

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Molekulare Charakterisierung von *Pseudomonas
aeruginosa* Patienten- und Umweltisolaten zur Analyse
der Übertragungsdynamik des Erregers aus der
Krankenhausumgebung auf den Patienten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Bender, Viviane Maria Michaela

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Peter

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Göbner

Tag der Disputation: 16.05.2022

In Gedenken an meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Anhangsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
1. Einleitung	1
1.1. <i>P. aeruginosa</i> als Erreger von nosokomialen Infektionen im Krankenhaus.	1
1.2. Antibiotikaresistenzen bei <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3. <i>P. aeruginosa</i> im Abwassersystem	6
1.4. Typisierung und Aufklärung von Transmissionsketten durch die Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen den Stämmen	8
1.4.1. Multilocus Sequenz Typing (MLST)	9
1.4.2. Repetitive PCR (Polymerase chain reaction) mittels Diversilab.....	10
1.4.3. Next-Generation Sequencing (NGS).....	11
1.5. Fragestellung und Ziel der Studie	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Beschreibung der Stammsammlung und Stammauswahl für die Studie	17
2.2. DNA-Extraktion <i>P. aeruginosa</i> Stämmen	18
2.2.1. Allgemeines Material zur DNA-Extraktion	20
2.3. Bestimmung der DNA-Konzentration	20
2.4. Herstellung einer Library zur Sequenzierung des bakteriellen Genoms von <i>P. aeruginosa</i>	21
2.4.1. Isolation und Quantifizierung chromosomaler DNA	22
2.4.2. Fragmentierung der DNA.....	22
2.4.3. Aufreinigung der fragmentierten DNA	23
2.4.4. End-Repair und Size Selection	23
2.4.5. Adenylierung der Enden.....	24
2.4.6. Adapterligation	25
2.4.7. PCR.....	26
2.4.8. Quantifizierung und Qualitätskontrolle	26
2.4.9. Normalisierung und Poolen der Libraries	27
2.4.10. Materialien und Kits für den NextSeq 500.....	28
2.5. Auswertung NGS	29
2.5.1. Qualitätskontrolle	29
2.5.1.1. Erstellung eines Assembly.....	30
2.5.1.2. N50 Wert	30
2.5.1.3. GC Gehalt	30
2.5.2. Erstellung einer Phylogenie.....	31
2.5.2.1. Berechnung eines Core Genome	31

2.5.2.2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP).....	31
2.5.3. Identifizierung von Resistenzgenen in den Patientenproben.....	31
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Herkunft der in die Studie eingeschlossenen Isolate	33
3.2. Qualitätsmerkmale der erstellten bakteriellen Genomsequenzen	35
3.3. Übersicht der Antibiotikaresistenzen der klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolate.	35
3.4. Nachweis von Resistenzgenen verschiedener Antibiotikaklassen bei den klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolaten	38
3.5. Anteil der Resistenzen verschiedener Antibiotikaklassen bei den <i>P. aeruginosa</i> Isolaten aus der Umwelt	41
3.6. Auswertung des phylogenetischen Stammbaums von Patientenproben und Umweltproben.....	44
3.7. Detaillierte phylogenetische Analyse der Patientenisolate.....	47
3.8. Detaillierte phylogenetische Analyse der Umweltisolate	48
3.9. Analyse von wahrscheinlichen Übertragungen von <i>P. aeruginosa</i> aus der Umwelt auf Patienten	52
4. Diskussion.....	57
4.1. Bedeutung von NGS in der Infektionsepidemiologie	57
4.2. Vorkommen und phylogenetische Zuordnung von <i>P. aeruginosa</i> in der Umwelt und bei Patienten	60
4.3. Abwassersystem als Infektionsrisiko	64
4.4. Patientenfaktoren, die eine Übertragung oder eine Kolonisierung mit <i>P. aeruginosa</i> begünstigen könnten	66
4.5. Limitation der Aussagekraft der Studie.....	68
5. Zusammenfassung der Dissertation.....	70
6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	85
8. Danksagung	86
9. Anhang.....	87
9.1. Ergebnisse Antibiogramm der Patientenisolate	87
9.2. Assembly der Patienten.....	91
9.3. Assembly der Umweltstämme	92
9.4. Übersicht über die 5 größten Cluster der Umweltproben	98
9.5. Patientenstämme mit nachgewiesenen Resistenzgenen.....	103
9.6. Übersicht der Umweltstämme mit nachgewiesenen Resistenzgenen	108

9.7. Übersicht der Patientenisolate und zugeordneten Umweltisolaten aufgeschlüsselt nach NGS Clustern	119
9.8. Übersicht über die NGS Cluster der Patientenisolate und den zum Patienten zugehörigen Umweltisolaten	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antibiotikaresistenzen in Prozentangaben Vergleich Deutschland zu Europa.....	4
Tabelle 2 Antibiotika, die zur Einteilung in MRGN Stämme verwendet werden.....	5
Tabelle 3 Kit Komponenten	19
Tabelle 4 Allgemeines Material zur DNA-Extraktion	20
Tabelle 5 Qubit-Assay	21
Tabelle 6 Einstellungen am Covaris zur Fragmentierung der DNA	22
Tabelle 7 Herstellung der verdünnten Beads.....	24
Tabelle 8 Kit Bestandteile von Illumina.....	28
Tabelle 9 Geräte zur Sequenzierung.....	29
Tabelle 10 Allgemeines Material fürs NGS	29
Tabelle 11 Lokalisation der Umweltproben und die dazugehörige Anzahl der Umweltproben	34
Tabelle 12 Patientenproben, die multiresistent gegenüber Antibiotika sind.....	37
Tabelle 13 Patientenproben, die das Carbapenemase Gen enthalten	40
Tabelle 14 Umweltstämme, die das Carbapenemase Gen enthalten.....	43
Tabelle 15 Übersicht über mögliche Übertragungen zwischen Umwelt und Patienten.	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Überblick über die Multilocus Sequencing Typisierung.....	10
Abbildung 2 Schematische Übersicht des NGS nach Illumina	14
Abbildung 3 Erklärung zum Einschluss der Umweltisolate.....	34
Abbildung 4 Übersicht der Antibiotikaresistenzen der klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolate.....	36
Abbildung 5 Häufigkeiten der verschiedenen Resistenzgene bei den Patientenproben	39
Abbildung 6 Häufigkeiten der verschiedenen Resistenzgene bei den Umweltproben...	42
Abbildung 7 SNP Distanzen zwischen den Stämmen	45
Abbildung 8 Phylogenetischer Stammbaum eingeteilt nach Clustern und Singletons ..	46
Abbildung 9 Phylogenetischer Stammbaum mit Patienten- und Umweltisolaten	47
Abbildung 10 Phylogenetischer Stammbaum mit den 52 <i>P. aeruginosa</i> Stämmen aus dem Patientenmaterial	48

Abbildung 11 Phylogenetischer Stammbaum mit den 239 <i>P. aeruginosa</i> Isolaten aus der Umwelt	49
Abbildung 12 Umweltproben nach Stationen eingeteilt mit den 5 größten Clustern.....	50
Abbildung 13 Entnahmezeitpunkte der Umweltisolate aus den 5 größten Clustern.....	51

Anhangsverzeichnis

Anhang Tabelle 1 Übersicht über die Ergebnisse der phänotypischen Antibiogramme der klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolate	87
Anhang Tabelle 2 Assembly der Patienten mit Sequence_count, N50 Wert und GC Gehalt.....	91
Anhang Tabelle 3 Assembly der Umweltstämme mit Sequence_count, N50 Wert und GC Gehalt	92
Anhang Tabelle 4 Übersicht über die 5 größten Cluster mit den dazugehörigen Umweltproben und Entnahmedaten	98
Anhang Tabelle 5 Patientenstämme mit Resistenzgenen	103
Anhang Tabelle 6 Umweltstämme mit Resistenzgenen	108
Anhang Tabelle 7 Übersicht der Patientenisolate und der zugeordneten Umweltisolate aufgeschlüsselt nach NGS Clustern	119
Anhang Tabelle 8 Übersicht über die NGS Cluster der Patientenisolate und den zum Patienten zugehörigen Umweltisolate	126

Abkürzungsverzeichnis

BLAST.....	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
COPD.....	Chronic obstructive pulmonary disease
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EARSS.....	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
EtOH.....	Ethanol
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance System
H ₂ O	Wasser
HCl.....	Salzsäure
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KBE	Koloniebildende Einheit
KHz.....	Kilohertz

MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MBL.....	Metallo- β -Laktamase
ml.....	Mililiter
MLST.....	Multilocus Sequenz Typing
MRGN	multiresistente Gram negative Bakterien
MRSA.....	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOH.....	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation Sequencing
nm	Nanometer
nM.....	Nanomolar
PCR.....	Polymerase chain reaction
pH	Potentia Hydrogenii
pM.....	Picomolar
RKI	Robert Koch-Institut
RNA.....	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SBS	Sequencing by Synthesis
SDS.....	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SNP.....	Single Nucleotide Polymorphism
TrinkwV.....	Trinkwasserordnung
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trimethaxim, Trometamol
UPGMA.....	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UV	Ultraviolettes Licht

1. Einleitung

In der Einleitung wird eine Übersicht über das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und dessen Bedeutung als Erreger von nosokomialen Infektionen im Krankenhaus gegeben. Weiterführend werden die bisherigen Erkenntnisse zu diesem Erreger im Hinblick auf Antibiotikaresistenzen und dem Auftreten in Abwassersystemen vorgestellt, um abschließend die Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit zu präzisieren.

1.1. P. aeruginosa als Erreger von nosokomialen Infektionen im Krankenhaus

P. aeruginosa ist ein Gram negatives Stäbchen, das verschiedenste Infektionen wie Pneumonien (Lungenentzündungen), Sepsis (Blutvergiftungen), Wundinfektionen und Harnwegsinfektionen bedingt (Gaynes and Edwards, 2005, Rosenthal et al., 2010, Gould and Wise, 1985, Trautmann et al., 2009) und häufig bei hospitalisierten Patienten nachgewiesen wird. Eine im Krankenhaus erworbene Infektion wird als nosokomial bezeichnet, wenn erste Krankheitssymptome frühestens nach 48 Stunden bzw. am 3. Tag des Krankenhausaufenthalts auftreten (Garvey et al., 2016, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2017).

Nach der Studie des European Centre for Disease Prevention and Control ist *P. aeruginosa* das vierthäufigste Bakterium in Europa, das für nosokomiale Infektionen verantwortlich ist (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Eine Studie auf der Intensivstation aus dem Jahre 2013 hat gezeigt, dass *P. aeruginosa* 18 % der nosokomialen Pneumonien verursacht. Er ist somit der häufigste Erreger von im Krankenhaus erworbenen Pneumonien (Gaynes and Edwards, 2005). Außerdem ist das Gram negative Bakterium für 3-4 % der Blutstrominfektionen und 20 % der Wundinfektionen verantwortlich (Gaynes and Edwards, 2005). Mit 16-20 % ist es nach *Escherichia coli* der zweithäufigste Erreger von nosokomialen Infektionen des Harntraktes (Gaynes and Edwards, 2005).

Eine besonders hohe Mortalitätsrate wird bei immunsupprimierten Patienten und Patienten, die an einer Sepsis erkrankt sind, beobachtet (Kang et al., 2003, Tumbarello et al., 2011, Willmann et al., 2013). Diese liegt bei einer Blutstrominfektion bei 39 % (Kang et al., 2003).

1.2. Antibiotikaresistenzen bei *P. aeruginosa*

P. aeruginosa kann eine Vielzahl von Mechanismen besitzen, die zu einer Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika führen. Zu diesen zählen die äußere Zellmembran, die eine eingeschränkte Permeabilität aufweist, und Enzyme wie die β -Laktamasen sowie Efflux-Pumpen, die in der Zytoplasmamembran lokalisiert sind (Hancock and Speert, 2000, Hancock, 1998, Lambert, 2002).

Die Efflux-Pumpen bestehen aus einem Proteinkomplex und sind in der Lage, verschiedene Substanzen aus dem Erreger zu schleusen. Über das Regulatorgen *mexR* wird die Expression der MexAB-*oprM* Efflux-Pumpe kontrolliert. Es handelt sich hierbei um eine der wichtigsten Pumpen, die *P. aeruginosa* zur Resistenzbildung nutzt. Sie vermittelt nicht nur Resistenzen gegenüber β -Laktam Antibiotika und Chinolonen, sondern auch gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln. Des Weiteren gibt es die MexXY-*oprM* Pumpe sowie die MexEF-*oprM* Pumpe, die Aminoglykoside beziehungsweise Carbapeneme und Chinolone aus dem Erreger schleusen (Lambert, 2002).

Eine besondere Herausforderung stellen derzeit multiresistente *Pseudomonaden* dar, die eine Metallo- β -Laktamase (MBL) bilden (Willmann et al., 2013, Hancock and Speert, 2000, Lambert, 2002). Die MBL Gene befinden sich häufig auf sogenannten Integron-Strukturen, die durch mobile Elemente wie Plasmide übertragen werden (Peter et al., 2014, Hancock, 1997). Das Besondere der MBLs ist, dass sie nicht nur β -Laktam Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine und Monobactame, sondern auch Carbapenem Antibiotika wie Imipenem und Meropenem hydrolysieren und inaktivieren (Bush, 2001, Peter et al., 2014, Zhanel et al., 1998, Cornaglia et al., 2011). Meropenem und Imipenem waren lange Zeit die präferierten Antibiotika zur Therapie von Infektionen

mit *P. aeruginosa* (Zhanel et al., 1998, Judd et al., 2016). Es wird vermutet, dass durch die Verbreitung der MBLs die Anzahl der multiresistenten Keime bei infizierten Patienten anstieg sowie die Mortalität bei Infektionen mit Meropenem-resistenten Erregern zunahm (Judd et al., 2016, Willmann et al., 2013). Zu den klinisch relevanten MBLs gehören die Enzyme IMP, VIM, SPM und NDM (Cornaglia et al., 2011, Khorvash et al., 2017). Durch die klassischen β -Laktam Inhibitoren wie Clavulansäure und Tazobactam können die MBLs nicht ausreichend gehemmt werden, wodurch die Therapie mit multiresistenten *Pseudomonaden* erschwert wird (Bush, 2001).

Eine Vielzahl der Resistenzgene können zwischen den verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen, aber auch zwischen verschiedenen Bakterienspezies über Transposons, Prophagen und Plasmide ausgetauscht und übertragen werden (Davies and Davies, 2010, Willmann et al., 2015b).

Um die Dynamik der Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen zu erfassen, wurden internationale Netzwerke etabliert. Europaweit werden die Entwicklungen von Antibiotikaresistenzen in zwei zentralen Systemen, dem European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) und dem German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance System (GENARS) dokumentiert und von dort gebündelt an das Robert Koch-Institut (RKI) weitergeleitet, welches die Antibiotikaresistenzen in Deutschland koordiniert und analysiert (Robert Koch-Institut, 2007).

Die nachfolgende Tabelle stellt die Resistenzraten bei *P. aeruginosa* in Deutschland und Europa für das Jahr 2016 vergleichend gegenüber (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). Es wird deutlich, dass die Resistenzraten in den meisten Fällen im Jahre 2016 in Deutschland niedriger sind als in Gesamteuropa (Noll et al., 2017).

Tabelle 1 Antibiotikaresistenzen in Prozentangaben Vergleich Deutschland zu Europa

(European Centre for Disease Prevention and Control, 2017)

Antibiotika	Deutschland	Europa
Piperacillin +/-Tazobactam	17,7 %	16,3 %
Fluorchinolone	12,5 %	15,0 %
Ceftazidim	10,5 %	13,0 %
Aminoglykoside	6,9 %	10,0 %
Carbapeneme	15,0 %	15,0 %
Kombinierte Antibiotikaresistenz	7,9 %	10,3 %

Nach dem EARS-NET Report, in dem Isolate aus Blutkulturen und Liquorproben einbezogen werden, zeigt sich, dass die Resistenzraten gegenüber einigen Antibiotikaklassen innerhalb Deutschlands in den Jahren 2013 bis 2016 im Mittel gleichgeblieben oder gesunken sind. Bis auf die Antibiotikaklassen Piperacillin und Tazobactam liegen die Resistenzraten unter den Werten des europäischen Durchschnitts (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017). Bei einigen Antibiotikaklassen ist ein leichter Rückgang innerhalb aller Länder, die am EARS-NET Report teilnehmen, zu verzeichnen. Jedoch wurden im Jahre 2016 vermehrt Ceftazidim resistente *Pseudomonaden* innerhalb Europas gemeldet (Noll et al., 2017).

Um eine Ausbreitung von multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen im Krankenhaus zu vermeiden, werden- je nach Ausmaß der Resistenz- Hygienemaßnahmen wie beispielsweise eine Einzelzimmerisolation des Patienten durchgeführt. In der täglichen Routine der mikrobiologischen Diagnostik werden die Antibiotikaresistenzen mit phänotypischen Tests bestimmt. Anders als beispielsweise bei wissenschaftlichen Studien ist es nicht möglich, die genauen Resistenzmechanismen detailliert für jedes Isolat aufzuklären.

Eine Einteilung der Antibiotikaresistenz zur Einleitung von krankenhaushygienischen Maßnahmen beruht daher in erster Linie auf dieser phänotypischen Testung. Nach den Empfehlungen der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) werden die multiresistenten Gram negativen Stäbchen anhand der Resistenz gegenüber Leitsubstanzen verschiedener Antibiotikaklassen eingeteilt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Antibiotika, die zur Einteilung in MRGN Stämme verwendet werden

Legende: 3 MRGN: Multiresistentes Gram negatives Stäbchen mit einer Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotika, 4 MRGN: Multiresistentes Gram negatives Stäbchen mit einer Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotika,
 R: Resistent, S: Sensibel (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2012)

Antibiotika	3 MRGN	4 MRGN
Acylureidopenicilline: Piperacillin	Nur eine Antibiotikaklasse ist sensibel	R
Cephalosporine der 3. Generation: Ceftazidim und/oder Cefotaxim		R
Carbapeneme: Imipenem und/oder Meropenem		R
Flurochinolone: Ciprofloxacin		R

Mit der Neudefinition der Kategorie „I“ (intermediär) in sensibel bei erhöhter Exposition (increased) wurde eine Anpassung der MRGN Klassifikation vorgenommen. Bei der Klassifikation von 3 MRGN *P. aeruginosa* werden die Ergebnisse „I“ nicht mehr als resistent gewertet (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2019).

Beim Vorliegen einer Carbapenemase wird der Stamm unabhängig von der phänotypischen Resistenztestung als 4 MRGN klassifiziert (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2019).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die phänotypische Resistenztestung von *P. aeruginosa* nach der Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) aus dem Jahre 2012.

1.3. P. aeruginosa im Abwassersystem

Ziel ist es, im Krankenhaus die Übertragung und die Entstehung von nosokomialen Ausbrüchen mit *P. aeruginosa* zu vermeiden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie ein Patient mit *P. aeruginosa* in Kontakt kommen und kolonisiert werden kann. Zum einen kann ein direkter Patient- zu -Patient Kontakt oder Personal- zu -Patient Kontakt zu einer Übertragung führen. Andererseits ist auch der Kontakt zu einer kontaminierten Umwelt, wie beispielsweise Dusche, WC oder Waschbecken, ein möglicher Ausgangspunkt für eine Kolonisierung. In dieser hier vorgelegten Studie wird der Fokus daraufgelegt, welche Rolle eine kontaminierte Umwelt bei einer Übertragung spielt.

P. aeruginosa gehört zu den häufigsten Erregern von nosokomialen Infektionen (Gould and Wise, 1985), auch aufgrund seiner Fähigkeit, im feuchten Milieu wie Wasser oder auch destilliertem Wasser zu überleben. Die lange Persistenz ist dabei insbesondere durch Stagnation von Wasser sowie der Korrosion und Bildung von Biofilmen begründet (Stjerne Aspelund et al., 2016, Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017). Folglich findet man *P. aeruginosa* beispielsweise in Toilettenschüsseln, Duschabflüssen, Badewannen, Wasserhähnen und in Waschbeckenabflüssen (Kanamori et al., 2016). Besonders gefährdet sind Patienten mit einem geschwächten Immunsystem, die sich beispielsweise auf der Intensivstation oder nach Stammzelltransplantation auf der hämatoonkologischen Station befinden (Zhou et al., 2016, Willmann et al., 2013, Kanamori et al., 2016). Durch ihr geschwächtes Immunsystem können sie sich mit *P. aeruginosa* über direkten oder indirekten Kontakt infizieren (Gould and Wise, 1985, Kanamori et al., 2016), beispielsweise beim Händewaschen durch Berühren der Wasserhähne, durch Zähneputzen oder beim Duschen durch Einatmen von Aerosolen (Trautmann et al., 2009).

In einer Studie von Trautmann et al. (2006) auf der Intensivstation konnte während eines Ausbruchs festgestellt werden, dass einige Patientenisolate, mit denen aus dem Leitungswasser isolierten *P. aeruginosa* hohe genetische Übereinstimmung aufwiesen. Jedoch gab es auch Patienten, deren isolierter Keim nicht mit den Genotypen der im Leitungswasser nachgewiesenen Stämme übereinstimmte, so dass andere Reservoirs auch eine Rolle bei dem Ausbruch auf der Intensivstation spielten. Die Wichtigkeit der Übertragung von Leitungswasser auf den Patienten sollte nach Trautmann aber dennoch

nicht unterschätzt werden (Trautmann et al., 2006, Trautmann et al., 2009). Besonders bei Patienten auf der Intensivstation führen Infektionen durch wasserbedingte Ausbrüche zu einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate (Kanamori et al., 2016, Kang et al., 2003, Tumbarello et al., 2011).

Die Wasserqualität des frischen Wassers unterliegt strengen Regularien, wohingegen es zur Überwachung des Abwassersystems wenig Vorgaben gibt. Die Trinkwasserversorgung (TrinkwV) ist in der Empfehlung des Umweltbundesamtes und in der Trinkwasserverordnung festgelegt. Gemäß § 5 der Trinkwasserverordnung von 2001 wird die Qualität und die Reinheit des Trinkwassers aus Sicht der Mikrobiologie bestimmt (TrinkwV, 2001). Nach § 5 Abs. 1 im Sinne des § 2 Abs. 1 des Infektionsschutzgesetz (IfSG) dürfen *P. aeruginosa* und andere Krankheitserreger, die für den Menschen gefährlich sein können, nicht im Trinkwasser vorhanden sein. Dies bedeutet, dass in 100 ml Wasser nur gering *P. aeruginosa* Erreger nachweisbar sein dürfen (<1 KBE/ 100 ml) (TrinkwV, 2001, Infektionsschutzgesetz, 2000, Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017).

So wird für bestimmte Einrichtungen, dazu gehören unter anderem nach §§ 23, 36 und 33 des IfSG Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen, Einrichtungen für ambulante Operationen, Kindertagesstätten, eine Empfehlung für eine jährliche Untersuchung auf den Erreger *P. aeruginosa* in § 19 Abs. 7 der TrinkwV von 2001 geregelt (TrinkwV, 2001, Infektionsschutzgesetz, 2000, Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017). Nach § 20 der TrinkwV von 2001 kann das zuständige Gesundheitsamt eine Untersuchung auf *P. aeruginosa* veranlassen, wenn eine konkrete Begründung und ein konkreter Verdacht auf eine Kontamination mit *P. aeruginosa* vorliegt (TrinkwV, 2001, Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017). Hervorzuheben ist, dass die Feststellung von *P. aeruginosa* in anderen Trinkwasseruntersuchungen immer als Nebenbefund angegeben wird und weitere Untersuchungen bei einem positiven Befund durchgeführt werden müssen. Kann das Bakterium in der Kontrollprobe nicht mehr nachgewiesen werden (<1 KBE/ 100 ml), sind keine weiteren Maßnahmen erforderlich (Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Umweltbundesamtes, 2002, Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017). Bei einem erneuten Nachweis muss die Kontaminationsquelle mit verschiedenen Maßnahmen, beispielsweise durch

Desinfektionsmittel oder Spülung mit Chlor, beseitigt werden (Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Umweltbundesamtes, 2002). Wenn nach 12 Wochen ohne erneute Zugabe von Desinfektionsmitteln und Chemikalien *P. aeruginosa* in 100 ml Wasser nicht erneut nachgewiesen wird, ist die Reinigung vollständig abgeschlossen (Empfehlung des Umweltbundesamtes, 2017).

Im Gegensatz zu diesen detaillierten Regelungen gibt es keine gesetzlichen Vorgaben, die hinsichtlich der Frage konkretisiert sind, wie und in welchen Fällen (bzw. wie häufig) patientennahe Sanitär- und Abwasserbereiche (wie Toiletten, Duschabflüsse und Waschbecken) auf mögliche Kontaminationen hin zu untersuchen sind. Dementsprechend sind gerade diese Bereiche als Ausbruchsquelle von besonderer Bedeutung, da sich der Patient durch Kontakt einem Ansteckungsrisiko aussetzen könnte. Zudem könnten diese innerhalb des Krankenhauses eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Erregers spielen. Trautmann et al. (2009) stellte verschiedene Studien dar, in denen durch unterschiedliche Maßnahmen wie Händedesinfektion nach dem Waschen oder dem Einbau von Sterilisationsfiltern das Risiko einer Infektion durch die Übertragung von Leitungswasser auf die Patienten signifikant reduziert wird (Trautmann et al., 2009).

