen Methoden wie MLST und PFGE.⁶

Typisierung von VRE-/*E. faecium*-Einsendungen aus Blutkulturen mittels MLST

Seit einigen Jahren typisieren wir alle *E. faecium*-Isolate aus Blutkulturen mittels MLST. In 2014 haben wir 62 Blutkulturisolat von 32 verschiedenen Einsendern aus Deutschland untersucht. Davon waren 29 *vanA*-positiv (47%) und 21 *vanB*-positiv (34%). Insgesamt 5 Isolate (8%) waren Linezolid-resistent, eines war Tigecyclin-resistent. Die häufigsten MLST-Typen waren: ST117 (n = 18; 29%); ST203 (n = 16; 26%); ST17 (n = 10; 16%) und ST192 (n = 5; 8%). Eine Verteilung der häufigsten MLST Typen von *E. faecium* aus Blutkulturen aus den Jahren 2011–2014 zeigt Abbildung 2. Es wird ersichtlich, dass ähnlich wie bei MRSA, auch bei VRE- bzw. Hospital-assoziierten *E. faecium*-Isolaten bestimmte klonale Linien überproportional häufig auftreten: In Deutschland waren dies in den letzten Jahren Isolate des ST117, ST203, ST192 und ST17. Bestimmte Stammvarianten sind dabei bevorzugt mit *vanA*- bzw. *vanB*-Genotypen assoziiert, bei einzelnen Stammtypen scheint diese Assoziation weniger ausgeprägt (z. B. ST117). Der häufigste Stammtyp bei *vanB*-Typ VRE aus Einsendungen an das NRZ in den Jahren 2011–2014 ist ST192 (33%), gefolgt von ST117 (25%), ST17 (16%) und ST203 (6%) (nicht dargestellt). Bei *vanA*-Typ VRE ist ST203 der zweithäufigste Epidemie-Stammtyp und macht ein Drittel aller Einsendungen zwischen 2011 und 2014 aus; bei *vanB*-VRE spielt er mit 6% eher eine geringere Rolle. Demgegenüber tritt der ST192 nahezu ausschließlich als *vanB*-Typ VRE auf und ist innerhalb der *vanB*-Typ VRE mit 33% der häufigste Epidemietyp aus Blutkulturen; bei *vanA*-Typ VRE macht er nur 5% (n = 3) aus. Inwieweit hier klonale Verbreitung von Epidemie-Stammtypen (z. B. ST192-*vanB*) und/oder eine Verbreitung über mobile, übertragbare *vanA*-Resistenzplasmide bzw. mobile *vanB*-Elemente eine Rolle bei der Verbreitung der Vancocycin-Resistenz spielen, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen am NRZ.

Typisierung von VRE-/*E. faecium*-Einsendungen aus Häufungen bei irischen Krankenhauspatienten

In 2013 und 2014 erhielten wir als Teil eines Kooperationsprojekts VR-*E. faecium*-Isolate aus Blutkulturen von Patienten aus drei Dubliner Krankenhäusern (Irland). Dies schloss ebenso weitere 13 Linezolid-resistente VRE aus einer dieser Kliniken ein. Irland hat traditionell die höchsten VRE-Raten in Europa, über die Epidemiologie von VRE ist hingegen wenig bekannt. Über 95% der 83 Isolate waren *vanA*-Typ-VRE. Diese 83 *E. faecium*-Isolate wurden mittels PFGE molekular typisiert. Es wurden 15 PFGE-Typen (Cluster) und einige Einzelstämme gefunden. Die Linezolid-resistenten VRE bildeten ein eigenes Cluster. Diese Ergebnisse deuten an, dass in Hochprävalenzregionen die VRE-Epidemiologie (anders als bei MRSA) in einer Klinik heterogen und polyklonal sein kann. Auch in Irland sind die

üblichen Stammvarianten verbreitet, eine MLST-Analyse repräsentativer Isolate ergab ST78, ST203, ST17 und ST18.⁷

Phylogenetische Untersuchungen an *E.-faecalis*-Isolaten

Im Rahmen von Forschungsinitiativen (Europäische Union – EU, Bundesministerium für Bildung und Forschung – BMBF) haben wir verschiedene wissenschaftliche Fragestellungen zu Isolaten der Spezies *E. faecalis* bearbeitet. Im Rahmen einer BMBF-Forschungsinitiative zu Erregern von Harnwegsinfektionen wurden Experimente zur Phylogenie, Physiologie, Populationsstruktur und Antibiotikaresistenz von *E.-faecalis*-Isolaten aus dem klonalen MLST-Komplex ST40 durchgeführt. Isolate dieses MLST-Typs sind weltweit verbreitet und zeigen keine Wirtsspezifität. An einer heterogenen und internationalen Sammlung an *E.-faecalis*-Isolaten konnten wir u. a. durch Ganzgenom-Vergleiche zeigen, dass Isolate von Tier und Mensch (Besiedlung und Infektionen) sich kaum unterscheiden und physiologisch sehr eng verwandt sind.⁸ Im Rahmen dieses Projekts wurde auch das erste Genom eines *E.-faecalis*-Isolats vom Tier komplett geschlossen.⁹ Dieses Tierisolat zeigt eine neuartige genomische Insel und ein erhöhtes pathogenes Potenzial in einer Reihe von Tierexperimenten.⁸ In einem EU-geförderten Forschungsprojekt zum Vorkommen von mobilen genetischen Elementen in *E. faecium* und *E. faecalis* einer internationalen Sammlung wurde u. a. ermittelt, dass speziell die Isolate des MLST-Typs ST40 viele mobile genetische Elemente und beispielsweise eine statistisch signifikante Häufung von Antibiotika-Resistenzen besitzen (außer Resistenz gegen Vancomycin).¹⁰