Erschwerend kommt hinzu, dass man davon ausgehen muss, dass Antibiotika im Krankenhaus in das Abwassersystem gelangen können, so dass *Pseudomonaden* mit Antibiotikaresistenzen besonders selektioniert werden könnten. Zudem könnte ein erhöhter Antibiotikaselektionsdruck den Austausch von Resistenzen zwischen verschiedenen Bakterien in diesen Wassersystemen begünstigen (Zhou et al., 2016).

1.4. Typisierung und Aufklärung von Transmissionsketten durch die Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen den Stämmen

Um die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung einschätzen zu können, kann der Verwandtschaftsgrad der verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme zueinander bestimmt werden. Hierzu stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.4.1. Multilocus Sequenz Typing (MLST)

Bei der Multilocus Sequenz Typing (MLST) Methode werden verschiedene Loci, z. B. aus dem bakteriellen Genom und aus dem Genom von Pilzen, amplifiziert und sequenziert. Sie dient der Charakterisierung, der Bestimmung von Verwandtschaftsgraden und der globalen epidemiologischen Untersuchung von Bakterienstämmen. Des Weiteren können die Übertragungswege von Bakterien nachvollzogen und verstanden werden (Ibarz Pavón and Maiden, 2009).

MLST wurde 1998 zum ersten Mal bei *Neisseria meningitidis*, dem Erreger der Meningokokken Meningitis, beschrieben (Belén et al., 2009, Ibarz Pavón and Maiden, 2009, Urwin and Maiden, 2003). Damals wurden 11 Housekeeping Gene von *Neisseria meningitidis* von 107 Isolaten untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien dieser Spezies unterschiedliche Allelsequenzen besitzen, die unterschiedliche Sequenztypen bilden (Maiden et al., 1998).

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz benutzt man Housekeeping Gene, die aus ca. 450-500 bp bestehen. Die Housekeeping Gene werden zur Sequenzierung benutzt, da sie eine relativ langsame Nukleotidvariationsrate besitzen und damit genetisch stabil sind. Der Austausch von Nukleotiden (Punktmutationen) ist ein gleichförmiger Prozess, weshalb sie vor allem für die Untersuchung der Evolution von großer Bedeutung sind (Enright and Spratt, 1999, Sullivan et al., 2005). Für die Bakterien haben sie im Rahmen des Stoffwechsels eine essentielle metabolische Funktion (Urwin and Maiden, 2003, Sullivan et al., 2005).

Folgende Vorgehensweise hat sich bei der Anwendung der MLST zur Typisierung von *P. aeruginosa* durchgesetzt. Es werden 7 Loci mit Housekeeping Genen zur Typisierung herangezogen, die zuvor mittels PCR-Primern amplifiziert wurden. Anschließend werden die Nukleotide des PCR-Produktes sequenziert. Jede unterschiedliche Nukleotidsequenz eines Housekeeping Gens bekommt eine Allelnummer. Durch die verschiedenen Allel-Nummern entsteht für den Klon ein bestimmtes Allelprofil, das einen spezifischen Sequenztyp bildet (Sullivan et al., 2005, Enright and Spratt, 1999, Urwin and Maiden, 2003).

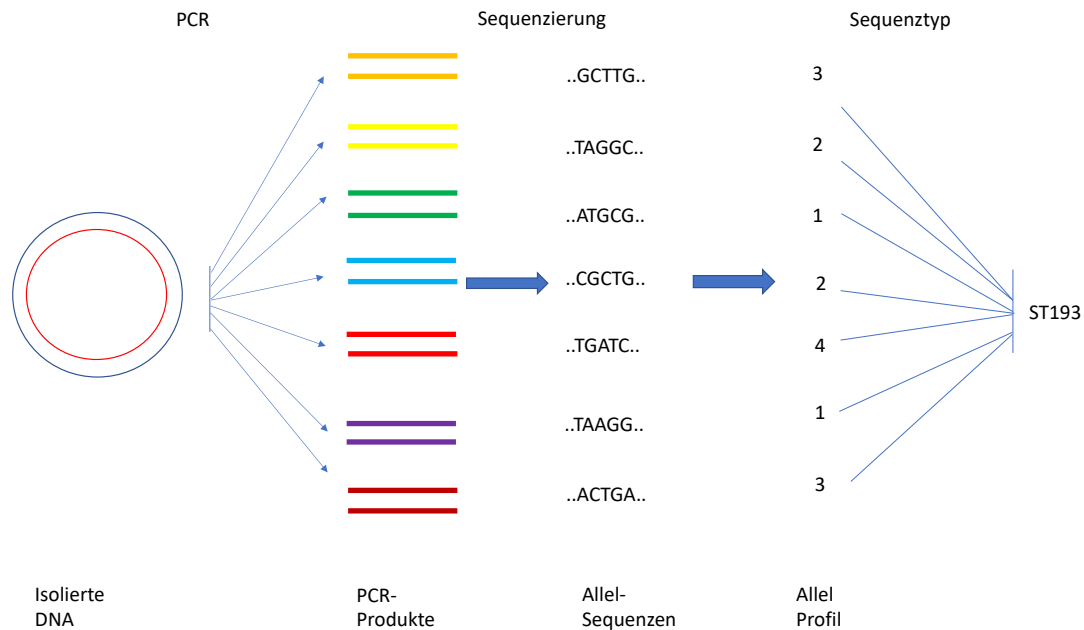


Abbildung 1 Überblick über die Multilocus Sequencing Typisierung.

Legende: Aus der isolierten DNA werden die 7 Housekeeping Gene sequenziert und die Allel-Sequenzen den Allel-Profilen zugeteilt, so dass hinterher ein spezifischer Sequenztyp entsteht.

Schema von MLST.net modifiziert nach: (Ruppitsch, 2016)

Mit Hilfe des Sequenztyps kann man auf der online verfügbaren Datenbank <https://pubmlst.org/paeruginosa/> (zuletzt geöffnet 19.10.2019) das Bakterium und die Beziehungen und Verwandtschaftsgrade durch Vergleich der Sequenztypen innerhalb einer Spezies ermitteln. Für die meisten Loci gibt es eine große Anzahl an Allelvariationen, so dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass zwei genetisch weiter entfernte Isolate ein identisches Allelprofil besitzen und somit einem Klon zugeordnet werden (Enright and Spratt, 1999).

Der Vorteil dieser Methode ist, dass man die Sequenztypen in der Datenbank einlesen kann und sich neue Erkenntnisse über neue Sequenztypen über das Internet austauschen lassen (Maiden et al., 1998).

1.4.2. Repetitive PCR (Polymerase chain reaction) mittels Diversilab

Allgemein handelt es sich bei der PCR (Polymerase chain reaction) um ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Bei der repetitiven PCR binden definierte Primer an nicht-codierende repetitive Sequenzen, an verschiedenen Stellen des

bakteriellen Genoms. Die nicht-codierenden Bereiche sind zwischen 50-60 bp lang, wodurch sich ca. 500-1000 Kopien pro Genom ergeben (Hiatt and Seal, 2009). Zwischen den repetitiven Sequenzen wird die DNA amplifiziert, d.h. diese Abschnitte werden vervielfältigt, wodurch ein spezifischer Fingerabdruck durch die verschieden langen PCR-Fragmente für ein Bakterium entsteht (Hiatt and Seal, 2009, Healy et al., 2005, Versalovic et al., 1991).

Das DiversiLab ist ein kommerzielles System zur Analyse der genetischen Verwandtschaft, das sich das Prinzip der repetitiven PCR zunutze macht. Zunächst wird die genomische, bakterielle DNA extrahiert, um anschließend eine repetitive PCR durchzuführen mit dem Ziel, einen genomischen Fingerabdruck des Bakteriengenoms zu erstellen. Nachdem sich die Primer an die nicht-kodierenden Bereiche der DNA gebunden haben und diese DNA-Abschnitte amplifiziert wurden, werden diese Fragmente mit Hilfe von Gelelektrophoresen aufgetrennt und visualisiert. Hierzu kommen die „Microfluid Elektrophorese“ und „Bioanalyzer“ zum Einsatz. Jedes aufgetrennte Fragment hat eine eigene Fluoreszenzintensität, so dass ein individueller Graph entsteht, der den genomischen Fingerabdruck der Probe darstellt. Dieser wird in der DiversiLab Software hochgeladen und analysiert (Healy et al., 2005, Shutt et al., 2005). Der Benutzer kann sogenannte „Reports“ erstellen, die der Typisierung und der Klassifikationen von Bakterienstämmen dienen. Mit Hilfe dieser „Reports“ können Analysetools erstellt werden, die die Beziehungen zwischen Proben vereinfachen und analysieren (Biomérieux, 2009). Im DiversiLab System gibt es unterschiedliche Darstellungsmöglichkeiten wie das Dendrogramm, die „Similarity Matrix“ und den „Scatterplot“, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den einzelnen Proben zu analysieren (Shutt et al., 2005, Biomérieux, 2009). Die Ähnlichkeit zweier Proben kann der Nutzer durch das Vergleichen des Dendogramms, der Intensität der Banden im Gel oder durch die „Similarity Matrix“ überprüfen (Biomérieux, 2009, Biomérieux, 2014).

1.4.3. Next-Generation Sequencing (NGS)

Next-Generation Sequencing (NGS) ermöglicht die Erzeugung von Millionen von DNA-Sequenzen aus einer Probe. Im Rahmen der Typisierung von bakteriellen Erregern spielt

vor allem das Whole-Genome Sequencing eine große Rolle, wobei man hierunter die Erstellung eines kompletten bakteriellen Genoms versteht.

Die DNA-Sequenzierung hatte ihren Durchbruch im Jahre 2001, als im Rahmen des Human Genom Projektes erstmals das menschliche Genom vollständig sequenziert wurde (Zhang et al., 2011, Faita et al., 2012). Vor der Einführung der NGS-Technologie im Jahre 2005 war seit 1977 die Didesoxynukleotidmethode von Sanger, auch Kettenabbruchmethode oder First Generation Sequencing genannt, der Goldstandard zur DNA-Sequenzierung (Mardis, 2008b, Zhang et al., 2011, Metzker, 2010, Sanger and Coulson, 1975, Faita et al., 2012, Morozova and Marra, 2008). Obwohl die Sanger-Sequenzierung immer wieder verbessert und technisch erweitert wurde, bot diese auch Einschränkungen, weshalb die NGS- Technologie entwickelt wurde, die schneller und preiswerter geworden ist, aber weiterhin eine sehr kostspielige Methode darstellt (van Dijk et al., 2014, Morozova and Marra, 2008). Durch die neue Technologie wurde der Horizont der Sequenzierung verwandter Organismen für Evolutionsstudien und die Feststellung genetischer Unterschiede zwischen Gesundheit und Krankheit erweitert (Metzker, 2010). Als wesentlicher Vorteil der NGS-Technologie gegenüber der Sanger-Sequenzierung lässt sich herausstellen, dass kurze DNA-Sequenzen mit bis zu ca. 300 bp parallel sequenziert werden können, weshalb diese Methode auch *parallel sequencing* genannt wird (Zhang et al., 2011, Morozova and Marra, 2008, Mardis, 2008b).

Es gibt mittlerweile verschiedene NGS-Technologien, wobei die verschiedenen Technologien diverse Vor- und Nachteile aufweisen. Derzeit findet die Technologie der Firma Illumina in der diagnostiknahen Mikrobiologie die größte Verbreitung (Faita et al., 2012).

Da auch im Rahmen dieser Arbeit die *P. aeruginosa* Isolate aus den Patienten- und Umweltisolaten mittels der NGS-Methode von Illumina sequenziert wurden, wird im Folgenden diese Methode näher erläutert.

Illumina verwendet die Methode Sequencing by Synthesis (SBS), mit der über 90 % der Sequenzierungsdaten erzeugt werden, da sie eine hohe Genauigkeit und eine hohe Ausbeute fehlerfreier Lesevorgänge besitzt (Illumina, 2017).

Sie wird in vier Hauptschritte gegliedert:

1. Bibliothek erstellen (Library Preparation)
2. Erstellung eines Clusters (Cluster Generation)
3. Sequenzierung
4. Datenanalyse (Illumina, 2017)

Im ersten Schritt wird die DNA in kleine Fragmente zerteilt, und an das 5'- und 3'- Ende dieser Fragmente werden Adapter ligiert. Die DNA-Fragmente mit gebundenen Adaptern werden in der PCR amplifiziert. Die Adapter ermöglichen eine Bindung der DNA-Fragmente an die Fließzelle (Flow Cell) sowie eine Zuordnung zu einer einzelnen Probe (Index) und beinhalten die Bindungsstelle für den Sequenzierprimer.

Um sogenannte Cluster zu generieren, werden die amplifizierten DNA-Fragmente in die Flow Cell geladen. An diese sind Oligonukleotide gebunden, die komplementär zu den zuvor gebundenen Adaptern sind. Durch die Bindung an die Oligonukleotide entstehen sogenannte Brücken. Mit Hilfe der gebildeten Brücken werden die DNA-Stränge amplifiziert (Bridge Amplification), so dass Bereiche (Cluster) entstehen (Illumina, 2017).

In diesen Clustern haben die einzelnen DNA-Stränge die gleiche Sequenz. Im nächsten Schritt findet die Sequencing by Synthesis (SBS) Methode statt, bei der alle 4 Nukleotide am 3'-Ende Fluoreszenz markiert bzw. blockiert sind und mit der DNA-Polymerase gleichzeitig hinzugegeben werden (Mardis, 2008a, Zhang et al., 2011, Bentley et al., 2008). Da alle 4 Nukleotide gleichzeitig zu jedem Vorgang hinzugegeben werden, minimiert das die natürliche Konkurrenz, und die Fehlerhäufigkeit beim Einbau falscher Nukleotide wird reduziert (Bentley et al., 2008, Illumina, 2017). Sobald ein Nukleotid, das sich komplementär zum Matrix-Strang verhält, eingebaut ist, wird der Laser angeregt und das Fluoreszenzsignal gemessen. Damit der Zyklus fortfährt und sich erneut ein Nukleotid einbauen kann, wird die Fluoreszenzmarkierung abgespalten und die

Hydroxylgruppe wieder regeneriert (Bentley et al., 2008). Durch die Messung der Fluoreszenzsignale entsteht für jedes DNA-Fragment eine spezifische Sequenz. Je nach Fragestellung gibt es verschiedene Strategien die Sequenzdaten zu analysieren. Hierzu gehören z. B. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion-Deletion Identifikation und phylogenetische oder metagenomische Analysen (Illumina, 2017).

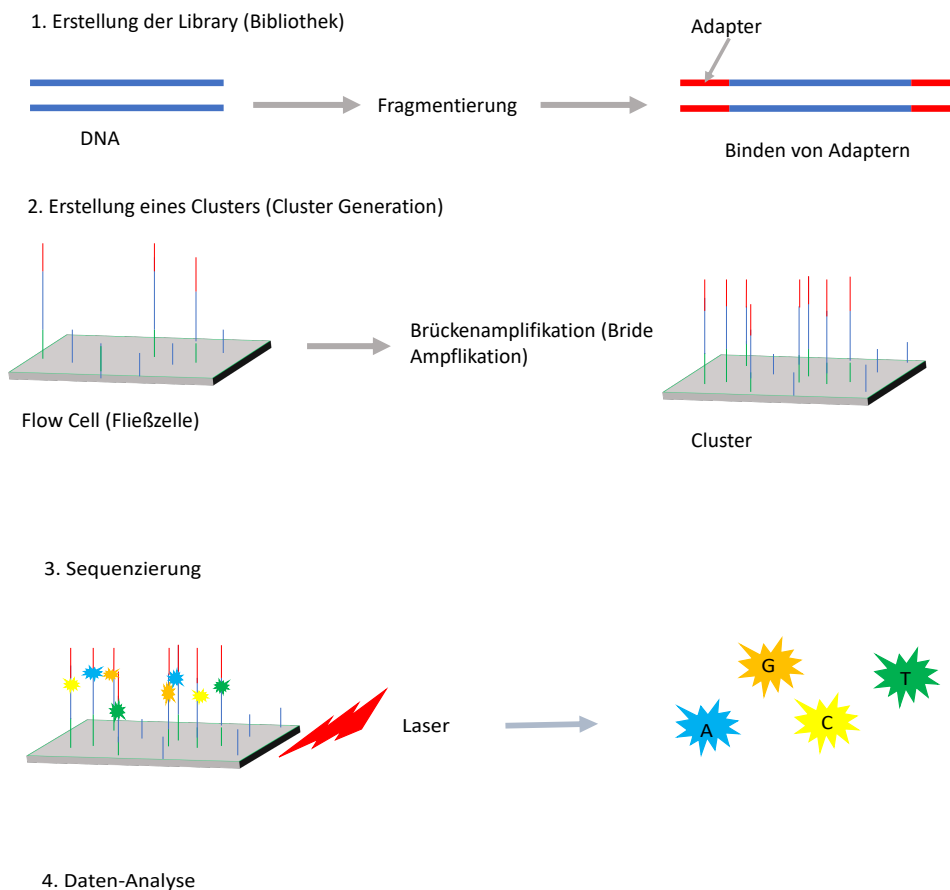


Abbildung 2 Schematische Übersicht des NGS nach Illumina

Legende:

1. Erstellung einer Library: Die DNA wird fragmentiert und an die Fragmente werden Adapter gebunden.
2. Herstellung eines Clusters: Die DNA-Fragmente binden mit den Adaptern an die Flow Cell. Es entstehen sogenannte Cluster.
3. Sequenzierung der DNA: Es werden Fluoreszenz-markierte Nukleotide eingebaut, die über den Laser angeregt werden und ein bestimmtes Signal freilassen.
4. Datenanalyse

Modifiziert nach: (Illumina, 2017, Illumina, 2010)

Ein wichtiger Fortschritt der Illumina-Technologie ist die Sequenzierung von Paaren (paired-end Sequenzierung). Bei der paired-end Sequenzierung wird parallel von beiden

Enden aus der DNA-Strang sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung abgelesen und sequenziert. Durch diese Methode werden doppelt so viele Lesevorgänge innerhalb eines Sequenzierlaufs durchgeführt als bei der single-end Sequenzierung, bei der das Fragment nur in einer Richtung gelesen wird (Illumina, 2017).

Der Vorteil des Einsatzes von NGS zur Typisierung und Bestimmung der genetischen Verwandtschaft verschiedener Bakterienisolate besteht darin, dass das nahezu komplette bakterielle Genom zum Vergleich der Stämme herangezogen werden kann.

1.5. Fragestellung und Ziel der Studie

P. aeruginosa ist einer der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen, die häufig mit einer hohen Letalität wie beispielsweise bei Blutstrominfektionen einhergehen. In besonderer Weise sind immunsupprimierte Patienten gefährdet, wie beispielsweise Patienten während einer Chemotherapie und nach einer Stammzelltransplantation. Die zunehmende Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika erschweren effiziente Behandlungsstrategien und stellen sowohl die behandelnden Ärzte als auch die Krankenhaushygiene vor große Herausforderungen.

Prinzipiell kann *P. aeruginosa* durch Patienten-Patienten-Kontakt, Personal-Patienten-Kontakt und über Kontakt mit kontaminierter Umgebung übertragen werden.

Da *P. aeruginosa* die Fähigkeit besitzt, sich an die Lebensbedingungen im feuchten Milieu von Toiletten, Duschen und Waschbecken anzupassen, geht hiervon ein potenzielles Risiko für die Übertragung und nachfolgende Kolonisation beziehungsweise Infektion mit *P. aeruginosa* aus. Diese patientennahen Reservoirs wurden schon häufiger als Ursachen von Ausbrüchen von multiresistenten *Pseudomonaden* identifiziert. Jedoch ist bisher noch unklar, wie hoch das Risiko einer Kolonisierung bzw. Infektion ist, welches von kontaminierten Toiletten, Waschbecken und Duschen ausgeht und welchen Beitrag diese Quelle insgesamt zur Anzahl der mit *P. aeruginosa* kolonisierten Patienten beiträgt.

Seit 2009 kam es im Bereich des Universitätsklinikums Tübingen zu einem gehäuften Nachweis von multiresistenten *P. aeruginosa* Isolaten bei Patienten. Als Konsequenz daraus wurde in diesem Bereich ein wöchentliches Rektalscreening aller Patienten sowie

ein Aufnahmescreening auf Kolonisierung mit *P. aeruginosa* eingeführt. Zudem wurde ein Screening in den Bädern der Patientenzimmer etabliert, was in 14-tägigem Rhythmus durchgeführt wurde und die Toilette, den Abfluss des Waschbeckens und den Ablauf der Dusche einschloss. Diese Isolate bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

Ziel dieser retrospektiven Studie war es, die Übertragungsdynamik von *P. aeruginosa* von Nasszellen auf Patienten zu untersuchen. Hierfür wurden Patienten identifiziert, die initial mit einem negativen Rektalabstrich aufgenommen worden waren und im Verlauf ihres Krankenhausaufenthaltes einen positiven Nachweis für *P. aeruginosa* hatten. Anschließend wurden die Zimmer, in denen sich der Patient vor seinem positiven *P. aeruginosa* Nachweis aufgehalten hatte, identifiziert und dort nachgewiesene Isolate in die Studie eingeschlossen. Die Patienten- und Umweltisolate wurden mittels Next-Generation Sequencing typisiert und der Verwandtschaftsgrad der verschiedenen *P. aeruginosa* Isolate miteinander verglichen. Basierend auf der genetischen Verwandtschaft sowie dem epidemiologischen Zusammenhang zwischen den Isolaten wurde eine Übertragungshäufigkeit von Nasszellen im Patientenbereich auf die Patienten erhoben. Insgesamt standen hierfür 52 Patientenisolate und die dazugehörigen 239 Umweltisolate zur Verfügung.

2. Material und Methoden

2.1. Beschreibung der Stammsammlung und Stammauswahl für die Studie

Seit 2009 kam es auf Stationen des Universitätsklinikums Tübingen zu einem vermehrten Nachweis von multiresistenten *P. aeruginosa* Isolaten. Als Folge wurde ein wöchentliches Patientenscreening mittels eines Rektalabstriches zur Bestimmung des Kolonisierungsstatus der Patienten eingeführt. Zusätzlich wurden Beprobungen in den Badezimmern der Patienten durchgeführt. Wasserproben wurden hierfür aus Toiletten, Duschabflüssen und Waschbecken in 14-tägigem Rhythmus entnommen. Zusätzlich zum Patientenscreening und der Untersuchung der Umweltproben wurde vierteljährlich eine umfassende Umweltreinigung vorgenommen, um die *P. aeruginosa* Belastung im Abflusssystem (Toiletten, Duschabflüssen, Waschbecken) zu senken. Alle aus den Patienten- und Umweltproben kultivierten *P. aeruginosa* Stämme wurden im Institut für Mikrobiologie mittels Mikrobank tubes (Bestbion) bei -80 °C asserviert und standen für die Studie zur Verfügung.

Die Belegungs- und Verlegungsdaten der Patienten, einschließlich Aufnahme- und Entlassdatum, sowie Aufenthalt im Krankenhaus auf verschiedenen Stationen und Zimmern wurden aus dem Patientenverwaltungssystem gewonnen. Ebenfalls wurden hieraus die Abnahme und Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Rektalabstriche erhoben. Dies umfasste außerdem die phänotypischen Antibiogramme der klinischen Isolate, die nach Routine Protokollen durchgeführt (Peter et al., 2017) und nach den zu diesem Zeitpunkt gültigen EUCAST Breakpoints interpretiert wurden (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf).

Die Informationen über die Abnahme (Datum, Station, Standorte wie Toilette, Dusche und Waschbecken) von umweltrelevanten *P. aeruginosa* wurden im Hygienelabor des Institutes erfasst und gespeichert. In dem Zeitraum vom 15. Januar bis 30. November 2015 wurden insgesamt 52 Patienten identifiziert, die initial einen negativen Rektalabstrich hatten und während ihres Aufenthaltes im Krankenhaus positiv auf *P. aeruginosa* getestet wurden. Durch Erhebung der Zimmerbelegungsdaten der Patienten wurden die entsprechenden Umweltisolate aus den Zimmern identifiziert (n=239), so dass insgesamt 291 *P. aeruginosa* Stämme in dieser Studie untersucht wurden.

Die Durchführung der retrospektiven Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Universität Tübingen am 06.12.2016 unter dem Aktenzeichen 741/2016BO2 bestätigt.

2.2. DNA-Extraktion *P. aeruginosa* Stämmen

Einen Tag vor der DNA-Extraktion wurden die *P. aeruginosa* Stämme aus den Mikrobank tubes auf Schafsblut-Agar (Oxoid Deutschland GmbH) mittels Dreiösenausstrich ausgestrichen und bei 36 °C für 24 Stunden bebrütet. Es erfolgte eine optische Reinheitskontrolle der Agarplatten sowie bei untypischer Koloniemorphologie eine Re-Identifizierung des Stammes mittels MALDI-TOF (Bruker, Germany) nach den Standardprotokollen der mikrobiologischen Routinediagnostik (Peter et al., 2017).

Zur DNA-Extraktion wurde der UltraCleanMicrobial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories INC.) verwendet. Das Protokoll wurde nach den Vorgaben des Herstellers mit kleinen Modifikationen durchgeführt.

Zur Resuspendierung der Bakterien wurde eine halbe Einmalöse in 300 µl MicroBead Solution aufgelöst, die zuvor in einem 2 ml Collection Tube pipettiert wurde. Als nächstes wurde 50 µl MD1 Solution auf die MicroBead Solution mit den resuspendierten Bakterien pipettiert. Die MD1 Solution enthielt SDS und andere Reagenzien, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden die insgesamt 350 µl in ein MicroBead Tube überführt und für 10 Minuten gevortext, wodurch die vollständige Lyse der Zellen erreicht wurde. Danach wurden die Proben für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Collection Tube pipettiert. Zu dem Überstand wurde nun 100 µl MD2 pipettiert, um nicht DNA-Bestandteile wie Proteine auszufällen, damit die Reinheit der DNA erhöht werden konnte. Das Gemisch wurde nun für mind. 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Anschließend wurde das Gemisch erneut für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Es hatte sich erneut ein Überstand gebildet, der in ein neues 2 ml Tube pipettiert wurde. Zu dem Überstand wurde 900 µl MD3 Solution pipettiert. Hiervon wurden anschließend 650 µl in den Spin Filter pipettiert und für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieses Vorgehen wurde insgesamt zweimal wiederholt. Danach wurde 300 µl MD4 Solution auf den Spin Filter überführt. MD4 Solution enthielt Alkohol, der zum Waschen der DNA benötigt wurde. Damit sich die DNA bei diesem Vorgang nicht lösen konnte, war sie an die Filtermembran im Spin Filter gebunden.

Erneut wurde das Gemisch für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Spin Filter ohne Zusatz der Solution zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Filter auf ein Neues 2 ml Solution Tube gesetzt und für ca. 5 Minuten unter den Abzug gestellt, damit der restliche Alkohol verdampfen konnte. Als letztes wurde 50 µl MD5 Solution direkt auf die Filtermembran pipettiert und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. In der MD5 Solution war die DNA gelöst. Die DNA konnte in Gegenwart von MD5 Solution freigesetzt werden, da die Solution kein Salz enthält, die die DNA benötigt, um an den Spin Filter gebunden zu werden. Die extrahierte DNA wurde anschließend bei ca. -20 °C eingefroren.

Reagenzien

Kit Komponenten von UltraClean Microbiol DNA-Isolation Kit von MO BIO Laboratories, INc. sind:

Katalog Nummer: 12224-250 (250Preps)

Tabelle 3 Kit Komponenten

Komponenten	Kit Katalog	
	Katalog	Anzahl
MicroBead Tubes (contain 250 mg MicroBeads)	12224-250-BT	250
MicroBead Solution	12224-250-BS	80 ml
Solution MD1	12224-250-1	15 ml
Solution MD2	12224-250-2	30 ml
Solution MD3	12224-250-3	250 ml
Solution MD4	12224-250-4	90 ml
Solution MD5	12224-250-5	15 ml
Spin Filters Units in 2 ml Tubes	12224-250-SF	250
2 ml Collection Tubes	12224-250-T	1000

2.2.1. Allgemeines Material zur DNA-Extraktion

Tabelle 4 Allgemeines Material zur DNA-Extraktion

Material	Hersteller
Columbia-Agar mit Schafblut Plus	Oxoid Deutschland GmbH REF: PB5039A LOT2387543
Vortexer	Heidolph ReaxTop
Pipetten, diverse Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen, diverse Größen	Nerbeplus Germany
Impfeschlinge	10 µl
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 R
Abzug	Heraeus Instruments

2.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe des Qubit Fluorometers (Invitrogen) können auch sehr geringe Konzentrationen von DNA, RNA und Proteinen gemessen werden. Es handelt sich um ein Spektrometer, dass die UV-Absorption vom Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch gebunden sind, bei 260 nm messen kann. Die Konzentration der dsDNA wurde mit Hilfe des Qubit 2.0 Fluorometers gemessen. Dafür wurde das Protokoll des Quant-iT Assays (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden alle Assay Komponenten, die im Kühlschrank gelagert waren, ca. 30 Minuten im Dunkeln auf Raumtemperatur (RT) erwärmt.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt, wofür 9 µl HyClone Wasser und 1 µl Probe zusammen pipettiert wurden. Die Quant-IT Working Solution bestand aus 119 x n µl Quant-iT Buffer und 1 x n µl Quant iT Reagenz. Zum Erstellen der Standardkurve wurde der niedrigste Standard mit 0 ng/µl und der höchste Standard mit 10 ng/µl verwendet. Die Standardverdünnung wurde mit 190 µl Quant-iT Working Solution und 10 µl Standard vom Kit hergestellt, so dass ein Gesamtvolumen von 200 µl entstand.

Für die Analyse der Proben wurde ebenfalls ein Volumen von 200 µl benötigt. Daher wurde aus den im Verhältnis 1:10 verdünnten DNA-Proben 2 µl entnommen und zu 198 µl Working Solution pipettiert. Die Proben wurden für 2-3 Sekunden gevortexet und dann für 2-3 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert.

Folgende Einstellungen wurden am Qubit Fluorometer vorgenommen:

1. dsDNA Highsensitive
2. Volumen der Probe: 2 μ l
3. Konzentration, in der die Probe gemessen werden sollte: ng/ μ l

Die Standards (0 ng/ μ l und 10 ng/ μ l) wurden zuerst gemessen, um eine Standardkurve zu erhalten. Erst danach wurden die Proben gemessen.

Da die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden, mussten die Ergebnisse der Konzentration abschließend mit 10 multipliziert werden.

Reagenzien

Qubit-Assay: Quant-IT™ dsDNA Assay Kit, High Sensitivity 1000 assays von invitrogen by Thermo-Fisher scientific (Catalog No. Q33120)

Tabelle 5 Qubit-Assay

Komponenten	Anzahl
Quant-IT™ dsDNA HS reagent	1,0 ml
Quant-IT™ dsDNA HS buffer	250 ml
λ dsDNA HS Standard 10,0 ng/ μ l und 0 ng/ μ l	Je 500 μ l

Tubes: Qubit™ assay tubes 500 von Invitrogen (Catalog No: Q32856)

Qubit 2.0 Fluorometer Invitrogen

HyClone Wasser von Thermofisher

2.4. Herstellung einer Library zur Sequenzierung des bakteriellen Genoms von P. aeruginosa

Zur Sequenzierung der Genome musste eine sogenannte Library erstellt werden. In dieser Studie wurde hierfür das TruSeq Nano DNA HT Kit der Firma Illumina verwendet. Anschließend erfolgte die Sequenzierung auf dem NextSeq 500 Sequenzer (Illumina). Die folgenden Schritte wurden zur Erstellung der Library durchgeführt.

2.4.1. Isolation und Quantifizierung chromosomaler DNA

Zunächst musste die DNA mit Hilfe des Qubit (siehe Protokoll oben) quantifiziert werden.

2.4.2. Fragmentierung der DNA

Die Fragmentierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Covaris M220 (Covaris). Die Nukleinsäure wurde mittels Übertragung von akustischer Energie bei einer Ultraschallfrequenz (>400 KHz) und einer Wellenlänge von (ca. 3 mm) fragmentiert. Es entstanden somit dsDNA-Fragmente, die ein 3'- oder 5'- Ende besaßen. Für die Insert Size von 550 bp mussten folgende Einstellungen am Covaris vorgenommen werden:

Tabelle 6 Einstellungen am Covaris zur Fragmentierung der DNA

Setting	550 bp Insert
Duty factor	20 %
Peak Incident Power	50 W
Cycles per burst	200
Duration	45 Sekunden
Temperatur	20 °C

Für die Herstellung einer Library mit 550 bp Insert size benötigte man 494 ng DNA als Ausgangsmaterial. Von jeder Probe wurde dann die DNA-Menge in ein 2 ml Eppendorf Tube pipettiert und mit Hilfe des Resuspensions Puffer, der der Normalisierung diente, auf ein Volumen von 130 µl gebracht. Die gesamten 130 µl wurden in ein Covaris microTUBE AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap 6 x 16 mm möglichst luftblasenfrei überführt. Danach wurden die Covaris microTubes in den Covaris gestellt und die DNA für 46 Sekunden fragmentiert. Von der fragmentierten DNA wurden 50 µl in ein neues Eppendorf Tube pipettiert und die restlichen 80 µl zur Wiederverwendung in ein anderes Eppendorf Tube überführt.

2.4.3. Aufreinigung der fragmentierten DNA

Für den nächsten Schritt war es wichtig, dass die Sample Purification Beads gut gevortexet wurden, so dass alle Beads homogen verteilt waren. Zu je 50 µl der fragmentierten DNA wurden nun 80 µl Beads gegeben und durch mind. zehnmalsiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Danach wurde das Gemisch 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Eppendorf Tubes wurden in einen Magnetständer gestellt und es wurde gewartet, bis die Lösung klar wurde und sich die magnetischen Beads am Rand abgesetzt hatten. Von dieser Lösung wurden 125 µl abpipettiert und verworfen. Zum Waschen wurde 200 µl frisch angesetzter Ethanol 80 % (EtOH) dazugeben. Dabei war es wichtig, dass die Beads, die an die Magnete gebunden waren, nicht gelöst wurden. EtOH wurde vollständig abpipettiert und es wurde erneut 200 µl EtOH dazugegeben. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 2-mal wiederholt. Beim letzten Waschvorgang musste darauf geachtet werden, dass der EtOH vollständig abgenommen wurde. Danach wurde der verbleibende EtOH für 2 Minuten verdampft. Zu jeder Probe wurde 62,5 µl Resuspension Buffer gegeben und anschließend durchmischt. Die Beads wurden außerhalb des Magnetständers für 2 Minuten inkubiert. Erneut wurden die Eppendorf Tubes in den Magnetständer gestellt und es wurde gewartet, bis die Lösung sich geklärt hatte. 60 µl des klaren Überstandes wurden in ein neues Eppendorf Tube überführt und danach wurde unmittelbar mit dem End-Repair Vorgang fortgefahren.

2.4.4. End-Repair und Size Selection

Beim End-Repair Vorgang wurde der 3' - und 5' - Überhang in glatte Enden umgewandelt. Nach dem Auftauen des End-Repair Mix 2 wurden 40 µl des End-Repair Mix 2 zu 60 µl zu der DNA-Lösung gegeben. Diese wurden zum Durchmischen mind. zehnmal auf- und abpipettiert. Danach wurde die DNA-Lösung für 30 Minuten bei 30 °C im Thermocycler inkubiert. Erneut mussten die Sample Purification Beads gevortexet werden. Sie wurden mit H₂O von Braun verdünnt, um eine Größenselektion der DNA-Fragmente durchzuführen. Fragmentabschnitte, die kleiner oder größer als 550 bp waren, wurden durch die verdünnten Beads angezogen und entfernt. Beispielhaft ist eine Verdünnung in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Herstellung der verdünnten Beads

Verdünnung	Formel	Beispiel für 12 Proben	Meine Berechnung für 48 Proben
Sample Purification Beads	Anzahl der Proben x 92 µl	1104 µl	4416 µl
H ₂ O Wasser von Braun	Anzahl der Proben x 92 µl	1104 µl	4416 µl

Die Verdünnung wurde gut gemischt, um anschließend 160 µl der verdünnten Beads zu 100 µl DNA dazugeben. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Eppendorf Tubes auf den Magnetständer gestellt. Die magnetischen Beads sammelten sich am Rand der Tubes und die Flüssigkeit wurde geklärt. Von dem klaren Überstand wurde 250 µl in ein neues Eppendorf Tube überführt. Sample Purification Beads wurden nochmals gevortext und 30 µl der unverdünnten Beads wurden auf den klaren Überstand pipettiert. Die Lösung wurde mind. zehnmal auf- und abpipettiert und erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 276 µl des Überstandes abpipettiert und verworfen. Auf die Beads wurden zum Waschen 200 µl EtOH (80 %) gegeben und anschließend wieder abgenommen. Nochmals wurden 200 µl EtOH dazugegeben und vollständig abpipettiert. Der noch verbleibende Alkohol sollte für 2 Minuten bei RT verdampfen. Zu den Beads wurden 20 µl Resuspensions Buffer gegeben und die Lösung wurde zum Resuspendieren aus den Magnetständern genommen. Um erneut einen klaren Überstand zu erhalten, wurden die Eppendorf Tubes auf den Magnetständer gestellt. Anschließend wurde 17,5 µl des klaren Überstandes erneut in ein neues Eppendorf Tube pipettiert.

Nach diesem Schritt konnte das Protokoll unterbrochen werden und die DNA konnte für 7 Tage bei -20 °C eingefroren werden.

2.4.5. Adenylierung der Enden

Bei diesem Schritt wurde an das 3'-Ende Adenin angehängt. Nach dem Auftauen des A-Tailing Mix wurde 12,5 µl des Mixes zu 17,5 µl der DNA-Lösung gegeben. Nachdem die Proben mind. zehnmal auf- und abpipettiert wurden, wurden sie in den Thermocycler gestellt und folgendes Programm wurde durchgeführt:

- 37 °C 30 Minuten
- 70 °C 5 Minuten
- 4 °C 5 Minuten
- 4 °C ∞

Jedes Ende besaß nun einen A-Überhang, wodurch die Adapter im nächsten Schritt an diesen Überhang binden konnten. Unmittelbar nach diesem Schritt wurde mit der Adapterligation fortgefahren.

2.4.6. Adapterligation

Der Ligation Mix 2 wurde aus dem -20 °C Kühlschrank entnommen. Zu den 30 µl der fragmentierten DNA mit Poly A Tail wurden 2,5 µl Resuspensions Buffer, 2,5 µl Ligation Mix 2 und 2,5 µl Adapter gegeben. Der Ligationsansatz wurde zum Mischen zehnmal auf- und abpipettiert. Für 10 Minuten wurden die Eppendorf Tubes erneut im Thermocycler bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils 5 µl Ligations Buffer dazu pipettiert und gemischt. Sample Purification Beads wurden gevortexet und je 42,5 µl wurden zu dem Ligationsansatz dazugegeben. Dieser Ansatz wurde zum Mischen zehnmal auf- und abpipettiert. Nach der Inkubation von 5 Minuten bei RT wurden die Eppendorf Tubes in die Magnetständer gestellt und es wurde abgewartet, bis sich die Beads am Rand abgesetzt hatten. Anschließend wurden 80 µl des klaren Überstandes verworfen und die Proben wurden zweimal mit 200 µl EtOH (80 %) gewaschen. Anschließend wurden für 2 Minuten die Eppendorf Tubes stehen gelassen, um den restlichen Alkohol verdampfen zu lassen. Zur Resuspension der Beads wurden 52,5 µl Resuspensions Buffer dazugegeben und die Beads wurden durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurde das Gemisch erneut für 2 Minuten bei RT inkubiert und in die Magnetständer gestellt, um erneut eine klare Flüssigkeit zu erhalten. Anschließend wurden 50 µl der klaren Flüssigkeit in ein neues Eppendorf Tube überführt und 50 µl Sample Purification Beads zur DNA hinzugegeben. Die Proben wurden durchmischt und für 5 Minuten bei RT im Magnetständer inkubiert. Anschließend wurde 50 µl des klaren Überstandes verworfen und die Proben erneut mit 200 µl des frisch angesetzten EtOH (80 %) zweimal gewaschen. Damit der restliche Alkohol verdampfen konnte, wurden die Proben für mind. 2 Minuten stehen gelassen. Zum Resuspendieren der Beads wurden jeweils 27,5 µl Resuspensions Buffer hinzugegeben und die Proben in

die Magnetständer gestellt. Von dem klaren Überstand wurden 25 µl in ein neues Eppendorf Tube überführt. Nach diesem Schritt konnten die Proben für 7 Tage bei -20 °C gelagert werden.

2.4.7. PCR

Um die DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde eine PCR durchgeführt.

Nach dem Auftauen der PCR Primer und des Enhanced PCR Mixes wurden zu jeder Probe 5 µl PCR Primer und 20 µl Enhanced PCR Mix dazugegeben und durchs auf- und abpipettieren gemischt.

Die Eppendorf Tubes wurden in den Thermocycler gestellt und die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

- 95 °C 3 Minuten
- 8 Zyklen mit:
 - o 98 °C 20 Sekunden
 - o 60 °C 15 Sekunden
 - o 72 °C 30 Sekunden
 - o 72 °C 5 Minuten
 - o 4 °C ∞

2.4.8. Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Quantifizierung der DNA wurde mit Hilfe des Qubit Flurometers 2.0 (genaues Protokoll siehe oben) und die Qualitätskontrolle und Größenabschätzung der Library wurden mittels der Kapillargelelektrophorese durch das QIAxcel (QIAGEN) Gerät durchgeführt. Für die Messung wurde eine 1:20 Verdünnung der Library in Resuspensions Buffer hergestellt. Dazu wurden 2 µl Library mit 38 µl Resuspensions Buffer verdünnt. Anschließend wurden 20 µl der Verdünnung im QIAxcel Gerät analysiert und die Größe der Fragmente visualisiert. Die zu erwartende Größe lag bei einer DNA insert size von 550 bp bei 760 bp.

Zur Konzentrationsbestimmung der Library DNA mittels des Qubit Fluormeter 2.0 wurden 2 µl aus der Verdünnung entnommen. Die Herstellung der Working Solution sowie die Messung folgte nach den obigen Angaben (siehe 2.3.).

2.4.9. Normalisierung und Poolen der Libraries

Zuerst wurde eine 0,2 N NaOH Lösung hergestellt. Sie bestand aus 40 µl H₂O Braun und 10 µl 1,0 N NaOH Lösung.

Die Library wurde mit Hilfe des Hybridization Buffers (HT1 Buffer) auf eine 4 nM in 20 µl Volumen eingestellt. Dies wurde mittels eines Tools berechnet:

<http://scienceprimer.com/dna-ng-nm-calculator>

Formeln:

1. Konzentration wird von ng/µl in nM umgewandelt:

$$\text{nM} = \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times \frac{\text{g}}{1 \times 10^9} \times \frac{\text{Mole von Basenpaaren}}{\text{Länge der Basenpaare} \times 660 \text{ g (1 Mole von Nukleotid Basenpaare)}} \times \frac{1 \times 10^6 \mu\text{l}}{\text{L}} \times \frac{1 \times 10^9 \text{ nM}}{\text{M}}$$

$$\Rightarrow \text{nM} = \text{DNA-Konzentration} \times \frac{1}{10^9} \times \frac{1}{760 \times 660} \times \frac{1 \times 10^6}{1} \times \frac{1}{1 \div 10^{-9}}$$

2. Volumen von Template in µl

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

C₁ = Anfangskonzentration in nM

V₁ = unbekannt

C₂ = gewünschte Konzentration in nM = 4 nM

V₂ = gewünschtes Volumen in µl = 20 µl

$$\Rightarrow V_1 = \frac{4 \text{ nM} \times 20 \mu\text{l}}{\text{Anfangskonzentration in nM}}$$

3. Volumen des Buffers in µl

µl des Buffers, der dazu pipettiert wurde = gewünschtes Volumen (20 µl) – V₁

Um einen Pool aus allen DNA-Libraries erstellen zu können, wurden jeweils 20 µl der hergestellten DNA-Library zueinander pipettiert und gemischt. Zur Denaturierung der DNA wurden aus der gesamten Library 5 µl entnommen, mit 5 µl 0,2 N NaOH gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zu der denaturierten DNA wurden 5 µl Tris HCl pH 7 dazugegeben. Um eine 20 pM Library zu erhalten, wurden zu der Verdünnung noch 985 µl HT1 Buffer hinzugegeben. Die Sequenzierkontrolle (PhiX) wurde genauso wie die Library denaturiert und verdünnt, so dass auch hier am Ende eine 20 pM denaturierte PhiX Kontrolle entstand.

Die Library und die PhiX Kontrolle wurden nun auf 1,6 pM verdünnt. Dazu wurden jeweils 104 µl der Library und der PhiX Kontrolle mit jeweils 1196 µl HT1 Buffer gemischt. Zu den insgesamt 1300 µl der 1,6 pM Library wurden 13 µl der 1,6 pM PhiX Kontrolle pipettiert. Die fertige Library wurde nun in die High Output Reagent Cartridge pipettiert. Die Reagent Cartridge wurde vor der Nutzung 1 Stunde in Wasser aufgetaut, während die Flow Cell 30 Minuten lang bei RT gelagert werden musste. Der NextSeq 500 wurde mit der Flow Cell und der Buffer Cartridge beladen. Zuletzt wurde die Reagent Cartridge, die die Library enthielt in das Gerät eingeführt. Der Sequenzierlauf wurde mit folgenden Parametern gestartet (<https://basespace.illumina.com/home/index>):

Plan run:

Instrument: NextSeq

Reagent Barcode: freilassen

Paired End

Read 1 Cycles: 151 2 Cycles: 151

Die Sequenzierung wurde mit Paired-End Sequenzierung durchgeführt, indem beide Enden der DNA-Fragmente vorwärts und rückwärts sequenziert wurden.

2.4.10. Materialien und Kits für den NextSeq 500

Tabelle 8 Kit Bestandteile von Illumina

Kit	Inhalt des Kits	Katalognummer
NextSeq500/550 (Illumina)	High Output Reagent Cartridge v2 300 cycles	15057929
TruSeq DNA Index Kit Plate (Illumina)	96 Indexes (96 samples)	15032317
TruSeq Nano DNA HT Kit (Illumina)	96 Samples (Box 1 of 2)	15041877 (FC-121-4003)
NextSeq Accessory Box V2 (Illumina)		15058261

TruSeq Nano DNA HT Kit (Illumina)	96 Samples SP Beads (Box2 of 2)	15041878
NextSeq 500/550 (Illumina)	Mid Output Flow Cell Cartridge V2	15065974

Tabelle 9 Geräte zur Sequenzierung

Gerätename	Hersteller
Covaris M220	Covaris
NextSeq 500	Illumina
QIAxcel Advanced	QIAGEN
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen
Biometra Trio 48 846-x-070-723	Biometra GmbH
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf

Tabelle 10 Allgemeines Material fürs NGS

Material	Hersteller
Vortexer	Heidolph ReaxTop
Pipetten, diverse Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen, diverse Größen	Nerbeplus Germany

2.5. Auswertung NGS

2.5.1. Qualitätskontrolle

Die Qualität eines jeden sequenzierten Stammes wurde unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien kontrolliert. Um die einzelnen DNA-Sequenzstücke den einzelnen Proben zuordnen zu können, wurde das sogenannte Demultiplexing durchgeführt. Dies erfolgt mittels einer von Illumina zur Verfügung gestellten Software BLC2FASTQ (Illumina, 2019). Alle DNA-Stücke, die zur selben Probe gehörten, wurden anschließend zusammengesetzt. Dieses bioinformatische Verfahren wird als Assembly bezeichnet.

2.5.1.1. Erstellung eines Assembly

Ein Assembly wurde erstellt, indem verschiedene Sequenzabschnitte zu einer möglichst vollständigen Sequenz zusammengesetzt wurden (Miller et al., 2010, Chaisson et al., 2015). Zunächst wurden kurze Sequenzen, auch Reads genannt, miteinander verglichen. Entstanden bei diesem Vergleich Überlappungen, wurden diese zu sogenannten Contigs zusammengesetzt (Dominguez Del Angel et al., 2018). Diese Contigs bilden mit sogenannten Lücken, die mit N bezeichnet werden, ein Gerüst (Scaffolds) (Miller et al., 2010, Chaisson et al., 2015). In der Realität war es nicht möglich, mittels der kurzen Illumina Reads ein komplett geschlossenes Bakteriengenom zu erhalten. Zur Assemblierung der DNA wurde das Softwaresystem Spades verwendet, das besonders geeignet ist, kürzere Sequenzen assemblieren zu können (Bankevich et al., 2012). Das Assembly wurde auf dem Metagenom Server im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene erstellt, wobei das Software System Spades (Version 3.9.0) (Antipov et al., 2016) verwendet wurde. Das zusammengesetzte Genom lag anschließend als FASTA file vor.

2.5.1.2. N50 Wert

Zur Qualitätskontrolle diente der N50 Wert. Um den N50 Wert berechnen zu können, wurde die Länge der Contigs benötigt. Der N50 Wert ist die Länge des kürzesten Contig, bei dem 50 % des gesamten Genoms des Assembly abgedeckt sind (Miller et al., 2010). Der N50 Wert ist ein Maß für die Kontiguität: Je höher der Wert ist, desto niedriger der Fragmentierungsgrad der Sequenzen (Dominguez Del Angel et al., 2018).

2.5.1.3. GC Gehalt

Zusätzlich zum N50 Wert wurde auch der GC Gehalt (Guanin/Cytosin) des assemblierten Bakteriengenoms bestimmt. Der GC Gehalt ist für jede Bakterienspezies relativ spezifisch. Größere Abweichungen des GC Gehaltes zwischen den verschiedenen *P. aeruginosa* Isolaten könnte daher auf eine Kontamination des sequenzierten Isolats hinweisen. Der GC Gehalt wurde mittels eines in-house Scriptes auf dem Metagenom Cluster berechnet. Bei *P. aeruginosa* liegt der GC Gehalt bei ungefähr 66 %, wobei Schwankungen zwischen 65 % und 67 % akzeptiert werden können (Labaer et al., 2004).