Akkreditierung des NRZ – Teil Enterokokken und QM/EQA

Im Jahr 2014 wurde mit der Erstellung einer normenkonformen Dokumentation der Untersuchungsmethoden sowie erweiterten Validierungs- und Verifizierungsexperimenten für das NRZ – Teil Enterokokken – die Akkreditierung dieses Bereiches im Mai 2015 erfolgreich durchgeführt. Somit ist das gesamte NRZ für Staphylokokken und Enterokokken im Robert Koch-Institut Wernigerode als Prüflabor nach DIN EN ISO/IEC 17025 sowie als medizinisches Laboratorium nach DIN EN ISO 15189 zugelassen.

Fazit und Ausblick

Aufgrund steigender VRE-Raten und -Häufigkeiten ist das NRZ Enterokokken mit einer zunehmenden Anzahl an Einsendungen, bei gleichzeitig erhöhtem Bedarf an analytischer Tiefe (PFGE-Typisierung, MLST) und angeforderten Spezialuntersuchungen konfrontiert (Bestätigung von Resistenzen gegen Reserveantibiotika). Das Stammmaterial des NRZ ist aufgrund der Vielzahl der einsendenden Labore und der Diversität der Fragestellungen sehr gut geeignet, allgemeine Trends abzubilden. Darüber hinaus nimmt das NRZ eine wichtige Funktion in der frühzeitigen Erkennung von neuen Trends wahr (z. B. Verbreitung neuer Stammvarianten, Resistenz-Entwicklungen gegen Reserveantibiotika), die in klassischen Surveillance-Erhebungen nicht bzw. erst deutlich verspätet auffällig werden. (s. auch ARS [<https://ars.rki.de/>], Resistenzstudien

der PEG [<http://www.p-e-g.de/econtext/resistenzdaten>]). Die Stammtypisierung bei VRE bleibt vergleichsweise aufwendig; Methoden wie DiversiLab® Enterococcus bieten Alternativen zur aufwendigen Makrorestriktion in der PFGE, haben aber Limitationen. Das NRZ ist hier aktiv in verschiedenen Initiativen involviert, deren Ziel es ist, Ganzgenom-basierte Stammtypisierung im Bedarfsfall bzw. mittelfristig als Routinemethode zur Stammtypisierung anbieten zu können. Die vergleichsweise hohe Zahl von VRE in Deutschland erfordert besondere Wachsamkeit.

Literatur

1. Gastmeier P, Schröder C, Behnke M, Meyer E, Geffers : Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. J Antimicrob Chemother 2014;69:1660–1664
2. Klare I, Fleige C, Geringer U, Thuermer A, Bender J, Mutters NT, Mischnik A, Werner G: Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. J Global Antimicrob Res 2015;3:128–131
3. Liu Y, Wang Y, Schwarz S, Li Y, Shen Z, Zhang Q, Wu C, Shen J: Transferable multiresistance plasmids carrying *gfr* in *Enterococcus* spp. from swine and farm environment. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:42–48
4. Lasch P, Fleige C, M. Stämmeler, Layer F, Nübel U, Witte W, Werner G: Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. J Microbiol Methods 2014;100:58–69
5. Lasch P, Jacob D, Klee SR, Werner G: Discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for phylogenetically closely related microbial strains. IN: Applications of mass spectrometry in microbiology: From strain characterization to rapid screening for antibiotic resistance (Demirev and Sandrin, eds.). Springer (2015): 1st edition. [in print]
6. Werner G, Fleige C, Neumann B, Bender J, Layer F, Klare I: Evaluation of DiversiLab®, MLST and PFGE typing for discriminating clinical *Enterococcus faecium* isolates. J Microbiol Meth 2015;118:81–84
7. Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, FitzGerald S, Fox U, Boyle B, Schaffer K, Werner G, Klare I: Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother 2015;70:2718–2724
8. Zischka M, Kuenne CT, Blom J, Wobser D, Sakinç T, Schmidt-Hohagen K, Dabrowski PW, Nitsche A, Hübner J, Hain T, Chakraborty T, Linke B, Goesmann A, Voget S, Daniel R, Schomburg D, Hauck R, Hafez HM, Tielen P, Jahn D, Solheim M, Sadowy E, Larsen J, Jensen LB, Ruiz-Garbajosa P, Quinones D, Mikalsen T, Bender J, Steglich M, Nübel U, Witte W, Werner G: Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. BMC Genomics 2015;16:175 [doi:10.1186/s12864-015-1367-x]
9. Zischka M, Kuenne C, Blom J, Dabrowski PW, Linke B, Hain T, Nitsche A, Goesmann A, Larsen J, Jensen LB, Witte W, Werner G: Complete genome sequence of the porcine isolate *Enterococcus faecalis* D32. J Bacteriol 2012;194:5490–5491
10. Mikalsen T, Pedersen T, Willems R, Coque TM, Werner G, Sadowy E, van Schaik W, Jensen LB, Sundsfjord A, Hegstad K: Investigating the mobile in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. BMC Genomics 2015;16:282

Bericht aus dem Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken. **Ansprechpartner** für den Teil Enterokokken: Dr. Ingo Klare; Leiter Priv.-Doz. Dr. Guido Werner. Wir danken allen kooperierenden Laboren für die zumeist jahrelange und erfolgreiche Zusammenarbeit und die Übersendung des interessanten Stammmaterials.