2.5.2. Erstellung einer Phylogenie

Basierend auf einem Core Genome wurden die Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) der einzelnen Stämme bestimmt und anschließend untereinander verglichen, um die genetische Verwandtschaft der Stämme zu bestimmen. Hierfür wurde zuerst ein Core Genome von allen in der Studie eingeschlossenen Stämmen berechnet. Im Anschluss daran wurden die qualitätskontrollierten einzelnen Reads gegen das Core Genome gemappt und die SNPs bestimmt. Hieraus entstand eine SNP Matrix. Basierend auf dieser SNP Matrix wurde eine Phylogenie der Stämme durch hierarchisches Clustern erstellt.

2.5.2.1. Berechnung eines Core Genome

Um das Core Genome aller Isolate und Cluster zu erstellen, wurde das Programm Spine (Version 0.1.2) mit den Standard Einstellungen verwendet (Ozer et al., 2014, Liese et al., 2019). Die Länge der Linary Collonary Blocks wurde auf 500 bp mit einer Übereinstimmung von 85 % und einem Vorkommen bei allen Stämmen (100 %) festgelegt.

2.5.2.2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Hochqualitative Sequenzreads wurden mittels Trimmomatic erstellt (Bolger et al., 2014). Diese Reads wurden in der Software von BioNumerics (Version 7.6) gegen das Core Genome gemappt und eine SNP-Matrix erstellt. Anschließend wurde mit den Standardeinstellungen ein hierarchisches Clustering durchgeführt, wobei der UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) Algorithmus verwendet wurde. Die hieraus generierten phylogenetischen Stammbäume wurden ebenfalls mit der BioNumerics Software visualisiert (Liese et al., 2019).

2.5.3. Identifizierung von Resistenzgenen in den Patientenproben

Mittels ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (zuletzt geöffnet 18.02.2020) wurden Resistenzgene, die sich gegen verschiedene Antibiotikaklassen richten, identifiziert. ResFinder ist ein webbasiertes System, das die Software BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) nutzt (Camacho et al., 2009, Kleinheinz et al., 2014). Um die Resistenzgene in einem Genom identifizieren zu können, wurden die

assemblierten FASTA files des jeweiligen Genoms hochgeladen. Das System basiert auf der Suche nach Sequenzähnlichkeiten zwischen den hochgeladenen Sequenzen und den Sequenzen der Resistenzgene, die in der Datenbank hinterlegt waren (Camacho et al., 2009). ResFinder deckte insgesamt 15 Antibiotikaklassen ab: Aminoglykoside, β -Laktam, Colistin, Flurochinolone, Fosfomycin, Glykopeptide, Makrolide-Lincosamide-Streptogramin B, Nitroimidazole, Oxazolidinome, Phenicol, Rifampicin, Sulphonamide, Tetracycline und Trimethoprim (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (zuletzt geöffnet 18.02.2020). Zusätzlich zum gefundenen Resistenzgen wurde die Höhe der Übereinstimmung (Identity %) sowie die Abdeckung des Resistenzgens angegeben (Zankari et al., 2012). Der Schwellenwert (ID %) zum Nachweis der Gene lag bei 90 %. Die Mindestlänge des Resistenzgens, die abgedeckt sein musste, betrug 60 %.

3. Ergebnisse

3.1. Herkunft der in die Studie eingeschlossenen Isolate

Um die Fragestellung zu untersuchen, inwieweit es bei einem Krankenhausaufenthalt zu einer Kolonisierung von Patienten mit *P. aeruginosa* aus der Umwelt gekommen ist, wurden Patienten identifiziert, die ein initial negatives Screeningergebnis auf *P. aeruginosa* hatten und bei denen im Verlauf ihres Aufenthaltes ein *P. aeruginosa* Stamm nachweisbar war. Nachdem die Patienten identifiziert waren, wurden die zugehörigen *P. aeruginosa* Isolate aufgetaut und die Identifizierung als *P. aeruginosa* mittels MALDI-TOF erneut bestätigt.

Insgesamt konnten im Zeitraum vom 15. Januar 2015 bis 30. November 2015 52 Patienten identifiziert werden, deren *P. aeruginosa* Isolate für weitere Analysen zur Verfügung standen. Diese Patientenproben stammen von 3 unterschiedlichen Stationen aus dem Department für Innere Medizin des Universitätsklinikums Tübingen, wobei 24 Proben von Station 1, 18 Proben von Station 2, 4 Proben von Station 3 und 6 Isolate von Abstrichen stammen, die aus der zugehörigen Ambulanz gewonnen wurden.

Um zu überprüfen, ob die Kolonisierung der Patienten durch einen *P. aeruginosa* Stamm aus der Patientenumgebung resultierte, wurde die Belegungs- und Verlegungshistorie vor dem positiven Nachweis der Patienten erhoben. Hierfür wurden alle Zimmer in Betracht gezogen, in denen sich der Patient in den 30 Tagen vor seinem positiven Nachweis aufhielt. In diesen Zimmern wurden dann alle positiven Umweltnachweise aus den letzten 90 Tagen mit einbezogen. Bei insgesamt 10 Patienten konnte kein Umweltisolat zugeordnet werden. Ein Umweltisolat wurde bei 9 Patienten, 2 Umweltisolate wurden bei 5 Patienten, 4 Umweltisolate bei 3 Patienten, 5 Umweltisolate bei 6 Patienten, 6 Umweltisolate bei einem Patienten, 7, 8 und 9 Umweltisolate bei jeweils 2 Patienten, 10 Umweltisolate bei einem Patienten, 12 Umweltisolate bei 2 Patienten und 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 30 und 36 Umweltisolate jeweils bei einem Patienten identifiziert.

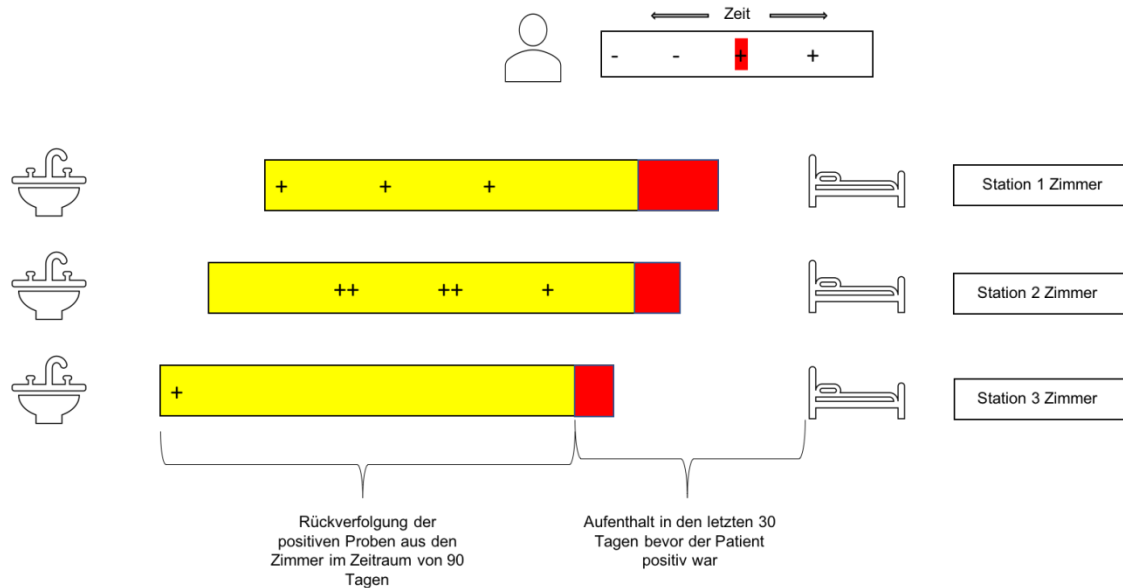


Abbildung 3 Erklärung zum Einschluss der Umweltisolate

Legende: Der Patient wurde zu Beginn seines Krankenhausaufenthaltes negativ auf *P. aeruginosa* getestet (Minuszeichen bei dem Patienten). Während des stationären Aufenthaltes wurde der Patient positiv getestet (rotes Pluszeichen beim Patienten). Es wurden daraufhin alle Zimmer (dargestellt mit einem Bett) miteingeschlossen, in denen sich der Patient in den letzten 30 Tagen vor seinem positiven Ergebnis aufgehalten hat (roter Balken). Es wurden alle positiven *P. aeruginosa* Isolate aus der Umwelt aus den letzten 90 Tagen aus denselben Zimmern in die Studie miteingeschlossen (gelber Balken). Bett: Darstellung für Zimmer, Waschbecken: Nachweis für Umweltstämme.

Die Umweltisolate wurden aufgetaut und die Identifizierung von *P. aeruginosa* erneut überprüft. Hiernach standen insgesamt 239 Umweltisolate zur Verfügung, die im Zeitraum vom 28. Oktober 2014 bis 30. November 2015 aus Duschen, Waschbecken und Toiletten entnommen worden waren.

Die nachfolgende Tabelle 11 stellt die Lokalisation der Umweltproben und die gewonnene Anzahl an Umweltproben dar.

Tabelle 11 Lokalisation der Umweltproben und die dazugehörige Anzahl der Umweltproben

Lokalisation der Umweltproben	Anzahl der Umweltproben
Waschbecken	137
Duschen	93
Toiletten	9

3.2. Qualitätsmerkmale der erstellten bakteriellen Genomsequenzen

Im nächsten Schritt wurde bei den 52 Patientenisolaten und den 239 Umweltisolaten eine komplette Genomsequenzierung (Whole-genome sequencing) durchgeführt. Nach dem Sequenzieren wurden die erhaltenen Sequenzstücke (Reads) der einzelnen Stämme wieder zusammengefügt, es wurde ein sogenanntes Assembly durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle der Sequenzierung wurden der N50 Wert der Genomsequenzen der Patienten- und Umweltstämme bestimmt.

Der N50 Wert gibt den Fragmentierungsgrad an und ist ein Maß für die Kontiguität, so dass er als Parameter herangezogen werden kann, um zu bestimmen, wie gut die Sequenzierung und das Assembly funktioniert haben. Bei den Patientenproben lag der N50 Wert im Durchschnitt bei 338.108 Basenpaaren (Anhang Tabelle 2) und bei den Umweltisolaten im Durchschnitt bei 330.236 Basenpaaren (Anhang Tabelle 3).

Der GC Gehalt spiegelt den Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der DNA-Basen wider. Die verschiedenen Bakterienspezies unterscheiden sich häufig im GC Gehalt. Der GC Gehalt lag bei den Patienten- und Umweltproben bei 66 % (Anhang Tabelle 2 und Anhang Tabelle 3).

Der GC Gehalt mit 66 % spiegelt damit den zu erwartenden Wert von *P. aeruginosa* Stämmen wider.

Insgesamt kann aufgrund der erhobenen Werte von einer hohen Qualität der generierten Genomsequenzen ausgegangen werden.

3.3. Übersicht der Antibiotikaresistenzen der klinischen *P. aeruginosa* Isolate

Von den 52 klinischen *P. aeruginosa* Isolaten wurde das im Rahmen der Routinediagnostik erstellte Antibiogramm erfasst. Die Ergebnisse wurden aus dem Laborsystem extrahiert und sind zusammenfassend in Abbildung 4 dargestellt. Die Einteilung erfolgte in „S“ (sensibel), „I“ (intermediär) und „R“ (resistent) anhand der klinischen Breakpoints der zum Nachweiszeitpunkt gültigen EUCAST Version. Die detaillierten Antibiotigramme der einzelnen Stämme sind im Anhang Tabelle 1 aufgeführt.

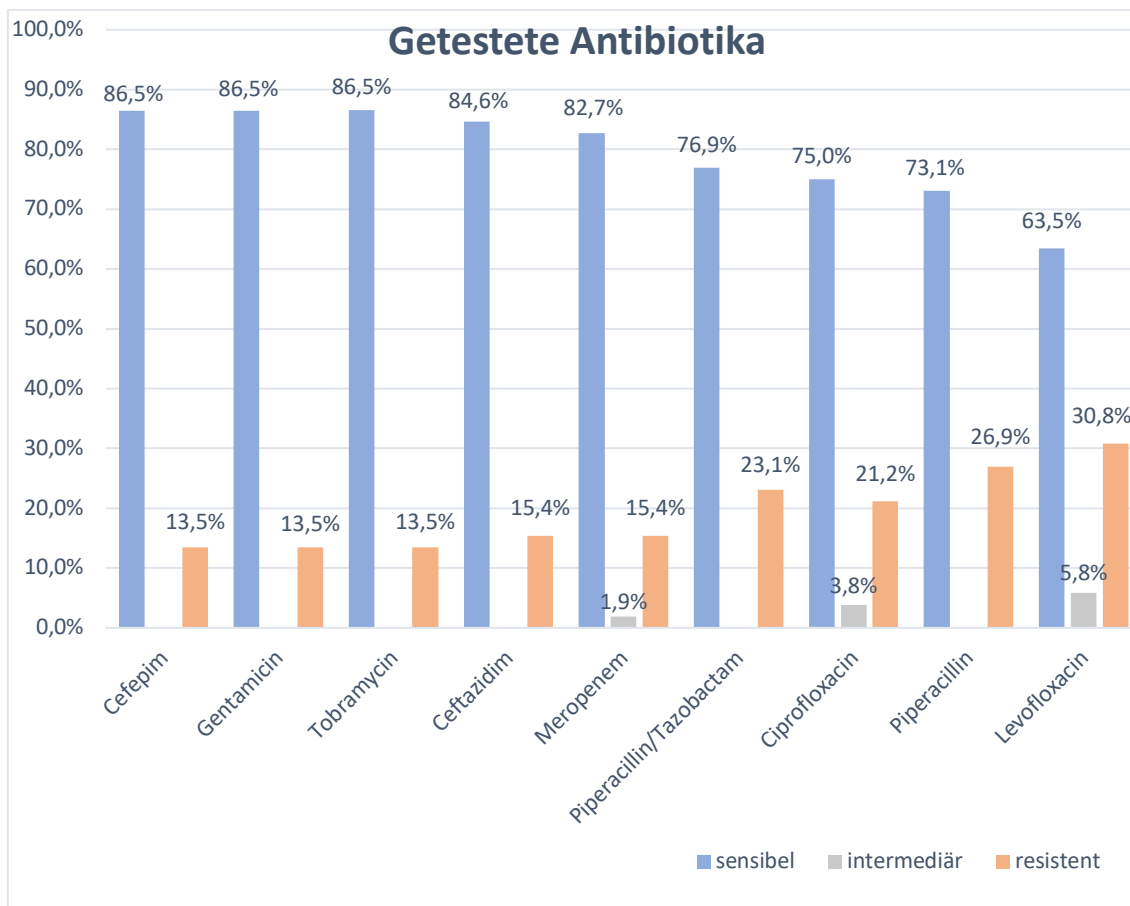


Abbildung 4 Übersicht der Antibiotikaresistenzen der klinischen *P. aeruginosa* Isolate

Legende: X-Achse: Antibiotika, Y-Achse: Anzahl der vorhandenen Resistenzen gegenüber der getesteten Antibiotika in Prozent %

Die höchste Resistenzrate wies Levofloxacin mit 30,8 % auf, gefolgt von Piperacillin und Piperacillin-Tazobactam mit 26,9 % bzw. 23,1 % und Ciprofloxacin mit 21,2 %. Die übrigen Antibiotika sind in über 80 % der Stämme sensibel getestet worden.

Während es sich hierbei um eine Darstellung der Testergebnisse für die einzelnen Antibiotika handelt, wurde im Weiteren untersucht, bei welchen Stämmen eine Resistenz gegenüber mehreren Antibiotikagruppen festgestellt werden konnte. Nach den Empfehlungen des Robert Koch-Instituts werden in Deutschland die multiresistenten Bakterien nach dem Vorliegen von Resistenzen bestimmter Leitantibiotika in Gruppen eingeteilt. So bedeutet 3 MRGN Resistent gegenüber 3 Antibiotikagruppen und 4 MRGN Resistent gegenüber 4 definierten Leitantibiotika verschiedener Antibiotikagruppen (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2012). Bei der Einteilung multiresistenter Gram

negativer Erreger (MRGN) wurden Bakterien bis Ende 2018, die gegenüber eines Antibiotikums als „intermediär“ eingestuft, der Kategorie „resistent“ zugeordnet (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2012). Diese Einteilung wurde bei der Zuordnung der Studienisolate angewandt.

Bei knapp 15 % (8 von 52) der Proben fanden sich multiple Resistenzen gegenüber den im Labor getesteten Antibiotika. In der Tabelle 12 sind diese nochmals gesondert dargestellt. Um die Empfindlichkeit gegenüber weiteren Substanzen zu bestimmen, wurden sie im weiteren Verlauf noch auf Amikacin (Aminoglykosid Antibiotikum) und Colistin getestet. Ein Stamm wurde als 3 MRGN klassifiziert, bei 7 der getesteten Bakterienstämme handelt es sich um 4 MRGN Stämme (Tabelle 12). Sie sind nicht nur gegen Piperacillin (β -Laktam Antibiotikum), Cephalosporine der 3. Generation wie Ceftazidim oder Cefepim und Ciprofloxacin, sondern auch gegen Meropenem (Carbapenem) resistent. Colistin ist das einzige Antibiotikum, bei dem alle untersuchten klinischen *P. aeruginosa* Isolate im Antibiogramm sensibel sind.

Tabelle 12 Patientenproben, die multiresistent gegenüber Antibiotika sind

Legende: CAZ: Ceftazidim, FEP: Cefepim, CIP: Ciprofloxacin, LVX: Levofloxacin, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, MEM: Meropenem, PIP: Piperacillin, PTZ: Piperacillin/Tazobactam, AMI: Amikacin, CO: Colistin, MRGN: Multiresistente Gram negative Bakterien, R: Resistent, S: Sensibel, I: Intermediäre Stämme werden so behandelt, als wenn der Stamm resistent wäre.
Grün markiert: Antibiotika, die zur Einteilung von multiresistenten Gram negativen Bakterien dienen.
Gelb markiert: Sind die Antibiotika, die zusätzlich getestet wurden

Stamm- Nummer	CAZ	FEP	CIP	LVX	GEN	TOB	MEM	PIP	PTZ	AMI	CO	MRGN	Carbapenemase- bildner
25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	
31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	ja
35	R	S	I	R	S	S	S	R	R	S	S	3 MRGN	
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	ja
41	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	
42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	ja
49	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	ja
50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	4 MRGN	ja

3.4. Nachweis von Resistenzgenen verschiedener Antibiotikaklassen bei den klinischen *P. aeruginosa* Isolaten

Während es sich bei dem Antibiogramm um ein phänotypisches Testverfahren handelt, können in den Genomsequenzen Resistenzgene untersucht werden. Mithilfe der webbasierten Software ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (zuletzt geöffnet 25.05.2020) sind die *P. aeruginosa* Stämme der Patientenproben auf Resistenzgene, die sich gegen verschiedene Antibiotikaklassen richten, analysiert worden. In der Resfinder Datenbank sind nur Gene hinterlegt, die für Enzyme kodieren, die zu einer Resistenz gegenüber einem Antibiotikum oder einer Antibiotikaklasse führen. Mutationsvermittelte Resistenzen oder andere resistenzvermittelnde Mechanismen wie beispielsweise Efflux-Pumpen werden nicht erfasst.

In der folgendenen Abbildung 5 sind alle Resistenzgene, die bei den Patientenisolaten identifiziert wurden, aufgelistet. In der Anhang Tabelle 5 sind die Patientenstämme und die dazu gehörigen Resistenzgene detailliert aufgelistet.

Abbildung 5 stellt die Häufigkeiten der verschiedenen Resistenzgene dar. Für die meisten Antibiotikagruppen gibt es mehrere Resistenzgene, die bei den untersuchten Stämmen unterschiedlich häufig vorkamen.

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, wurden bei allen der 52 Patientenproben die Resistenzgene *aph(3')-IIb* (Aminoglykosid-Resistenzgen), *bla_{PAO}*, *bla_{OXA-50}* (β -Laktam-Antibiotika Resistenzgen) und *fosA* (Fosfomycin-Resistenzgen) nachgewiesen. Das Resistenzgen *catB7*, das sich gegen das Antibiotikum Phenicol richtet, wurde bei 50 *P. aeruginosa* Stämmen ermittelt.

Bei den *P. aeruginosa* Isolaten der Patienten 31, 39, 42, 49 und 50, die bereits in der phänotypischen Resistenztestung (Tabelle 12) als multiresistente Gram negative Bakterien beschrieben wurden, sind die vorhandenen Resistenzgene in Tabelle 13 dargestellt. Diese Bakterienstämme enthalten zusätzliche Resistenzgene gegen Aminoglykoside, β -Laktam Antibiotika, Fosfomycin, Phenicol, Sulphonamide, Flurochinolone, Trimethoprim und Tetracycline.

Bei 4 multiresistenten Stämmen wurde das Gen *bla_{VIM-2}* gefunden. Dieses Gen kodiert für eine Carbapenemase, die zu den Metallo- β -Laktamasen gezählt wird. MBLs zeichnen

sich dadurch aus, dass sie zu einer Unwirksamkeit aller β -Laktam Antibiotika (mit Ausnahme von Aztreonam) führen, einschließlich der Carbapeneme wie Meropenem. Da Carbapeneme als Reserveantibiotika eine wichtige Therapiemöglichkeit bei Gram negativen Infektionen bilden, sind diese Carbapenemase-bildenden Isolate sowohl aus therapeutischer als auch aus krankenhaushygienischer Sicht eine Herausforderung. Bei einem weiteren Patientenisolat (Nr. 31) wurde ein weiteres Gen *bla_{IMP-8}* nachgewiesen, das auch für eine MBL kodiert. Diese Patientenisolate sind in der obigen Tabelle 12 sowie in der Tabelle 13 separat markiert. Bei allen 5 Isolaten, die ein Carbapenemase Gen enthielten, handelte es sich um 4 MRGN Stämme. Insgesamt fand sich bei 7,7 % (n=5) in dieser Studie eingeschlossenen klinischen *P. aeruginosa* Isolaten ein Carbapenemase Gen.

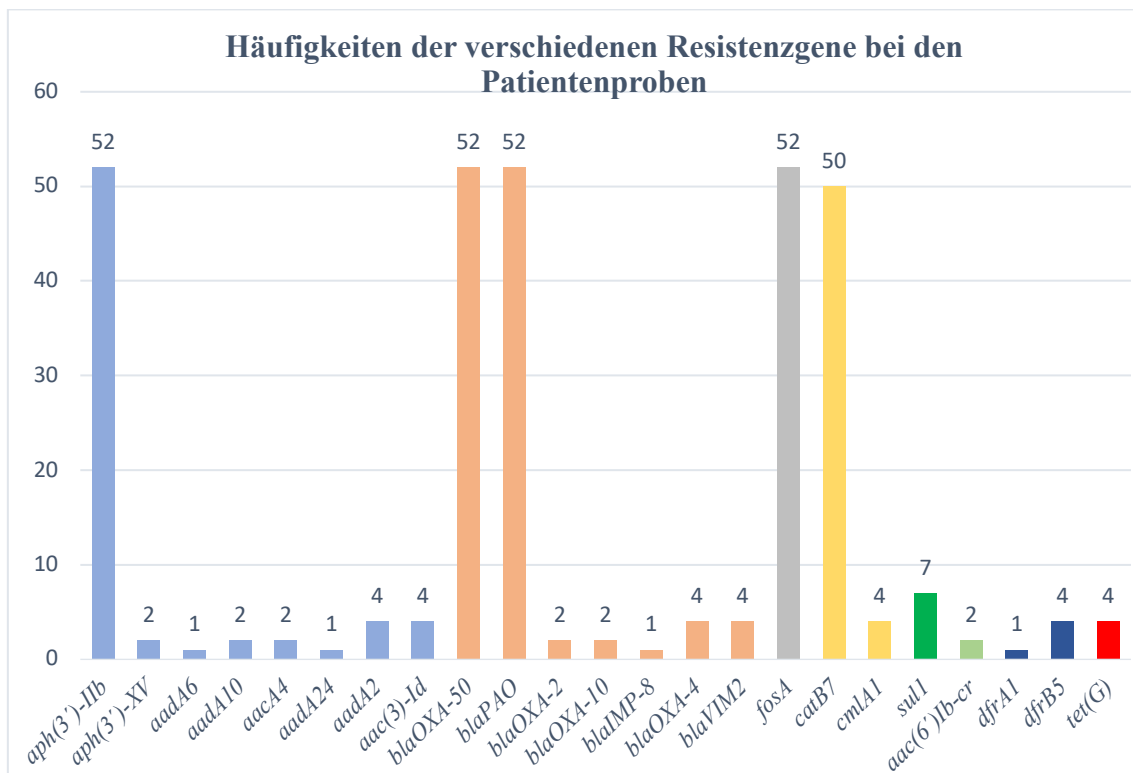


Abbildung 5 Häufigkeiten der verschiedenen Resistenzgene bei den Patientenproben

Legende: Hellblau: Aminoglykosid Antibiotika Resistenzgene, Orange: β -Laktam Antibiotika Resistenzgene, Grau: Fosfomycin Resistenzgen, Gelb: Phenicol Resistenzgene, Dunkelgrün: Sulphonamid Resistenzgen, Hellgrün: Flurochinolon Resistenzgen, Dunkelblau: Trimethoprim Resistenzgene Rot: Tetracyclin Resistenzgen

Tabelle 13 Patientenproben, die das Carbapenemase Gen enthalten

Legende: Carbapenemase Gen: grün markiert

Patientennummer	Aminoglykosid	β-Laktam	Fosfomycin	Phenicol	Sulphonamid	Flurochinolon	Trimethoprim	Tetracyclin
31	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{IMP-8}</i>	<i>fosA</i>		<i>sul1</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>		
	<i>aph(3')-XV</i>	<i>bla_{OXA-2}</i>						
	<i>aacA4</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>						
	<i>aadA10</i>	<i>bla_{PAO}</i>						
39	<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrB5</i>	
	<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>		<i>catB7</i>				
	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>						
		<i>bla_{PAO}</i>						
42	<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrB5</i>	
	<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
		<i>bla_{VIM-2}</i>						
49	<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrB5</i>	
	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
	<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
		<i>bla_{VIM-2}</i>						
50	<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
	<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
		<i>bla_{VIM-2}</i>						

3.5. Anteil der Resistenzen verschiedener Antibiotikaklassen bei den P. aeruginosa Isolaten aus der Umwelt

Nicht nur bei den Patientenisolaten wurden die Resistenzgene mithilfe der Software ResFinder ermittelt, sondern auch bei allen 239 Umweltisolaten. Da diese Isolate in der Routinediagnostik kein Antibiogramm erhalten haben, lagen für diese Isolate keine Information zur phänotypischen Resistenz vor.

Die nachfolgende Abbildung 6 visualisiert die Häufigkeiten der Resistenzgene. Bei sämtlichen Umweltproben wurden die Resistenzgene *aph(3')IIb*, *bla_{OXA-50}*, *bla_{PAO}* und *fosA* identifiziert und bei 235 Umweltisolaten das Resistenzgen *catB7*.

Vergleicht man die Häufigkeiten der Resistenzgene der Umweltproben mit denen der Patientenproben aus Abbildung 5, so stellt man fest, dass es sich größtenteils um dieselben Gene handelt. Allerdings weisen die Umweltproben weniger Resistenzgene gegenüber der Klasse der Aminoglykoside und der β -Laktam Antibiotika auf. Insgesamt konnte bei ca. 6 % (15 von 239) der Umweltproben die *bla_{VIM-2}* Carbapenemase identifiziert werden (Tabelle 14), während keines der Umweltisolate ein *bla_{IMP-8}* Carbapenemase Gen enthielt.

In Anhang Tabelle 6 sind alle Umweltproben mit den dazugehörigen nachgewiesenen Resistenzgenen abgebildet.

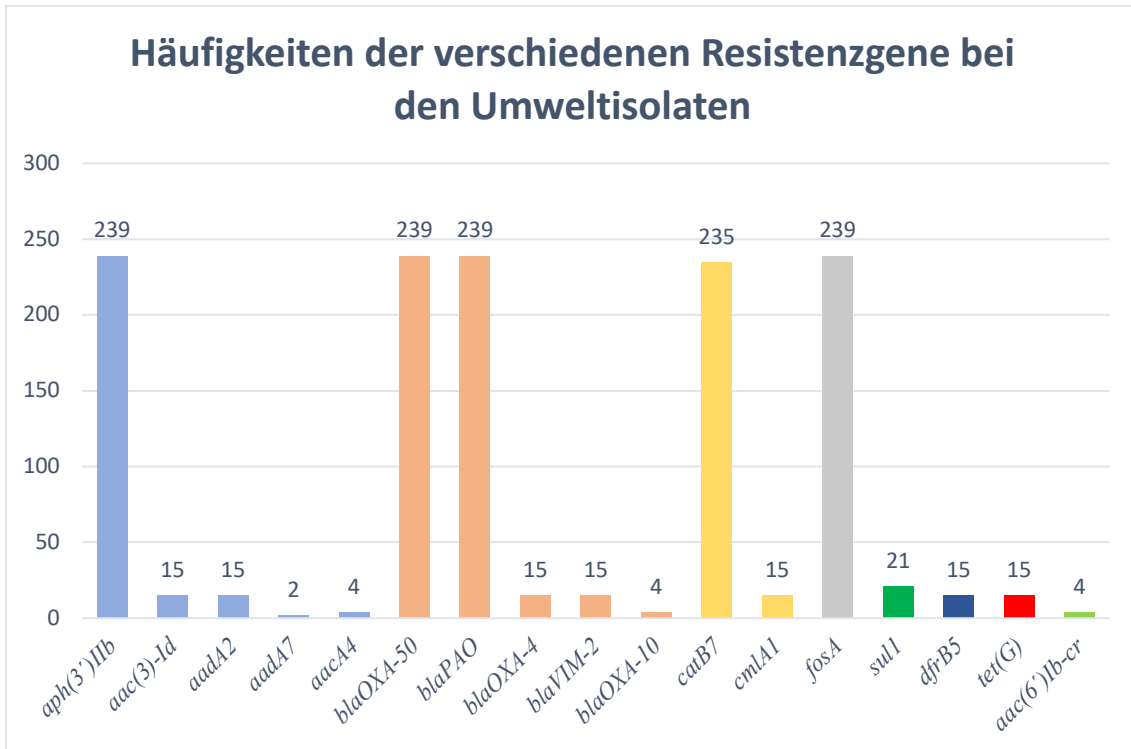


Abbildung 6 Häufigkeiten der verschiedenen Resistenzgene bei den Umweltproben

Legende: Hellblau: Aminoglykosid Antibiotika Resistenzgene, Orange: β -Laktam Antibiotika Resistenzgene, Grau: Fosfomycin Resistenzgen, Gelb: Phenicol Resistenzgene, Dunkelgrün: Sulphonamid Resistenzgen, Hellgrün: Flurochinolon Resistenzgen, Dunkelblau: Trimethoprim Resistenzgen, Rot: Tetracyclin Resistenzgen

Tabelle 14 Umweltstämme, die das Carbapenemase Gen enthalten

Legende: Carbapenemase Gen: grün markiert

Umweltstämme	Aminoglykosid	β-Laktam	Phenicol	Fosfo- mycin	Sulphona- mid	Trimetho- prim	Tetra- cyclin
UU2322ax_42_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1945_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1901_42_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2160x_42_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2158_42_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2-like}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1839_43_38	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1790_47	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2053_43_38_48_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2494_55_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2492_49_50	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2002_42_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1276_20_25	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2388_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU2357_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
UU1671_27	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like} , <i>bla</i> _{VIM-2}	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>

3.6. Auswertung des phylogenetischen Stammbaums von Patientenproben und Umweltproben

Um zu untersuchen, ob eine Übertragung von *P. aeruginosa* Stämmen aus der Umwelt auf den Patienten stattgefunden hat, wurde die genetische Verwandtschaft der Stämme untereinander bestimmt. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, wobei in dieser Studie die bereits etablierten Vorgehensweisen angewendet wurden. Basierend auf einem allen Stämmen gemeinsamen sogenannten Core Genome, werden die Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) der einzelnen Stämme bestimmt und die SNPs der Stämme untereinander verglichen.

Hierfür wurden die Kompletengenom Sequenzen der einzelnen Stämme assembliert und ein bei allen Stämmen gemeinsames Core Genome mit dem Programm Spine (Details siehe Material und Methoden) erstellt. Das Core Genome der 291 Stämme umfasste 4976502 Basenpaare. Im nächsten Schritt wurde in BioNumerics (Details Material und Methoden) eine SNP Matrix erstellt und anschließend die Verwandtschaft der Stämme untereinander mittels hierarchischem Clustering durch Anwendung des UPGMA Algorithmus bestimmt.

Um basierend auf den Genomen die Stämme in Cluster einteilen zu können, musste ein cut-off der Anzahl an SNPs festgelegt werden, den die Stämme untereinander noch haben dürfen, um einem Cluster zugehörig zu sein. Hierfür wurde eine Übersicht der SNP Distanzen aller in der Studie eingeschlossenen Stämme erstellt (Abbildung 7). Hierbei wurde jeder Stamm mit jedem Stamm verglichen und ihre SNP Distanz ermittelt. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass es eine zweigipfelige Verteilung dieser Distanz gibt. Ein Teil der Stämme weist untereinander eine relativ niedrige Anzahl von SNPs auf (<500), wobei der andere Teil der Stämme untereinander eine hohe Distanz mit mehr als 10 000 SNP aufweist. Daher wurde in dieser Arbeit unter Anwendung dieses cut-offs (Distanz von 500 SNPs) alle Stämme in Cluster oder Singletons eingeteilt.

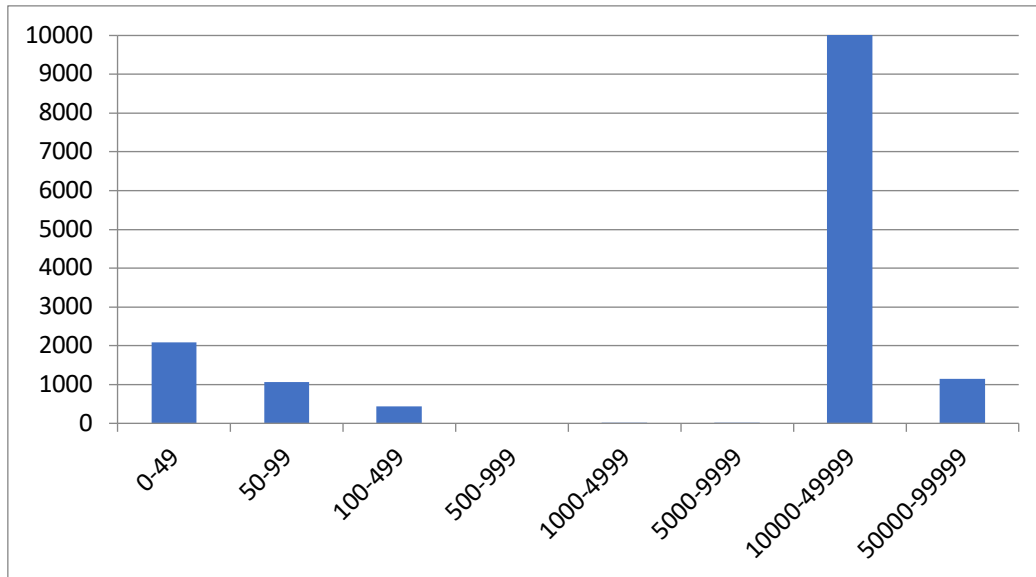


Abbildung 7 SNP Distanzen zwischen den Stämmen

Legende: Jeder Stamm wurde mit jedem Stamm verglichen und die SNP Distanz zueinander bestimmt. Die Anzahl der SNPs sind auf der x-Achse dargestellt, wobei die Anzahl des Vorkommens bei dem Vergleich der Stämme auf der y-Achse dargestellt ist.

Das heißt, alle Proben, die maximal 500 SNPs voneinander entfernt sind, bilden ein Cluster und weisen bis maximal 500 SNPs zueinander auf. Ein Cluster besteht aus mindestens 2 Isolaten. Aufgrund der oben gewählten Einteilung sind einige Proben nicht einem Cluster zuzuordnen. Sie werden daher als Singletons bezeichnet.

Die Abbildung 8 zeigt die Phylogenie der 52 Patienten- und 239 Umweltisolate. Insgesamt lassen sich die Stämme in 27 Cluster und 24 Singletons einteilen. Alle Cluster mit mehr als 5 Isolaten sind farbig hervorgehoben. Das größte Cluster 12 besteht aus 52 Umwelt- und Patientenproben, gefolgt von den Clustern 8 (n=44), 18 (n=41), 16 (n=19), 15 (n=16), 1 (n=10), 5 (n=8), 3 (n=8), 20 (n=7), 21 (n=6), 19 (n=6) und 25 (n=5).

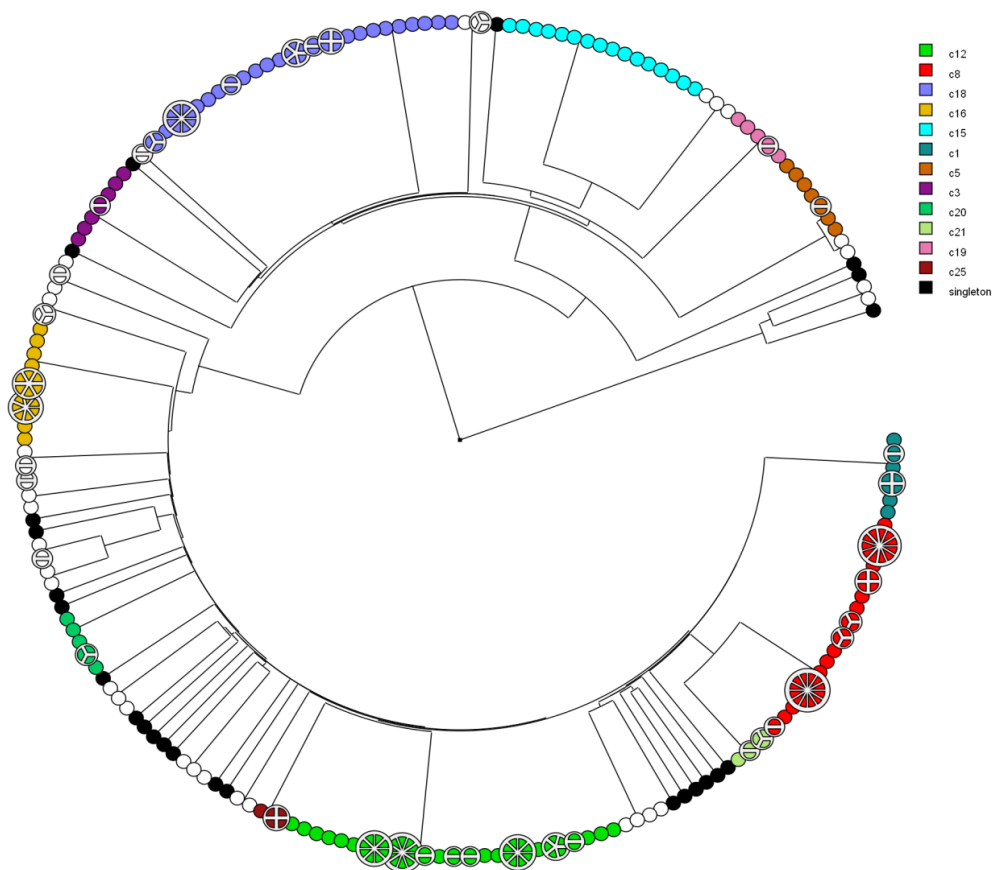


Abbildung 8 Phylogenetischer Stammbaum eingeteilt nach Clustern und Singletons

Legende: Bunt: Cluster mit >5 Isolaten, Schwarz: Singletons, Weiß: Cluster mit <5 Isolaten

In Abbildung 9 sind die Isolate von Patienten in Rot und die Umweltisolate in Grün dargestellt. Insgesamt 11 der Cluster bestehen nur aus Umweltproben, wohingegen 4 Cluster ausschließlich Patientenisolate enthalten. Die übrigen 12 Cluster setzen sich aus Patientenproben und Umweltstämmen zusammen.

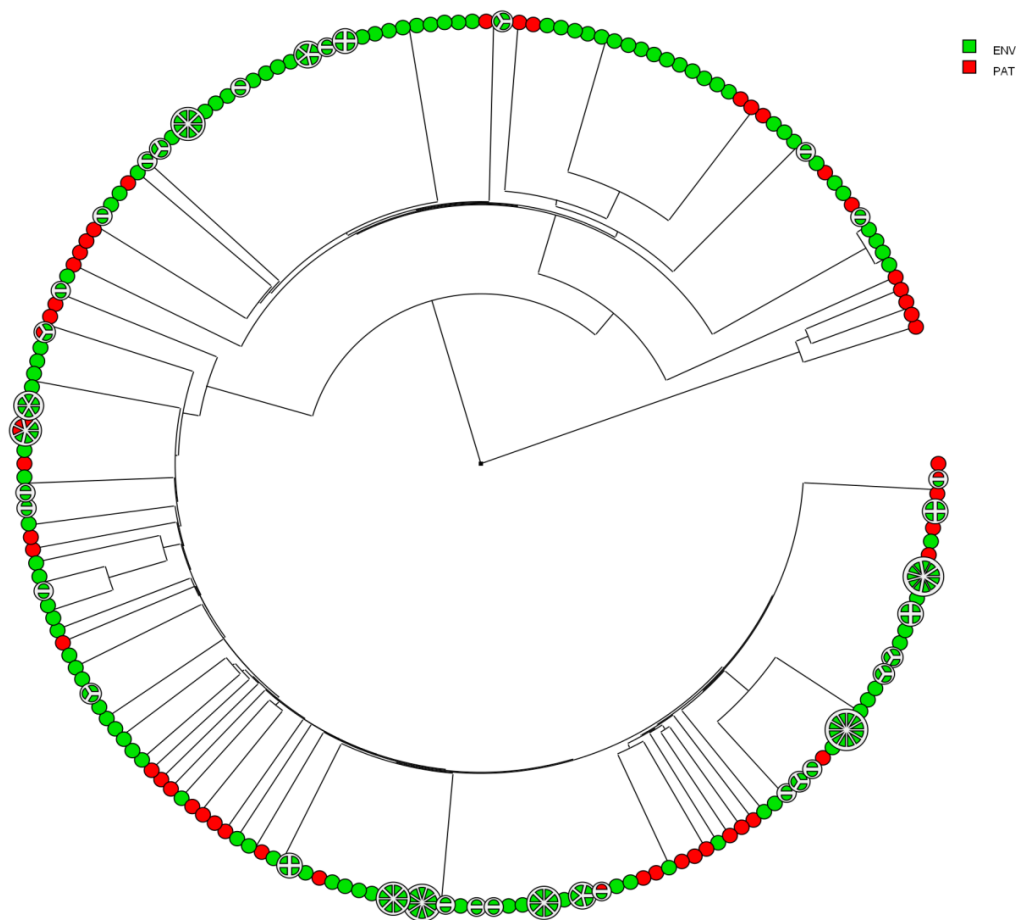


Abbildung 9 Phylogenetischer Stammbaum mit Patienten- und Umweltisolaten

Legende: Rot: Patientenisolat, Grün: Umweltisolate

3.7. Detaillierte phylogenetische Analyse der Patientenisolat

Betrachtet man ausschließlich die Phylogenie der Patientenisolat in Abbildung 10, so zeigt sich eine heterogene Verteilung der Cluster und keine Dominanz eines bestimmten Clusters. Die häufigsten Cluster bei Patienten sind Cluster 3 (n=4), gefolgt von Cluster 1 (n=4), 16 (n=4) und 12 (n=3). Zusätzlich finden sich bei den Patientenisolaten 15 (28,8 %) Singletons, das heißt, weder ein verwandtes Patientenisolat noch ein verwandtes Umweltisolat wurden in der Studie gefunden.

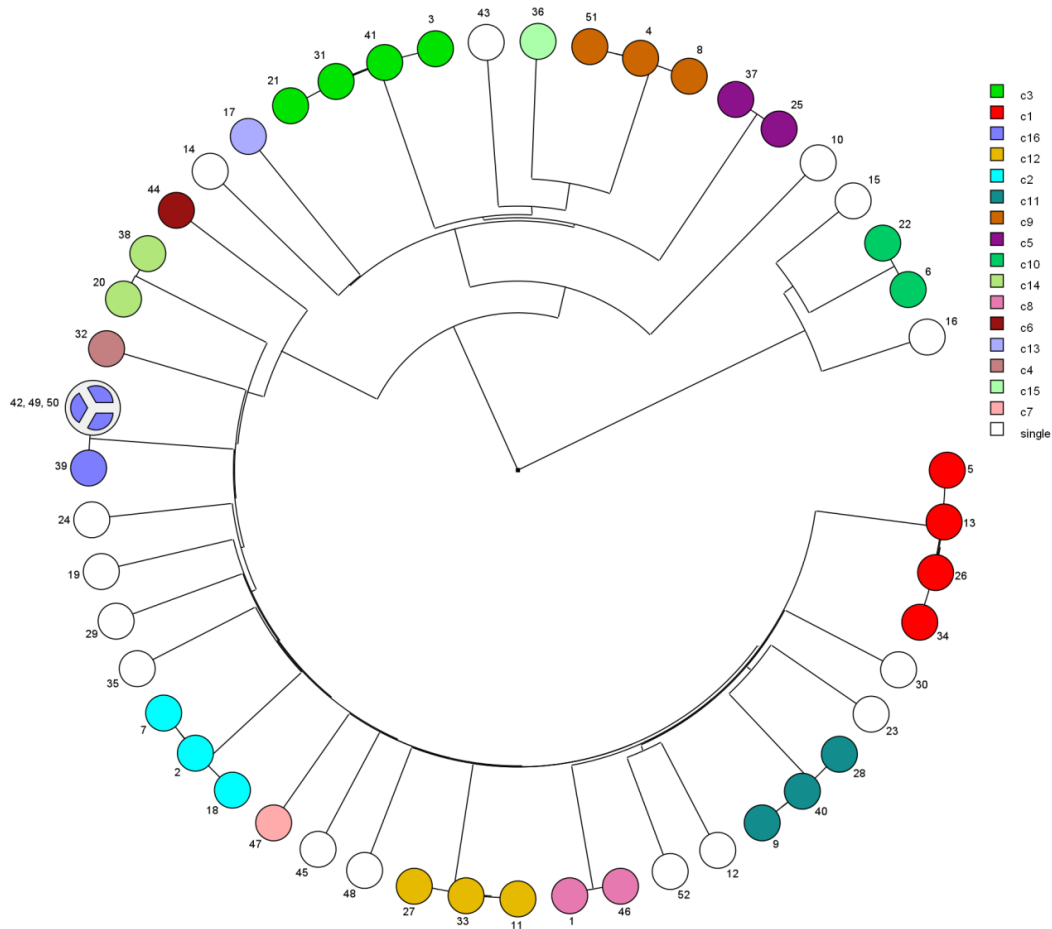


Abbildung 10 Phylogenetischer Stammbaum mit den 52 *P. aeruginosa* Stämmen aus dem Patientenmaterial

3.8. Detaillierte phylogenetische Analyse der Umweltisolate

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn die Umweltisolate allein betrachtet werden, wie in Abbildung 11 dargestellt. Es gibt verschiedene Cluster, die vorkommen, ohne dass es zur Dominanz eines bestimmten Clusters kommt. Bei den Umweltisolaten sind dem Cluster 12 die meisten Stämme (n=48) zugeordnet. Ebenfalls viele Isolate umfassen die Cluster 8 (n=42), 18 (n=41), 15 (n=15) und 16 (n=15). Bei insgesamt 9 Umweltisolaten gab es weder ein verwandtes Umweltisolat noch ein verwandtes Patientenisolat, sie wurden daher als Singletons klassifiziert.

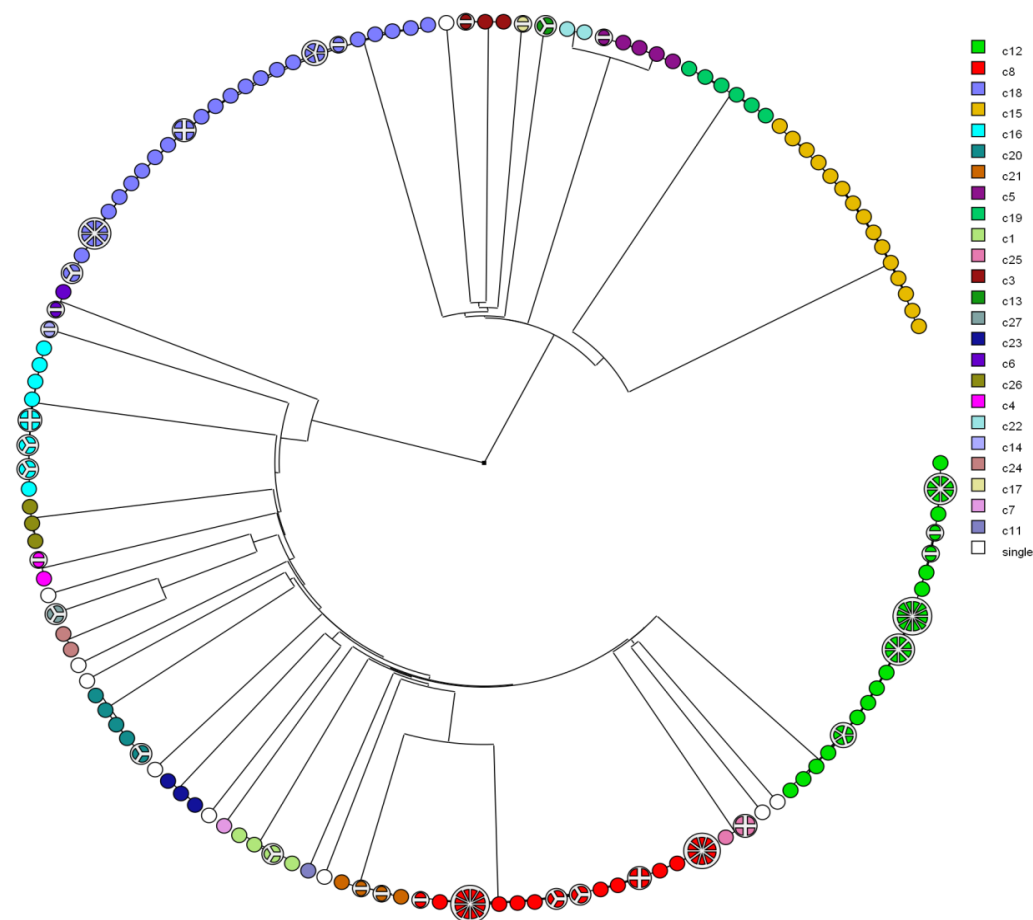


Abbildung 11 Phylogenetischer Stammbaum mit den 239 *P. aeruginosa* Isolat aus der Umwelt

In Abbildung 12 ist die Verteilung der verschiedenen Umweltcluster nach Stationen dargestellt. Die 5 häufigsten Cluster sind hierbei in der Abbildung 12 gekennzeichnet. Von der Station 1 wurden 37 Umweltisolate, von der Station 2 187 Umweltisolate und von der Station 3 15 Umweltisolate isoliert. Hierbei fällt auf, dass es häufig Cluster gibt, die nur auf einer Station anzutreffen sind, beispielsweise besteht Cluster 15 ausschließlich aus Proben von Station 2.

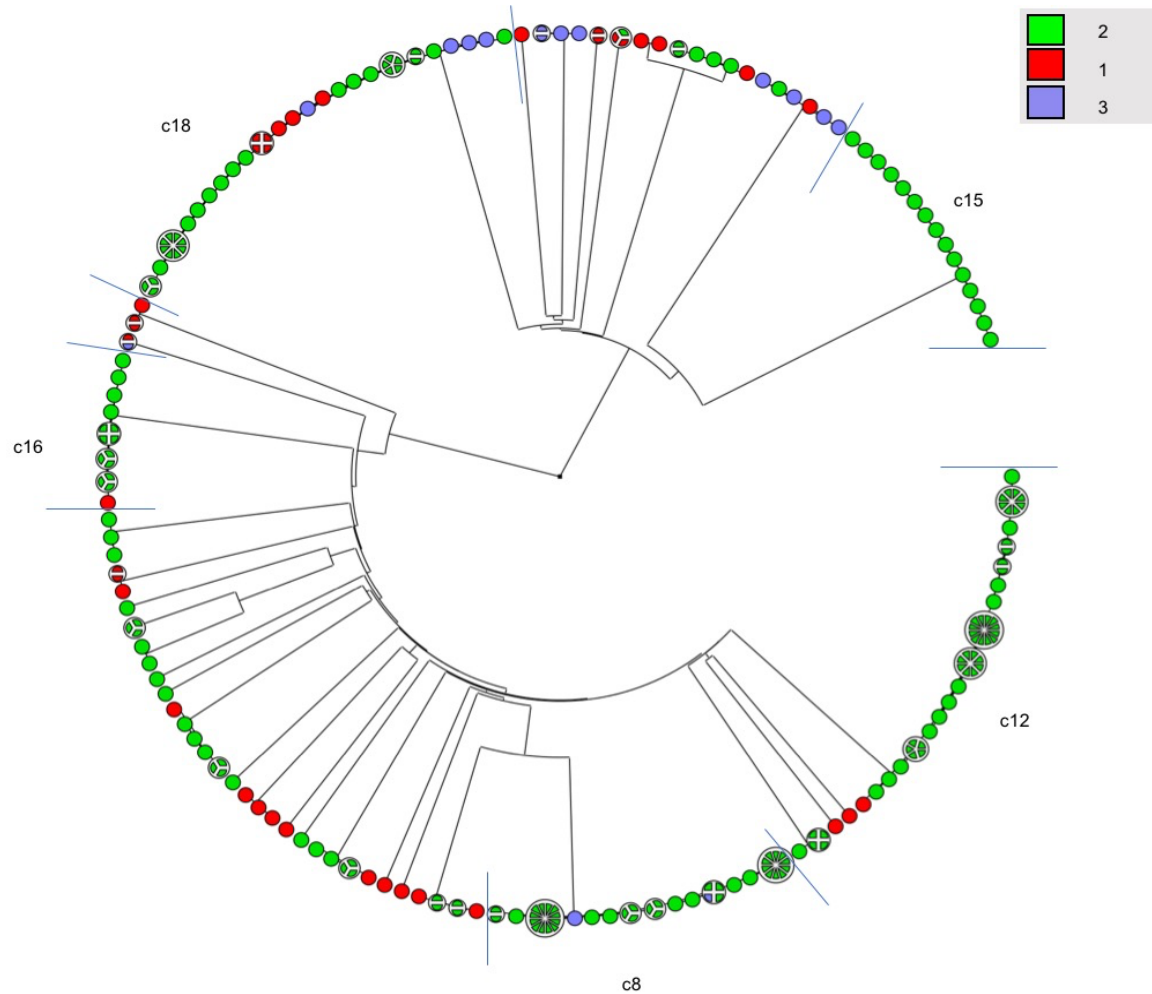


Abbildung 12 Umweltproben nach Stationen eingeteilt mit den 5 größten Clustern

Bei den übrigen 4 Clustern wurde mindestens ein genetisch verwandtes Isolat auch auf einer anderen Station gefunden. Isolate des Cluster 18 wurden auf allen drei Stationen aus der Umwelt isoliert.

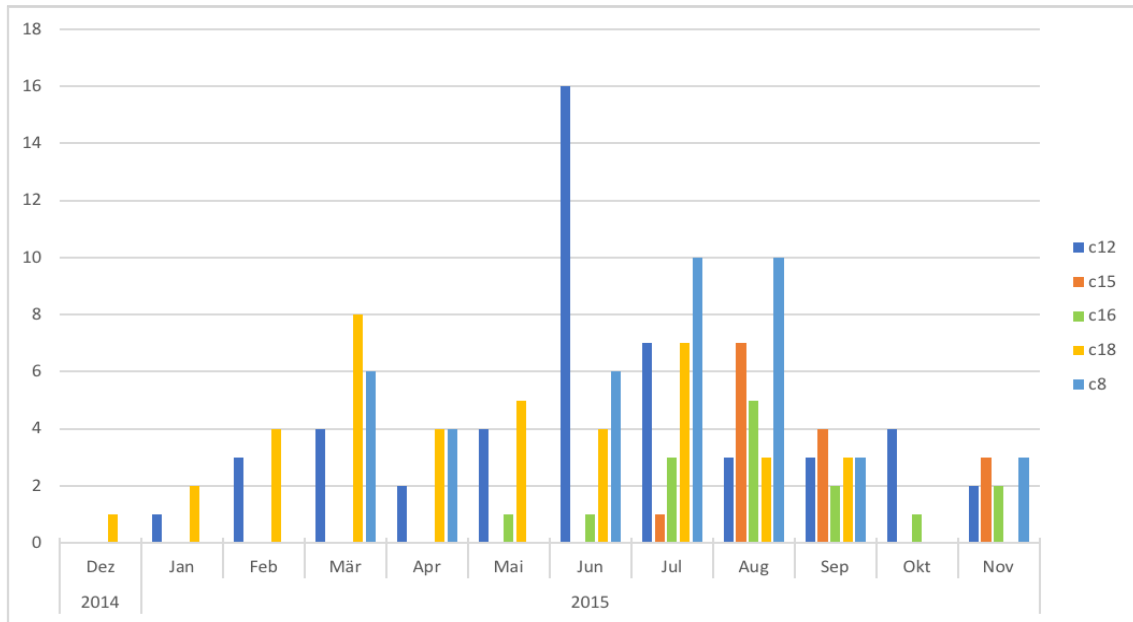


Abbildung 13 Entnahmezeitpunkte der Umweltisolate aus den 5 größten Clustern

Legende: X-Achse: Monate im Jahr 2014 und 2015, Y-Achse: Anzahl der Umweltisolate in den 5 größten Clustern, Dunkelblau: Cluster 12, Orange: Cluster 15, Grün: Cluster 16, Gelb: Cluster 18, Hellblau: Cluster 8

Wenn man die Cluster der Umweltisolate im zeitlichen Verlauf sieht, so wird deutlich, dass Cluster, wie beispielsweise Cluster 12 (blau) und Cluster 18 (gelb) über den kompletten Studienzeitraum hin nachweisbar waren. Allerdings waren die Cluster 16 (grün) und 8 (hellblau) nicht zu jedem Probenentnahmezeitpunkt nachweisbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Konzentration an Erregern temporär verringert wurde und mit der angewandten Methode nicht mehr nachweisbar waren, so dass die Erreger in diesem Zeitraum nicht mehr isoliert werden konnten. Aufgrund einer nicht vollständigen Eradikation konnten sie sich über den Zeitraum jedoch wieder vermehren, weshalb man sie Wochen später wieder isolieren konnte.

Im Gegensatz dazu, ist Cluster 15 (orange) in der Mitte der Studie und am Ende der Studie nachweisbar. Am Anfang wurden die Erreger aus Cluster 15 nicht detektiert. In Anhang Tabelle 4 sind die Probenentnahmezeitpunkte der Isolate der fünf größten Cluster mit Umweltproben dargestellt.

3.9. Analyse von wahrscheinlichen Übertragungen von P. aeruginosa aus der Umwelt auf Patienten

Um zu überprüfen, ob es ausgehend von der Umgebung im Krankenhaus zu einer Kolonisierung von Patienten mit *P. aeruginosa* gekommen ist, und um die Häufigkeit zu bestimmen, wurden die Cluster, in denen Patientenproben und Umweltproben vorhanden waren, genauer untersucht. Die einzelnen Cluster mit ihren Isolaten sind in Anhang Tabelle 7 dargestellt. Insgesamt waren 15 der 52 untersuchten Patientenisolat Singletons, das heißt der isolierte *P. aeruginosa* Stamm war weder nahe verwandt mit einem anderen Patientenstamm noch mit einem Umweltstamm. Weitere 8 Stämme wurden NGS Clustern zugeordnet, die ausschließlich Patientenisolat und keine Umweltisolat beinhalteten. Diese waren die NGS Cluster 2 (n=3), NGS Cluster 9 (n=3) und NGS Cluster 10 (n=2). Die NGS Cluster 17 bis einschließlich NGS Cluster 27 wiederum umfassten ausschließlich Umweltisolat.

Die verbleibenden Patientenisolat (n=29) kamen in 13 verschiedenen NGS Clustern vor, die sowohl Patienten- als auch Umweltisolat umfassten.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass der Anteil von Patienten- zu Umweltisolat in den verschiedenen NGS Clustern unterschiedlich war. Beispielsweise stammten in NGS Cluster 3 die Hälfte der Isolate von Patienten (4/8), während es in NGS Cluster 12 nur 3 von 52 Stämme Patientenisolat waren (Anhang Tabelle 7).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Umweltisolat zu dem jeweiligen Patientenisolat gehörten; d.h., ob sich der Patient in den 30 Tagen vor seinem positiven *P. aeruginosa* Nachweis in einem der Zimmer aufgehalten hatte, in denen das Umweltisolat nachgewiesen worden war.

Eine Übersicht über die Zuordnung von Patienten zu den entsprechenden Umweltisolat ist in Anhang Tabelle 8 zu finden. Insgesamt konnte bei 6 Patienten ein Umweltisolat aus demselben NGS Cluster zugeordnet werden (Tabelle 15). Aufgrund der genetischen Verwandtschaft und der epidemiologischen Verbindung der Isolate liegt in diesen Fällen eine Kolonisierung des Patienten aus der Umwelt nahe.

Bei den übrigen 23 Patienten stammten die Umweltisolat desselben NGS Clusters nicht aus den Zimmern, in denen sich der Patient in den 3 Monaten zuvor aufgehalten hatte, und konnten somit dem Patienten nicht zugeordnet werden.

Die sechs identifizierten Patienten-Umwelt Stammpaare lassen sich wie folgt zuordnen: im NGS Cluster 3 Patient 31 mit dem Umweltisolat UU1363, im NGS Cluster 12 Patient 27 mit den Umweltisolaten UU1474, UU1580, UU1621, UU1730, UU1785, im NGS Cluster 14 Patient 20 mit dem Umweltisolat UU1320, im NGS Cluster 16 Patient 42 mit den Umweltisolaten UU1901, UU2002, UU2158, UU2160, UU2322, Patient 49 mit den Umweltisolaten UU2158, UU2160, UU2322, UU2357, UU2388, UU2492 und Patient 50 mit den Umweltisolaten UU2158, UU2160, UU2322, UU2357, UU2388, UU2492.

Interessanterweise konnten in NGS Cluster 16 drei der Übertragungen beobachtet werden. Alle Stämme waren 4 MRGN Isolate und trugen das Carbapenemase Gen *bla_{VIM2}* (Tabelle 13). Ebenfalls eine Carbapenemase wurde in der Patientenprobe 31 (*bla_{IMP8}*) aus NGS Cluster 3 nachgewiesen. Es handelte sich hier ebenfalls um ein 4 MRGN Stamm. Das Genom des Patienten 31 und das Genom der Umweltprobe UU1363, das aus der Dusche isoliert wurde, wiesen eine hohe Homologie auf. In dem zugehörigen Umweltisolat konnte allerdings kein Gen *bla_{IMP-8}* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei insgesamt 6 Patienten von 52 Patienten eine Kolonisierung der Patienten mit *P. aeruginosa* sehr wahrscheinlich auf kontaminierte Wasserstellen aus der Patientenumgebung zurückzuführen ist. Dies entspricht 11,5 % der in der Studie untersuchten Patienten.

Tabelle 15 Übersicht über mögliche Übertragungen zwischen Umwelt und Patienten.

Legende: Die jeweiligen Umweltstämme aus denselben NGS Cluster sind Grün gekennzeichnet.

Patientennummer	NGS Cluster	zugehörige Umweltisolat	NGS Cluster	Übertragung	<i>bla_{VIM-2}/bla_{IMP-8}</i>
20	c14	UU1449_20	c1	nein	
		UU1320_20_25	c14	ja	
		UU1276_20_25	c16	nein	
		UU1516_38_20_25	c19	nein	
27	c12	UU1075_20	s17	nein	
		UU1474_27	c12	ja	
		UU1580_27	c12	ja	
		UU1621_27	c12	ja	
		UU1730_27_52	c12	ja	
		UU1785_27_52	c12	ja	
		UU1671_27	c16	nein	
		UU1521_27	c18	nein	
		UU1581x_27	c18	nein	
		UU1729_27_52	c26	nein	
31	c3	UU1363_31	c3	ja	Patientenisolat <i>bla_{IMP-8}</i>
		UU1456_31	c8	nein	
		UU1512_31	c8	nein	
		UU1443_31	c19	nein	
		UU1990ax_31	s22	nein	
42	c16	UU1738_42	c1	nein	
		UU1739_42	c1	nein	

		UU1789_42	c1	nein	
		UU1953x_42	c1	nein	
		UU2170_42	c7	nein	
		UU2233_42_50	c5	nein	
		UU1746_42_48	c8	nein	
		UU2007_42_48_52	c8	nein	
		UU1911_42_28	c12	nein	
		UU2163_42_50	c13	nein	
		UU2161_42_50	c15	nein	
		UU1901_42_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2002_42_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2158_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU1952_42	c27	nein	
		UU2324_42_50	c27	nein	
49	c16	UU2158_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2357_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2388_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2492_49_50	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2358_49_50_52	s24	nein	
50	c16	UU2233_42_50	c5	nein	
		UU2389_50	c12	nein	

		UU2493_50	c12	nein	
		UU2594_50	c12	nein	
		UU2163_42_50	c13	nein	
		UU2161_42_50	c15	nein	
		UU2158_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2357_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2388_49_50_52	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2492_49_50	c16	ja	bla _{VIM-2}
		UU2324_42_50	c27	nein	
		UU2358_49_50_52	s24	nein	

4. Diskussion

4.1. Bedeutung von NGS in der Infektionsepidemiologie

Seit der Einführung des Next-Generation Sequencing (NGS) im Jahre 2005 nimmt diese Methode im Bereich der Mikrobiologie und Hygiene zur Analyse von Bakterien ständig an Bedeutung zu. Die komplette Genomsequenzierung von Bakterien bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Charakterisierung von Bakterienisolaten und zur Beantwortung verschiedener diagnostischer, wissenschaftlicher und epidemiologischer Fragestellungen. Zum einen können durch die phylogentische Analyse verschiedener Bakterienisolate Erkenntnisse über mögliche Übertragungswege und Infektionsketten im lokalen Setting, aber auch auf einem globalen Level erlangt werden. Zudem kann der genetische Vergleich über verschiedene Zeiträume wichtige Schlüsse über die Evolution von Erregern erlauben. Weitere Anwendungsbereiche beinhalten die detaillierte Charakterisierung einzelner Stämme, beispielsweise in Bezug auf ihre Resistenzgene oder Pathogenitätsfaktoren (Metzker, 2010, Koser et al., 2012, Balloux et al., 2018, Besser et al., 2018).

Wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, kann man durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums Übertragungswege von Ausbrüchen innerhalb einer Station und zwischen Patienten analysieren und nachvollziehen (Koser et al., 2012, Balloux et al., 2018, European Centre for Disease Prevention and Control, 2016). Prominente Beispiele hierfür sind unter anderem der Krankenhausausbruch von multiresistenten *Actinobacter baumannii* in einem britischen Krankenhaus, die Aufklärung von MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) Infektionen und Infektionen mit Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* Stämmen (Besser et al., 2018, Lewis et al., 2010, Harris et al., 2010, Snitkin et al., 2012). Bei dem Ausbruch mit *Actinobacter baumannii* waren 6 Patienten mit diesem Erreger infiziert. Mittels NGS und dem Vergleich von SNPs konnte eine Übertragung von einem Patienten, der zuvor beim Militär war, auf einen anderen Patienten postuliert werden. Des Weiteren fand man in der Studie von Lewis et al. (2010) heraus, dass die Patienten, die zuvor beim Militär waren, sich dort mit dem multiresistenten Erreger infiziert hatten und diesen ins Krankenhaus eingeschleppt hatten (Lewis et al., 2010). Bei der Aufklärung von MRSA Infektionen wurden mittels

NGS unterschiedliche genetische Varianten des SCC*mec* Gens beschrieben, welches für die phänotypische Resistenz der *Staphylokokken* gegenüber Methicillin verantwortlich ist (Harris et al., 2010, Weterings et al., 2017). Innerhalb eines Landes und eines Kontinentes dominiert häufig ein genetischer Subklon. Jedoch konnte auch die interkontinentale Ausbreitung dieser Klone rekonstruiert werden, die neue Erkenntnisse hinsichtlich der Epidemiologie auf globaler, internationaler Ebene erlaubten (Harris et al., 2010). In der Studie von Snitkin et al. (2012) wurde der Ausbruch von Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* untersucht, um weitere Erkenntnisse über die Ausbreitung zu erlangen, damit frühzeitig schnelle Isolations- und Hygienemaßnahmen eingeleitet werden können. Insgesamt waren in dieser Studie 18 Patienten mit diesem Erreger infiziert. Es konnte aufgezeigt werden, dass insgesamt 3 Übertragungen von einem Patienten ausgegangen sind (Snitkin et al., 2012).

Im Jahre 2015 wurde NGS auf besonders bemerkenswerte Weise bei Ebola angewandt. Wissenschaftler sequenzierten vor Ort in Guinea während des Ausbruchs insgesamt 124 Ebola Proben, wobei ein MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) Sequenzer verwendet wurde, der nicht viel größer als ein USB-Stick und leicht zu transportieren war. In der Regel lagen die Sequenziererergebnisse innerhalb von 24 Stunden vor und erlaubten eine Einordnung der Ausbruchsdynamik in Bezug auf die Ausbreitung und Evolution des Erregers (Gwinn et al., 2019, Quick et al., 2016).

Die vorab aufgeführten Beispiele demonstrieren, dass die Einführung von NGS gerade im Bereich der Infektionsepidemiologie einen großen Fortschritt darstellt.

Wie in der vorgelegten Studie gezeigt wird, ist es in der Krankenhaushygiene wichtig, zeitnah und effektiv Übertragungsketten und die Verbreitung von potenziell pathogenen Erregern zu verstehen und Informationen über mögliche Resistenzen zu erfassen. Diese Daten sind essentiell, um Ausbreitungen von nosokomialen Infektionen durch geeignete und gezielte interventionelle Maßnahmen effizient einzudämmen und verhindern zu können (Motro and Moran-Gilad, 2017, Pecora et al., 2015, Koser et al., 2012, Balloux et al., 2018, Quainoo et al., 2017).

Neben der Analyse von Ausbruchsgeschehen, Übertragungs- und Ausbreitungswegen und der Evolution von Erregern innerhalb eines bestimmten epidemiologischen Settings besteht ein weiterer Vorteil von Kompletengenom Sequenzierungen darin, dass auch der

einzelne Stamm genau charakterisiert werden kann. So können beispielsweise Stämme auf das Vorliegen von Resistenzgenen untersucht werden. Hierbei können die Resistenzgene selber über einen Abgleich gegenüber einer Resistenzdatenbank identifiziert werden, aber auch die Umgebung der Resistenzgene kann charakterisiert werden. Einige Erreger wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* sind schwer zu kultivieren und benötigen bis zum Wachstum, beziehungsweise bis zum Abschluss einer phänotypischen, kultur-basierten Resistenztestung eine lange Zeit. Aufgrund dieser Zeitspanne bis zum Erhalt des Befundes kommt es in der Klinik regelmässig zur Anwendung einer sogenannten empirischen Antibiotikatherapie (Motro and Moran-Gilad, 2017). Mittels der NGS Methode können die Erreger schneller identifiziert und Informationen über das Vorliegen möglicher Antibiotikaresistenzen erlangt werden, wodurch eine gezieltere Therapie eingeleitet und das Risiko einer Entstehung weiterer Resistenzen minimiert werden können (Kommedal et al., 2014). In Hinblick auf den Krankheitsverlauf ist dies sehr wichtig, da durch eine richtige und effektive Therapie von einem deutlich besseren Verlauf ausgegangen werden kann.

Beschreibungen und Anwendungen von NGS zur Auflösung von Übertragungsketten wurden bislang, wie aus den oben aufgeführten Beispielen hervorgeht, vor allem bei gehäuftem Auftreten von Kolonisierungen oder Infektionen mit multiresistenten Pathogenen angewandt. Diese fallen häufig leichter im klinischen Laboralltag auf, aufgrund ihres Antibiotogramms, der Meldepflicht, den durchzuführenden Isolationsmaßnahmen und der erschwerten Therapie. Dennoch sollten auch eine Übertragung und nosokomiale Infektionen mit sensiblen Pathogenen erkannt und in der Folge durch Ergreifen von geeigneten Präventionsmaßnahmen verhindert werden. In dieser Studie wurden daher nicht nur multiresistente *P. aeruginosa* Stämme untersucht und sequenziert, sondern auch Erreger, die sensibel gegenüber den getesteten Antibiotika waren. Auch diese Erreger bilden Übertragungscluster und spielen eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Übertragung von Erkrankungen mit dem Bakterium *P. aeruginosa*. Bei 2 von 6 Übertragungen (Patient 20 und Patient 27) wurden Erreger nachgewiesen, die sensibel auf die getesteten Antibiotika waren. Insgesamt befinden sich 24 sensible Patientenstämme in Clustern mit weiteren sensiblen Patientenisolaten.

4.2. Vorkommen und phylogenetische Zuordnung von *P. aeruginosa* in der Umwelt und bei Patienten

Insgesamt wurden in die Studie 239 *P. aeruginosa* Isolate aus der Umwelt und 52 Isolate aus Patientenproben eingeschlossen.

Unter Berücksichtigung der phylogenetischen Einteilung der Umweltisolate konnten 11 Cluster identifizieren werden, die ausschließlich Umweltisolate enthielten, weitere 12 Cluster, die sowohl Isolate aus der Umwelt als auch Patientenisolate umfassten, sowie 9 Singletons. Die Umweltisolate wurden aus sanitären Anlagen aus Zimmern von 3 Stationen gewonnen. Insgesamt stammten 37 Umweltisolate von der Station 1, 187 Umweltisolate von Station 2 und 15 Umweltisolate von Station 3.

Interessanterweise wurde nur ein Cluster gefunden (Cluster 15, Abbildung 12), das ausschließlich Umweltisolate von einer Station umfasste. Die insgesamt 15 Stämme des Clusters waren allerdings nicht über den kompletten Studienzeitraum nachweisbar, sondern nur von Juli bis September 2015 und im November 2015 (Abbildung 13). Erstaunlicherweise wurden 14 Proben aus demselben Zimmer isoliert. Nur 1 Probe wurde in einem anderen Zimmer nachgewiesen. Bei den weiteren 4 größten Clustern, in denen Umweltisolate vorkamen, war mindestens ein Isolat auch auf einer anderen Station nachweisbar. Ebenfalls waren die Cluster 8, 12, 18 über den größten Teil des Studienzeitraumes hinweg nachweisbar, lediglich Isolate des Clusters 16 waren ebenfalls in der Mitte des Studienzeitraums über einen Zeitraum von 7 Monaten belegbar. Insgesamt zeigen diese Daten, dass nicht nur lokale Cluster in der Umwelt vorherrschten, sondern dass es verschiedene Cluster gab, die über einen längeren Zeitraum hinweg stationsübergreifend nachgewiesen wurden.

Es können unterschiedliche Faktoren dazu beigetragen haben, dass sich die Umweltisolate auf unterschiedlichen Stationen ausgebreitet haben.

P. aeruginosa ist fähig Biofilme zu produzieren. Diese bestehen aus der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) (Moradali et al., 2017, Olsen, 2015, Momba et al., 2000). Die extrazelluläre polymere Substanz stellt einen Schutz gegen Antibiotika, Nährstoffmangel wie Sauerstoffmangel und oxidativen Stress dar (Olsen, 2015, Moradali et al., 2017, Furiga et al., 2016). Diese besondere Eigenschaft hat zur Folge, dass zunehmend Antibiotika über einen längeren Zeitraum benötigt werden, um die Bakterien in ihrer

Vermehrung zu hemmen und zu eradizieren (Furiga et al., 2016, Fernandez-Olmos et al., 2012, Hengzhuang et al., 2011). Hier durch kommt es nicht nur zu Resistenzen gegenüber Antibiotika, sondern auch zu Resistenzen gegenüber Desinfektionsmitteln (Xue et al., 2013, Moritz et al., 2010, Sagripanti and Bonifacino, 2000). Darüber hinaus begünstigt eine erhöhte Wassertemperatur und Stagnation im Abwassersystem die Ausbildung von Biofilmen (Walker and Moore, 2015, Bédard et al., 2016, Moritz et al., 2010).

Durch diese Faktoren wird die Eradikation dieser Erreger erschwert und es kann zu Ausbreitungen über das Abwassersystem auf andere Stationen kommen. Zudem ist vorstellbar, dass sich fern von der Austrittsstelle (Waschbecken, Toiletten, Dusche) Biofilme bilden, von denen immer wieder Teile losgelöst und mit dem Wasser Richtung Auslass transportiert werden. Damit könnte erklärt werden, dass es trotz intensiver Reinigungsmaßnahmen zu erneuter „Besiedlung“ von sanitären Einrichtungen kommt.

Ein weiterer Weg, über den es immer wieder zu einer Kontamination von sanitären Anlagen kommen könnte, ist die Kontamination durch die Ausscheidungen des Patienten. Zwar wurde in dieser Arbeit nur untersucht, in welchem Umfang Patienten sich durch den Kontakt zu kontaminierten Wasserquellen besiedelten, aber der Weg über den Patienten als Kontaminationsquelle ist ebenfalls vorstellbar. Es müsste sich hierbei um Stämme handeln, die einerseits beispielsweise den humanen Darmtrakt besiedeln können, andererseits aber auch Eigenschaften wie möglicherweise Biofilmbildung mit sich bringen, um erfolgreich in der Umwelt überleben zu können. Inwiefern dieser Weg eine Rolle spielt, lässt sich aus den in dieser Studie erhobenen Daten nicht sicher ableiten. Hierfür müsste das Studiendesign geändert werden. In saubere Zimmer ohne *P. aeruginosa* Nachweis, müssten kolonisierte Patienten gelegt werden. Anschließend wäre eine Beobachtung möglich, ob, wie häufig und welche Stämme sich über diesen Weg im Wassersystem verbreiten.

Eine Schnittstelle bilden hierbei die sogenannten U-förmigen Röhrensiphons (U-Bend). Diese sind häufiger Bestandteil von Sanitäranlagen und verhindern, dass Gerüche aus der Kanalisation in die Umgebung entweichen. In dem U-förmigen Siphon stagniert das Wasser, so dass Bakterien, unter anderem *P. aeruginosa*, Biofilme ausbilden können. Durch die Entstehung von Aerosolen und Spritzwasser beim Händewaschen können sich diese Biofilme mit den Bakterien lösen und zu einer Kontamination von Sanitäranlagen führen (Swan et al., 2016, Deasy et al., 2018, Moloney et al., 2020). In der Studie von

Swan et al. (2016) wurden unterschiedliche Desinfektionsmittel zur Reinigung der U-förmigen Rohre von Biofilmen getestet. Es wurden dafür zwei unterschiedliche Desinfektionsmittel verwendet: Hypochlorsäure und Natriumhydroxid. Zuerst wurden die Rohre mit Natriumhydroxid und dann mit Hypochlorsäure gereinigt. Diese Methode erwies sich von deutlichem Vorteil und konnte die Bakteriendichte im Siphon erheblich reduzieren (Swan et al., 2016).

Ein weiterer Punkt, der bei der Betrachtung der Umweltisolate und deren genetischer Verwandtschaft berücksichtigt werden muss, ist der mögliche Bias, der durch die Stammauswahl eingeführt wurde und die Aussagen in Bezug auf die Verteilung der verschiedenen Cluster in der Umwelt limitiert. Es wurden nicht konsekutiv alle Umweltisolate analysiert, sondern nur jene Umweltisolate aus Zimmern ausgewählt, in denen ein Patient war, der später im Verlauf mit *P. aeruginosa* kolonisiert wurde. Damit könnte sich die Auswahl der Zimmer und der damit vorliegenden Klone dahingegen verschieben, dass mehr Umweltisolate identifiziert wurden, die auch in der Lage sind, Patienten zu besiedeln. Nimmt man an, dass in einem Zimmer ein *P. aeruginosa* Stamm im Wasser vorhanden ist, der Patienten überhaupt nicht kolonisieren kann, so wäre womöglich kein Patient nach seinem Aufenthalt mit *P. aeruginosa* kolonisiert gewesen. Dieses Umweltisolat wäre damit auch nicht in dieser Studie eingeschlossen worden. Insgesamt sollte dieser Bias aber nicht zu groß sein, betrachtet man die große Anzahl an Umweltisolaten sowie die Tatsache, dass wir Cluster identifizieren konnten, in denen ausschließlich Umweltisolate vorkamen.

Im Vergleich dazu konnten die 52 Patientenisolate wie folgt eingeteilt werden: 29 Patientenisolate kamen in Clustern vor, in denen ebenfalls auch Umweltproben vorkamen, 8 Patientenisolate waren in 3 Clustern bestehend nur aus Patientenisolaten, und weitere 15 Patientenisolate waren Singletons.

Anhand der Aufteilung der Patientenproben in Clustern ist zu erkennen, dass die Patientenproben nicht nur mit Umweltproben gemeinsam in demselben Cluster vorkommen, sondern dass insgesamt 37 Patienten (71 %) zu mindestens einem anderen Patientenisolat eine gewisse genetische Ähnlichkeit aufwiesen und im gleichen Cluster angesiedelt waren. Neben einer Übertragung aus der Umwelt auf den Patienten können

auch Übertragungen zwischen Patienten untereinander oder dem Personal auftreten (Johnson et al., 2009, Reuter et al., 2002, Foca et al., 2000).

Diese können im Bezug auf die Anzahl von nosokomialen Infektionen eine wichtige Rolle spielen.

In der Studie von Johnson et al. (2009) wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren rektale Abstriche bei Patienten auf der Intensivstation durchgeführt, um eine Kolonisierung mit *P. aeruginosa* zu erfassen. Über die Pulsed-Field-Gelelektrophorese wurden bei einem Teil der Patienten ähnliche Genotypen festgestellt, so dass man in diesen Fällen von einer Übertragung ausging (Johnson et al., 2009). In der Studie von Reuter et al. (2002) konnte man ähnliche Genotypen von Patientenisolaten auch in Zimmern nachweisen, in denen sich der Patient nicht aufgehalten hat. Bei der Untersuchung der Hände des Pflegepersonals konnten dieselben genetischen Erreger isoliert werden, so dass hier eine Verschleppung der Erreger durch das Krankenhauspersonal postuliert werden konnte (Reuter et al., 2002). Eine ähnliche Situation, in der es zu Übertragungen von *P. aeruginosa* über das Pflegepersonal auf Patienten gekommen war, wird in der Studie von Foca et al. (2000) beschrieben (Foca et al., 2000). Um diese Übertragungen genauer zu untersuchen, sind epidemiologische Daten zu den stationären Aufenthalten der Patienten notwendig, wie beispielsweise, ob sich die Patienten auf der gleichen Station oder im gleichen Zimmer zur gleichen Zeit aufgehalten haben. Zudem wäre es notwendig zu wissen, ob es Hinweise auf eine gemeinsame Ansteckungsquelle aus der Umwelt gibt, wie beispielsweise eine besiedelte Toilette oder ein besiedeltes Waschbecken. Da diese Fragestellung nicht Teil dieser Arbeit war, können hierzu keine definitiven Aussagen getroffen werden und eine Übertragung von Patient- zu Patient nicht sicher ausgeschlossen werden. Diese Aspekte könnten die Grundlage einer weiterführenden Studie bilden, wobei neben einer Untersuchung von Abwasser-Patienten Kontakten ebenfalls der Kontakt zwischen den Patienten sowie der Kolonisierungsstatus des Personals erfasst werden könnte.

Jedoch sind fast 28,8 % (n=15) der Patientenisolats in ihrer Genetik so unterschiedlich zu den anderen Patienten- und Umweltisolats, dass man in diesen Fällen nicht von einer Ansteckung und Übertragung ausgehen kann.

4.3. Abwassersystem als Infektionsrisiko

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurden in dieser Arbeit insgesamt 52 Patienten- und 239 Umweltproben analysiert. Bei insgesamt 6 Patientenisolaten konnte eine Zuordnung zu einer zugehörigen Umweltprobe im selben Cluster erfolgen. In diesen Fällen legt der epidemiologische Zusammenhang zwischen Patient- und Umweltisolat zusammen mit der engen genetischen Verwandtschaft eine Kolonisierung des Patienten ausgehend von einer Umweltquelle im Krankenhaus nahe. Eine solche Kolonisierung konnte in dieser Arbeit bei insgesamt 6 Patienten (11,5 %) nachgewiesen werden.

Besorgniserregend ist hierbei, dass es sich bei 4 von 6 postulierten Übertragungen um sogenannte 4 MRGN Stämme handelt, die ein Carbapenemase Gen tragen und einen multiresistenten Phänotyp aufweisen (Tabelle 12, Tabelle 13). Bei 3 der 4 Stämme konnte die Carbapenemase *bla_{VIM-2}* nachgewiesen werden, eine Carbapenemase, die häufig weltweit bei *P. aeruginosa* anzutreffen ist (Zafer et al., 2015, Castanheira et al., 2014, Edelstein et al., 2013). In einer Studie von Castanheira et al. (2014) wurden im Zeitraum von 2009 bis 2011 die Carbapenem-resistenten *Pseudomonaden* in 14 europäischen Ländern und Mittelmeerländern in 27 Krankenhäusern untersucht. Auch hier wurde eine gehäufte Existenz der Metallo- β -Lactamase *bla_{VIM-2}* bei *Pseudomonaden* identifiziert (Castanheira et al., 2014).

Während in der hier beschriebenen Studie nur die Bakterienstämme an sich analysiert wurden, haben Pirzadian et al. (2020) in ihrer Studie die Zusammensetzung der verschiedenen Bakterien in Ausgüssen untersucht und dabei Ausgüsse mit *P. aeruginosa bla_{VIM}* Besiedlung und ohne eine solche Besiedlung verglichen. Auch wenn die Fallzahl sehr klein war (n=8), hat der Ansatz gezeigt, dass es eine hohe Varianz zwischen den verschiedenen Ausgüssen gab und hier die Zusammensetzung der Gesamtheit der Bakterien ebenfalls eine Rolle spielen könnte (Pirzadian et al., 2020). Auch dieser Ansatz könnte die Basis für weiterführende Studien bilden.

Des Weiteren konnte bei einem Stamm die Carbapenemase *bla_{IMP-8}* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *bla_{VIM-2}* ist *bla_{IMP-8}* nicht weit verbreitet in Deutschland, sondern gehäuft lokal anzutreffen (Pfennigwerth N. , 2019, Pfennigwerth N., 2020). Bereits in der Vergangenheit war es zu einem Ausbruch mit einem *bla_{IMP-8} P. aeruginosa* Klon im Universitätsklinikum Tübingen gekommen (Willmann et al., 2015a). In dem Studienzeitraum von 2009 bis 2012 wurden insgesamt 49 *P. aeruginosa* Stämme (41

Patienten- und 8 Umweltproben) auf 2 Stationen des UKT, die das *bla*_{IMP-8} Gen enthielten, identifiziert (Willmann et al., 2015a).

In dieser Studie wurde der *bla*_{IMP-8} *P. aeruginosa* Stamm nur bei Patient 31 nachgewiesen. Allerdings konnte bei dem *bla*_{IMP-8} Übertragungspaar (Patient 31/ Umweltisolat UU1363_31) eine genetische Verwandtschaft festgestellt werden, jedoch war bei dem Umweltisolat das *bla*_{IMP-8} nicht nachweisbar (Tabelle 15, Anhang Tabelle 5, Anhang Tabelle 6). Da sich *bla*_{IMP-8} häufig auf Plasmiden befindet, könnte dieses Gen in der Umwelt oder im Labor bei der Aufarbeitung der Stämme verloren gegangen sein (Peter et al., 2020). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Resistenzgen aufgrund von Fehlern beim Zusammensetzen des Genoms (Assembly) verändert wurde, so dass es bei der Suche in einer Datenbank nicht mehr detektiert werden kann.

Nicht nur in der hier durchgeführten Studie wird eine Übertragung von multiresistenten *Pseudomonaden* über das Abwassersystem im Krankenhaus auf Patienten untersucht und beschrieben.

In der Publikation von Martin Exner (2018) werden verschiedene Studien vorgestellt, die beschreiben, dass sich Patienten über das Abwassersystem im Krankenhaus mit multiresistenten *P. aeruginosa* Erregern angesteckt haben (Exner et al., 2018). So wird dargestellt, dass erst durch das Einbeziehen des Abwassersystems während eines Ausbruchs mit multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen Infektionen durch unterschiedliche Maßnahmen eingedämmt werden konnten, beispielsweise durch den Austausch von Toilettenschüsseln (Kizny Gordon et al., 2017, Kotsanas et al., 2013, Wendel et al., 2015, Exner et al., 2018, Leitner et al., 2015). Eine mögliche Erklärung, dass in dieser Studie in 4 von 6 Fällen eine postulierte Transmission eines Carbapenemase produzierenden *P. aeruginosa* Stammes beobachtet werden konnte, ist eine verstärkte Selektion durch Kontakt zu Antibiotika. Durch die Ausscheidung von Urin und Stuhl gelangen Antibiotika in das Abwassersystem (Adler et al., 2018). Durch diesen Selektionsdruck können sich resistente Erreger begünstigt vermehren und ausbreiten (Adler et al., 2018). Wenn man postuliert, dass aufgrund dieser Selektion eine höhere Keimzahl von multiresistenten *P. aeruginosa* im Vergleich zu den sensiblen Stämmen in den Toiletten vorliegt, könnte dies eine Erklärung sein, dass in dieser Arbeit eine vermehrte Übertragung von multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen beobachtet wurde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten quantitative Untersuchungen auf das Vorliegen von *P. aeruginosa* aus den Umweltproben durchgeführt werden.

4.4. Patientenfaktoren, die eine Übertragung oder eine Kolonisierung mit P. aeruginosa begünstigen könnten

Neben den diskutierten Eigenschaften der *P. aeruginosa* Stämme, die zu einer vermehrten Übertragung beitragen können, gibt es auch Anhaltspunkte dafür, dass eine Reihe von Risikofaktoren der Patienten eine Kolonisierung mit *P. aeruginosa* begünstigen können. Vor allem sind Patienten betroffen, die an bestimmten Grunderkrankungen wie z. B. Mukoviszidose oder COPD leiden. Beide Patientengruppen sind durch ihre Grunderkrankung und der dazugehörigen Lungenproblematik prädestiniert für eine Kolonisation mit *P. aeruginosa* (Engler et al., 2012, Schelstraete et al., 2013). Nicht nur diese Patientengruppe, sondern auch weitere Patientengruppen, die beispielsweise durch die Einnahme von Chemotherapeutika, Steroiden, Immunsuppressiva und durch Transplantationen immunsupprimiert sind, können sich aufgrund ihrer Immunschwäche leichter mit dem Erreger kolonisieren und somit infizieren (Migiyama et al., 2016, Parkins et al., 2010).

Immunsupprimierte und stationäre Patienten erhalten teilweise prophylaktisch Antibiotika, z. B. während operativer oder invasiver Eingriffe, um Infektionen zu vermeiden (Wieler and Broich, 2018). Die unsachgemäße Anwendung von Antibiotika kann dazu führen, dass Bakterien mit Resistenzen einen deutlich höheren Selektionsvorteil besitzen (Wieler and Broich, 2018). In einer Studie von Hoang et al. (2018) konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Antibiotika, die *P. aeruginosa* nicht erfassen, ein Risikofaktor für eine Kolonisierung mit *P. aeruginosa* darstellen. Zudem wurde in der Studie kontaminiertes Leitungswasser im Eingangszimmer der Intensivstation als Risikofaktor für eine nachfolgende Kolonisation mit dem Erreger identifiziert (Hoang et al., 2018). Des Weiteren beschreibt diese Studie sowie die Studie von Gómez-Zorrilla et al. (2015), dass die ungezielte Gabe von unspezifischen Antibiotika einen Selektionsvorteil für *P. aeruginosa* im Darm darstellt, und die Kolonisierung den Ausgangspunkt für eine Infektion bilden kann (Hoang et al., 2018, Gómez-Zorrilla et al., 2015).

Für immunsupprimierte Patienten stellen eine Kolonisierung oder Infektion mit multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen ein besonderes Risiko dar. Aufgrund ihres geschwächten Immunsystems und der zu beobachtenden Antibiotikaresistenzen der Erreger sind diese Erkrankungen schwer therapierbar und häufig mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität verbunden (Judd et al., 2016, Liu et al., 2015, Cohen et al., 2017). Nach den Empfehlungen des Robert Koch-Instituts (RKI) werden immunsupprimierte Patienten in 3 Risikogruppen eingeteilt. Die erste Risikogruppe enthält Patienten, die unter einer mittelschweren Immunsuppression erkrankt sind. Darunter fallen Patienten, die bis zu 10 Tage unter einer Granulozytopenie oder unter einem Mangel an CD4 positiven T-Zellen leiden. Wenn beide Kriterien zutreffen, wird der Patient in die nächste Risikogruppe zu den Patienten mit einem schweren Immundefizit eingestuft. Dazu gehören auch Personengruppen, die in den letzten 6 Monaten sich einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen haben oder sich aufgrund der Vorbereitung zur Stammzelltransplantation in stationärer Behandlung befinden. Zu der letzten Risikogruppe gehören die immunsupprimierten Patienten, die sich einer Stammzelltransplantation im Stadium der Regeneration der Granulopoese befinden oder unter einer Komplikation der hochgradigen Graft-versus-host-Erkrankung als immunologische Reaktion auf die Stammzelltransplantation leiden (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2010).

Ab der Risikogruppe 3 empfiehlt das RKI, dass diese Patientengruppe ein Einzelzimmer mit eigener Toilette und Dusche zur Verfügung steht (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2010). Eine weitere Maßnahme besteht darin, Waschbecken einzusetzen, die ohne den Einsatz von Händen bedient werden können (Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, 2010). Um gerade in dieser sehr vulnerablen Gruppe das Infektionsrisiko durch den Kontakt mit Wasser weiter zu verringern, kommen verschiedene Alternativen in Betracht. Eine Alternative wäre zum Beispiel das Aufstellen von Chemietoiletten. Diese Toiletten sind nicht mit dem Abwassersystem verbunden und können mehrmals täglich hygienisch gereinigt und desinfiziert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass jeder Patient

seine eigene Toilette besitzen würde, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Ausbreitung von Erregern zwischen den Patienten ebenfalls minimiert werden würde. Als Nachteil ist sicherlich die Einschränkung von Komfort und Lebensqualität des Patienten hervorzuheben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Abwassersystem für immunsupprimierte, alte und multimorbide Patienten ein erhöhtes Infektionsrisiko darstellt (Exner et al., 2018). Weitere Studien sind notwendig, um die Ursachen, Transmissionwege und mögliche Präventionsmaßnahmen detailliert zu verstehen.

4.5. Limitation der Aussagekraft der Studie

In einigen Punkten ist die in dieser Arbeit durchgeführten Studie und die daraus resultierenden Ergebnisse limitiert.

In der vorgelegten Studie wurden bei den Patienten zur Testung auf *P. aeruginosa* einmal wöchentlich rektal Abstriche entnommen. *Pseudomonaden* besiedeln häufig den Darm von Immunsuppressiven, nach Antibiotikabehandlung und nach langen Krankenhausaufenthalten (Markou and Apidianakis, 2014). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme konnte nur der aktuelle Kolonisierungszustand des rektalen Darmabschnittes beurteilt werden. Hierbei wurden etwaige Klone, die in anderen Darmabschnitten vorkamen, nicht erfasst. Eine weitere Limitation der Methode ist die Nachweisgrenze. Wenn der Patient nur in sehr geringem Umfang mit *P. aeruginosa* kolonisiert ist, kann es sein, dass in der gewonnenen Probe und der angesetzten Probenmenge für die kulturelle Anzucht keine Keime enthalten sind. Vorstellbar ist auch, dass ein Nachweis der Kolonisierung erst mit zeitlicher Latenz gelingt, beispielsweise wenn der Patient eine Antibiose erhält und es zu einer Selektion von *P. aeruginosa* im Darmtrakt kommt. Einflussfaktoren, wie medikamentöse Therapie oder auch Immunsuppressiva wurden in der vorgelegten Studie ebenfalls nicht erfasst.

Da *P. aeruginosa* neben einer rektalen Kolonisierung auch im Rachenraum und in der Lunge vorkommen, kann es sein, dass beim Vorliegen von verschiedenen Klonen diese nicht erfasst wurden. Dieses Problem stellt auch bei der Analyse der Umweltproben eine wichtige Limitation der Studie dar. Bei der kulturellen Anzucht wird mit wenigen Kolonien weitergearbeitet und eine Identifizierung und molekulare Analyse

durchgeführt, so dass verschiedene zeitgleich vorkommende Klone nicht erfasst werden. Beispielsweise ist es denkbar, dass sich im Abwasser viele *P. aeruginosa* Stämme aus Cluster 1 und wenige aus Cluster 2 befinden. Es kann jedoch sein, dass der Patient aus demselben Zimmer mit einem *P. aeruginosa* Klon aus Cluster 2 kolonisiert ist. Diese Kolonisierung bzw. Übertragung würde mit dem Beprobungsverfahren nicht erfasst werden. Eine weitere Einschränkung gerade im Bereich der Umweltproben könnte das intermittierende Auftreten von *P. aeruginosa* sein, beispielsweise in Abhängigkeit von der Lösung eines Biofilms. So ist es möglich, durch einen zweiwöchigen Probesturnus positive Nachweise in der Umwelt zu verpassen. Eine weitere Limitation besteht darin, dass Einflussfaktoren, wie beispielsweise Reinigungsverfahren und das Reinigungsintervall, in Bezug auf die Beprobung nicht erfasst wurden.

Ebenfalls stellt die relativ geringe Anzahl an eingeschlossenen Patientenisolaten mit 52 eine Limitation dar. Eine Erhöhung von untersuchten Patientenisolaten und eine Erfassung möglicher Einflussfaktoren auf Seiten der Patienten sowie in der Patientenumgebung könnten die Basis für eine zukünftige Studie bilden.

Insgesamt war in dieser Arbeit die Häufigkeit, dass sich eine Kolonisierung des Patienten auf das Abwassersystem zurückführen ließ, mit 11,5 % nicht sehr hoch. Es könnte sein, dass nicht alle Übertragungen aufgrund der in diesem Abschnitt beschriebenen Probleme der Probenentnahme und Verarbeitung detektiert werden konnten.

5. Zusammenfassung der Dissertation

P. aeruginosa ist einer der bedeutsamsten Erreger von nosokomialen Infektionen, wobei insbesondere eine Blutstrominfektion mit einer hohen Mortalität belastet ist. Besonders sind hierfür immunsupprimierte Patienten gefährdet, beispielsweise nach Stammzelltransplantation oder unter Chemotherapie. Erschwerend kommt hinzu, dass *P. aeruginosa* Isolate häufig Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika aufweisen. *P. aeruginosa* besitzt eine hohe Anpassungsfähigkeit, ist in der Umwelt weit verbreitet und kommt unter anderem in Duschen, Waschbecken und Toiletten vor. Von diesen kontaminierten, patientennahen Reservoirien geht eine potenzielle Gefahr der Übertragung und nachfolgender Kolonisationen oder Infektionen des Patienten aus. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Häufigkeit einer Übertragung aus diesen Reservoirien auf den Patienten zu ermitteln. Hierfür wurden über einen Studienzeitraum von 10 Monaten Patienten identifiziert, die im Rahmen ihres Krankenhausaufenthaltes neu mit *P. aeruginosa* kolonisiert wurden. Über einen Abgleich mit den Belegungsdaten wurden die Zimmer und die entsprechenden *P. aeruginosa* Umweltisolate aus den Sanitäreinrichtungen, in denen sich der Patient bis zu 30 Tagen zuvor aufgehalten hatte, identifiziert.

In dieser Studie wurden 52 Patienten- und 239 Umweltproben eingeschlossen. Sowohl die *P. aeruginosa* Isolate der Patienten als auch die zugehörigen Umweltisolate wurden Kompletengenom sequenziert, um die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Stämmen zu bestimmen. Zusätzlich wurden die in den Isolaten vorkommenden Resistenzgene über einen Abgleich mit einer Resistenzdatenbank identifiziert.

Eine genom-basierte Phylogenie ermöglichte die Einteilung der insgesamt 291 Stämme in verschiedene phylogenetische Cluster. Hierbei zeigte sich ein sehr heterogenes Verteilungsbild mit insgesamt 27 Clustern, die zwischen 2 und 52 Isolate umfassten. Bei 24 Stämmen konnte kein genetisch verwandtes Isolat gefunden werden. Die phylogenetische Analyse der Isolate zeigte, dass insgesamt 11 Cluster ausschließlich Umweltisolate enthielten, während 4 Cluster nur Patientenisolate umfassten. Den verbleibenden 12 Clustern waren sowohl Patienten- als auch Umweltisolate zuzuordnen. Insgesamt konnten 19 *bla*_{VIM-2} Carbapenemase Gene bei 4 Patienten- und 15

Umweltisolaten und ein *bla*_{IMP-8} Carbapenemase Gen bei einem Patientenisolat nachgewiesen werden.

Bei den 52 Patientenisolaten waren 15 Singletons, weitere 8 Patientenisolate gehörten zu Clustern, in denen ausschließlich Patientenisolate zugeordnet waren. Zu den verbleibenden 29 Patientenisolaten gab es Umweltisolate in dem jeweiligen Cluster.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Umweltisolate zu dem jeweiligen Patientenisolat gehörten; sprich, ob sich der Patient in den 30 Tagen vor seinem positiven *P. aeruginosa* Nachweis in einem der Zimmer aufgehalten hatte, in denen das Umweltisolat nachgewiesen worden war. Bei insgesamt nur 6 Patienten (11,5 %) clusterten das Patientenisolat mit dem entsprechenden Umweltisolat, so dass eine Transmission des *P. aeruginosa* Isolats aus der Umwelt auf den Patienten postuliert werden kann. Diese Zahl ist insgesamt niedriger als erwartet, wobei eine Limitation der Studie darin liegt, dass die Probenentnahmen lediglich eine Momentaufnahme darstellten und womöglich nicht alle im Wasser vorhandenen *P. aeruginosa* Stämme erfasst werden konnten. Interessanterweise waren 4 der Isolate Carbapenemase bildende *P. aeruginosa* Stämme.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass bei insgesamt 6 von 52 Patienten (11,5 %) gezeigt werden konnte, dass eine Kolonisierung der Patienten mit *P. aeruginosa* sehr wahrscheinlich auf kontaminierte Sanitäranlagen aus der Patientenumgebung zurückzuführen sind. Bei der Untersuchung von Ursachen von nosokomialen Ausbrüchen sollten die Abwassersysteme in der Patientenumgebung mit in Betracht gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

ADLER, N., BALZER, F., BLONDZIK, K., BRAUER, F., CHORUS, I., EBERT, I., FIEDLER, T., GRUMMT, T., HEIDEMEIER, J., HEIN, A., HELMECKE, M., HILLIGES, F., KIRST, I., KLASSEN, J., KONRADI, S., KRAUSE, B., KÜSTER, A., OTTO, C., PIRNTKE, U., ROSKOSCH, A., SCHÖNFELD, J., SELINKA, H.-C., SZEWZYK, R., WESTPHAL-SETTELE, K. & STRAFF, W. 2018. Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. *Umweltbundesamt Referat PB 3*, 44.

ANTIPOV, D., HARTWICK, N., SHEN, M., RAIKO, M., LAPIDUS, A. & PEVZNER, P. A. 2016. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, 32, 3380-3387.

BALLOUX, F., BRØNSTAD BRYNILDSRUD, O., VAN DORP, L., SHAW, L. P., CHEN, H., HARRIS, K. A., WANG, H. & ELDHOLM, V. 2018. From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. *Trends in microbiology*, 26, 1035-1048.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., LESIN, V. M., NIKOLENKO, S. I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A. D., PYSHKIN, A. V., SIROTKIN, A. V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M. A. & PEVZNER, P. A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19, 455-77.

BELÉN, A., PAVÓN, I. & MAIDEN, M. C. J. 2009. Multilocus Sequence Typing. *Methods Mol Biol*, 551, 129-40.

BENTLEY, D. R., BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H. P., SMITH, G. P., MILTON, J., BROWN, C. G., HALL, K. P., EVERS, D. J., BARNES, C. L., BIGNELL, H. R., BOUTELL, J. M., BRYANT, J., CARTER, R. J., KEIRA CHEETHAM, R., COX, A. J., ELLIS, D. J., FLATBUSH, M. R., GORMLEY, N. A., HUMPHRAY, S. J., IRVING, L. J., KARBELASHVILI, M. S., KIRK, S. M., LI, H., LIU, X., MAISINGER, K. S., MURRAY, L. J., OBRADOVIC, B., OST, T., PARKINSON, M. L., PRATT, M. R., RASOLONJATOVO, I. M., REED, M. T., RIGATTI, R., RODIGHIERO, C., ROSS, M. T., SABOT, A., SANKAR, S. V., SCALLY, A., SCHROTH, G. P., SMITH, M. E., SMITH, V. P., SPIRIDOU, A., TORRANCE, P. E., TZONEV, S. S., VERMAAS, E. H., WALTER, K., WU, X., ZHANG, L., ALAM, M. D., ANASTASI, C., ANIEBO, I. C., BAILEY, D. M., BANCARZ, I. R., BANERJEE, S., BARBOUR, S. G., BAYBAYAN, P. A., BENOIT, V. A., BENSON, K. F., BEVIS, C., BLACK, P. J., BOODHUN, A., BRENNAN, J. S., BRIDGHAM, J. A., BROWN, R. C., BROWN, A. A., BUERMANN, D. H., BUNDU, A. A., BURROWS, J. C., CARTER, N. P., CASTILLO, N., CHIARA, E. C. M., CHANG, S., NEIL COOLEY, R., CRAKE, N. R., DADA, O. O., DIAKOU MAKOS, K. D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B., EARNSHAW, D. J., EGBUJOR, U. C., ELMORE, D. W., ETCHIN, S. S., EWAN, M. R., FEDURCO, M., FRASER, L. J., FUENTES FAJARDO, K. V., SCOTT FUREY, W., GEORGE, D., GIETZEN, K. J., GODDARD, C. P., GOLDA, G. S., GRANIERI, P. A., GREEN, D. E., GUSTAFSON, D. L., HANSEN, N. F., HARNISH, K., HAUDENSCHILD, C. D.,

- HEYER, N. I., HIMS, M. M., HO, J. T., HORGAN, A. M., et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-9.
- BESSER, J., CARLETON, H. A., GERNER-SMIDT, P., LINDSEY, R. L. & TREES, E. 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect*, 24, 335-341.
- BIOMÉRIEUX 2009. Diversilab: Analysis Guide (For Software Version 3.4). *bioMérieux, Inc. Box 15969 Durham, North Carolina 27704-0969/USA*.
- BIOMÉRIEUX 2014. Diversilab Software, Analysis, and Troubleshooting User Manual. *bioMérieux, Inc. Durham, North Carolina 27712 USA*.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- BUSH, K. 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*, 32, 1085-9.
- BÉDARD, E., PRÉVOST, M. & DÉZIEL, E. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen*, 5, 937-956.
- CAMACHO, C., COULOURIS, G., AVAGYAN, V., MA, N., PAPADOPOULOS, J., BEALER, K. & MADDEN, T. L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421.
- CASTANHEIRA, M., DESHPANDE, L. M., COSTELLO, A., DAVIES, T. A. & JONES, R. N. 2014. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother*, 69, 1804-14.
- CHAISSON, M. J. P., WILSON, R. K. & EICHLER, E. E. 2015. Genetic variation and the de novo assembly of human genomes. *Nature Reviews Genetics*, 16, 627.
- COHEN, R., BABUSHKIN, F., COHEN, S., AFRAIMOV, M., SHAPIRO, M., UDA, M., KHABRA, E., ADLER, A., BEN AMI, R. & PAIKIN, S. 2017. A prospective survey of *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection in the intensive care unit. *Antimicrobial resistance and infection control*, 6, 7-7.
- CORNAGLIA, G., GIAMARELLOU, H. & ROSSOLINI, G. M. 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*, 11, 381-93.
- DAVIES, J. & DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 417-33.
- DEASY, E. C., MOLONEY, E. M., BOYLE, M. A., SWAN, J. S., GEOGHEGAN, D. A., BRENNAN, G. I., FLEMING, T. E., O'DONNELL, M. J. & COLEMAN, D. C. 2018. Minimizing microbial contamination risk simultaneously from multiple hospital washbasins by automated cleaning and disinfection of U-bends with electrochemically activated solutions. *J Hosp Infect*, 100, e98-e104.

DOMINGUEZ DEL ANGEL, V., HJERDE, E., STERCK, L., CAPELLA-GUTIERREZ, S., NOTREDAME, C., VINNERE PETTERSSON, O., AMSELEM, J., BOURI, L., BOCS, S., KLOPP, C., GIBRAT, J. F., VLASOVA, A., LESKOSEK, B. L., SOLER, L., BINZER-PANCHAL, M. & LANTZ, H. 2018. Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Res*, 7.

EDELSTEIN, M. V., SKLEENOVA, E. N., SHEVCHENKO, O. V., D'SOUZA, J. W., TAPALSKI, D. V., AZIZOV, I. S., SUKHORUKOVA, M. V., PAVLUKOV, R. A., KOZLOV, R. S., TOLEMAN, M. A. & WALSH, T. R. 2013. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*, 13, 867-876.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION (KRINKO) BEIM ROBERT KOCH-INSTITUT 2010. Anforderungen an die Hygiene bei der medizinischen Versorgung von immunsupprimierten Patienten. *Bundesgesundheitsbl* 2010, 53, 357-388.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION (KRINKO) BEIM ROBERT KOCH-INSTITUT 2012. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung von multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsbl* 2012, *Springer-Verlag*, 55, 1311-1354.

EMPFEHLUNG DER KOMMISSION FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTIONSPRÄVENTION (KRINKO) BEIM ROBERT KOCH-INSTITUT 2019. KRINKO: Ergänzung zur Empfehlung der KRINKO „Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gram-negativen Stäbchen“ (2012) im Zusammenhang mit der von EUCAST neu definierten Kategorie „I“ bei der Antibiotika-Resistenzbestimmung: Konsequenzen für die Definition von MRGN. *Epidemiologisches Bulletin* 9, 82-83.

EMPFEHLUNG DES UMWELTBUNDESAMTES 2017. Empfehlung zu erforderlichen Untersuchungen auf *Pseudomonas aeruginosa*, zur Risikoeinschätzung und zu Maßnahmen beim Nachweis im Trinkwasser. *Bundesgesundheitsbl*, 60, 1180-1183.

EMPFEHLUNG DES UMWELTBUNDESAMTES NACH ANHÖRUNG DER TRINKWASSERKOMMISSION DES UMWELTBUNDESAMTES 2002. Empfehlung der Trinkwasserkommission zur Risikoeinschätzung, zum Vorkommen und zu Maßnahmen beim Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Trinkwassersystemen. *Bundesgesundheitsbl*, 45:, 187-188.

ENGLER, K., MÜHLEMANN, K., GARZONI, C., PFAHLER, H., GEISER, T. & VON GARNIER, C. 2012. Colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance patterns in COPD patients. *Swiss Med Wkly*, 142, w13509.

ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7, 482-487.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, ECDC 2013. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012. *Stockholm: ECDC*.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, ECDC 2016. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. *Stockholm: ECDC*.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, ECDC 2017. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). *Stockholm: ECDC*.

EXNER, M., SCHMITHAUSEN, R., SCHREIBER, C., BIERBAUM, G., PARCINA, M., ENGELHART, S., KISTEMANN, T., SIB, E., WALGER, P. & THOMAS, S. 2018. Zum Vorkommen und zur vorläufigen hygienisch-medizinischen Bewertung von Antibiotika-resistenten Bakterien mit humanmedizinischer Bedeutung in Gewässern, Abwässern, Badegewässern sowie zu möglichen Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. *Hygiene & Medizin*, 43, D46-D54.

FAITA, F., VECOLI, C., FOFFA, I. & ANDREASSI, M. G. 2012. Next generation sequencing in cardiovascular diseases. *World Journal of Cardiology*, 4, 288-295.

FERNANDEZ-OLMOS, A., GARCIA-CASTILLO, M., MAIZ, L., LAMAS, A., BAQUERO, F. & CANTON, R. 2012. In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*, 40, 173-6.

FOCA, M., JAKOB, K., WHITTIER, S., DELLA LATTA, P., FACTOR, S., RUBENSTEIN, D. & SAIMAN, L. 2000. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. *N Engl J Med*, 343, 695-700.

FURIGA, A., LAJOIE, B., EL HAGE, S., BAZIARD, G. & ROQUES, C. 2016. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum-Sensing Inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60, 1676-1686.

GARVEY, M. I., BRADLEY, C. W., TRACEY, J. & OPPENHEIM, B. 2016. Continued transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a wash hand basin tap in a critical care unit. *J Hosp Infect*, 94, 8-12.

GAYNES, R. & EDWARDS, J. R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*, 41, 848-54.

GOULD, I. M. & WISE, R. 1985. *Pseudomonas aeruginosa*: clinical manifestations and management. *Lancet*, 2, 1224-7.

GWINN, M., MACCANNELL, D. & ARMSTRONG, G. L. 2019. Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens. *JAMA*, 321, 893-894.

- GÓMEZ-ZORRILLA, S., CAMOEZ, M., TUBAU, F., CAÑIZARES, R., PERICHE, E., DOMINGUEZ, M. A., ARIZA, J. & PEÑA, C. 2015. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59, 5213-5219.
- HANCOCK, R. E. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*, 5, 37-42.
- HANCOCK, R. E. & SPEERT, D. P. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*, 3, 247-255.
- HANCOCK, R. E. W. 1998. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27, S93-S99.
- HARRIS, S. R., FEIL, E. J., HOLDEN, M. T., QUAIL, M. A., NICKERSON, E. K., CHANTRATITA, N., GARDETE, S., TAVARES, A., DAY, N., LINDSAY, J. A., EDGEWORTH, J. D., DE LENCASTRE, H., PARKHILL, J., PEACOCK, S. J. & BENTLEY, S. D. 2010. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*, 327, 469-74.
- HEALY, M., HUONG, J., BITTNER, T., LISING, M., FRYE, S., RAZA, S., SCHROCK, R., MANRY, J., RENWICK, A., NIETO, R., WOODS, C., VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J. R. 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol*, 43, 199-207.
- HENGZHUANG, W., WU, H., CIOFU, O., SONG, Z. & HØIBY, N. 2011. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 4469-4474.
- HIETT, K. L. & SEAL, B. S. 2009. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Methods Mol Biol*, 551, 49-58.
- HOANG, S., GEORGET, A., ASSELINEAU, J., VENIER, A. G., LEROYER, C., ROGUES, A. M. & THIÉBAUT, R. 2018. Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. *PLoS One*, 13, e0193300.
- IBARZ PAVÓN, A. B. & MAIDEN, M. C. J. 2009. Multilocus Sequence Typing. In: CAUGANT, D. A. (ed.) *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- ILLUMINA 2010. Illumina Sequencing Technology, Technology Guide. *Illumina, Inc. San Diego, CA 92121 USA Pub. No. 770-2007-002*.

ILLUMINA 2017. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology, Highest data accuracy, simple workflow, and a broad range of applications user Manual. *Illumina, Inc. in the U.S. and/or other countries Pub. No. 770-2012-008-B.*

ILLUMINA 2019. bcl2fastq Conversion Software v2.20 Software Guide. *Illumina, Inc. San Diego , 921222 USA Document # 15051736 v03.*

INFEKTIONSSCHUTZGESETZ 2000. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. Juli 2017 (BGBl. I S. 2615) geändert worden ist. *Bundesgesetzblatt.*

JOHNSON, J. K., SMITH, G., LEE, M. S., VENEZIA, R. A., STINE, O. C., NATARO, J. P., HSIAO, W. & HARRIS, A. D. 2009. The role of patient-to-patient transmission in the acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit. *J Infect Dis*, 200, 900-5.

JUDD, W. R., RATLIFF, P. D., HICKSON, R. P., STEPHENS, D. M. & KENNEDY, C. A. 2016. Clinical and economic impact of meropenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients. *Am J Infect Control*, 44, 1275-1279.

KANAMORI, H., WEBER, D. J. & RUTALA, W. A. 2016. Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies. *Clin Infect Dis*, 62, 1423-35.

KANG, C. I., KIM, S. H., KIM, H. B., PARK, S. W., CHOE, Y. J., OH, M. D., KIM, E. C. & CHOE, K. W. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis*, 37, 745-51.

KHORVASH, F., YAZDANI, M., SHABANI, S. & SOUDI, A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa*-producing Metallo- β -lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the Clinical Isolates of Intensive Care Units, a University Hospital in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res*, 6, 147.

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. & STOESSER, N. 2017. The Hospital Water Environment as a Reservoir for Carbapenem-Resistant Organisms Causing Hospital-Acquired Infections-A Systematic Review of the Literature. *Clin Infect Dis*, 64, 1435-1444.

KLEINHEINZ, K. A., JOENSEN, K. G. & LARSEN, M. V. 2014. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*, 4, e27943.

KOMMEDAL, Ø., WILHELMSSEN, M. T., SKREDE, S., MEISAL, R., JAKOVLJEV, A., GAUSTAD, P., HERMANSEN, N. O., VIK-MO, E., SOLHEIM, O., AMBUR, O. H., SÆBØ, Ø., HØSTMÆLINGEN, C. T. & HELLAND, C. 2014. Massive parallel

sequencing provides new perspectives on bacterial brain abscesses. *Journal of clinical microbiology*, 52, 1990-1997.

KOSER, C. U., ELLINGTON, M. J., CARTWRIGHT, E. J., GILLESPIE, S. H., BROWN, N. M., FARRINGTON, M., HOLDEN, M. T., DOUGAN, G., BENTLEY, S. D., PARKHILL, J. & PEACOCK, S. J. 2012. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog*, 8, e1002824.

KOTSANAS, D., WIJESOORIYA, W. R. P. L. I., KORMAN, T. M., GILLESPIE, E. E., WRIGHT, L., SNOOK, K., WILLIAMS, N., BELL, J. M., LI, H. Y. & STUART, R. L. 2013. "Down the drain": carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *Medical Journal of Australia*, 198, 267-269.

LABAER, J., QIU, Q., ANUMANTHAN, A., MAR, W., ZUO, D., MURTHY, T. V., TAYCHER, H., HALLECK, A., HAINSWORTH, E., LORY, S. & BRIZUELA, L. 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. *Genome Res*, 14, 2190-200.

LAMBERT, P. A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, 22-26.

LEITNER, E., ZARFEL, G., LUXNER, J., HERZOG, K., PEKARD-AMENITSCH, S., HOENIGL, M., VALENTIN, T., FEIERL, G., GRISOLD, A. J., HÖGENAUER, C., SILL, H., KRAUSE, R. & ZOLLNER-SCHWETZ, I. 2015. Contaminated Handwashing Sinks as the Source of a Clonal Outbreak of KPC-2-Producing on a Hematology Ward. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 714-716.

LEWIS, T., LOMAN, N. J., BINGLE, L., JUMAA, P., WEINSTOCK, G. M., MORTIBOY, D. & PALLEEN, M. J. 2010. High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. *J Hosp Infect*, 75, 37-41.

LIESE, J., SCHÜLE, L., OBERHETTINGER, P., TSCHÖRNER, L., NGUYEN, T., DÖRFEL, D., VOGEL, W., MARSCHAL, M., AUTENRIETH, I., WILLMANN, M. & PETER, S. 2019. Expansion of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in an Academic Tertiary Hospital in Southwest Germany: a Large-Scale Whole-Genome-Based Outbreak Investigation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63, e01978-18.

LIU, Q., LI, X., LI, W., DU, X., HE, J. Q., TAO, C. & FENG, Y. 2015. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 11715.

MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J. E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D. A., FEAVERS, I. M., ACHTMAN, M. & SPRATT, B. G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3140-5.

MARDIS, E. R. 2008a. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402.

- MARDIS, E. R. 2008b. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24, 133-141.
- MARKOU, P. & APIDIANAKIS, Y. 2014. Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 115-115.
- METZKER, M. L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46.
- MIGIYAMA, Y., YANAGIHARA, K., KAKU, N., HARADA, Y., YAMADA, K., NAGAOKA, K., MORINAGA, Y., AKAMATSU, N., MATSUDA, J., IZUMIKAWA, K., KOHROGI, H. & KOHNO, S. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia among Immunocompetent and Immunocompromised Patients: Relation to Initial Antibiotic Therapy and Survival. *Jpn J Infect Dis*, 69, 91-6.
- MILLER, J. R., KOREN, S. & SUTTON, G. 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95, 315-27.
- MOLONEY, E. M., DEASY, E. C., SWAN, J. S., BRENNAN, G. I., O'DONNELL, M. J. & COLEMAN, D. C. 2020. Whole-genome sequencing identifies highly related *Pseudomonas aeruginosa* strains in multiple washbasin U-bends at several locations in one hospital: evidence for trafficking of potential pathogens via wastewater pipes. *J Hosp Infect*, 104, 484-491.
- MOMBA, M., KFIR, R., VENTER, S. & CLOETE, T. 2000. Overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA*, vol. 26 (1), pp59-66.
- MORADALI, M. F., GHODS, S. & REHM, B. H. A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39-39.
- MORITZ, M. M., FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health*, 213, 190-7.
- MOROZOVA, O. & MARRA, M. A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92, 255-64.
- MOTRO, Y. & MORAN-GILAD, J. 2017. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomolecular detection and quantification*, 14, 1-6.
- NATIONALES REFERENZZENTRUM FÜR SURVEILLANCE VON NOSOKOMIALEN INFEKTIONEN, ROBERT KOCH-INSTITUT 2017. Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS-Definitionen). *Robert Koch-Institut, Berlin*.
- NOLL, I., ECKMANN, T. & SIN, M. A. 2017. Antibiotikaresistenz: Vergleich mit europäischer Daten. *Dtsch Arztebl International*, 114, 2209-.

- OLSEN, I. 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 877-886.
- OZER, E. A., ALLEN, J. P. & HAUSER, A. R. 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*, 15, 737.
- PARKINS, M. D., GREGSON, D. B., PITOUT, J. D., ROSS, T. & LAUPLAND, K. B. 2010. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection*, 38, 25-32.
- PECORA, N. D., LI, N., ALLARD, M., LI, C., ALBANO, E., DELANEY, M., DUBOIS, A., ONDERDONK, A. B. & BRY, L. 2015. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System. *MBio*, 6, e01030.
- PETER, S., BOSIO, M., GROSS, C., BEZDAN, D., GUTIERREZ, J., OBERHETTINGER, P., LIESE, J., VOGEL, W., DÖRFEL, D., BERGER, L., MARSCHAL, M., WILLMANN, M., GUT, I., GUT, M., AUTENRIETH, I. & OSSOWSKI, S. 2020. Tracking of Antibiotic Resistance Transfer and Rapid Plasmid Evolution in a Hospital Setting by Nanopore Sequencing. *mSphere*, 5.
- PETER, S., LACHER, A., MARSCHAL, M., HOLZL, F., BUHL, M., AUTENRIETH, I., KAASE, M. & WILLMANN, M. 2014. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo-beta-lactamases (MBLs) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33, 1133-41.
- PETER, S., OBERHETTINGER, P., SCHUELE, L., DINKELACKER, A., VOGEL, W., DORFEL, D., BEZDAN, D., OSSOWSKI, S., MARSCHAL, M., LIESE, J. & WILLMANN, M. 2017. Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*, 18, 859.
- PFENNIGWERTH N. 2019. Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger 2018. *Epid Bull*, 31:289-294.
- PFENNIGWERTH N. 2020. Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger 2019. *Epid Bull*, 26: 3-10.
- PIRZADIAN, J., HARTEVELD, S. P., RAMDUTT, S. N., VAN WAMEL, W. J. B., KLAASSEN, C. H. W., VOS, M. C. & SEVERIN, J. A. 2020. Novel use of culturomics to identify the microbiota in hospital sink drains with and without persistent VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 10, 17052.
- QUAINOO, S., COOLEN, J. P. M., VAN HIJUM, S. A. F. T., HUYNEN, M. A., MELCHERS, W. J. G., VAN SCHAİK, W. & WERTHEIM, H. F. L. 2017. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical microbiology reviews*, 30, 1015-1063.
- QUICK, J., LOMAN, N. J., DURAFFOUR, S., SIMPSON, J. T., SEVERI, E., COWLEY, L., BORE, J. A., KOUNDOUNO, R., DUDAS, G., MIKHAIL, A.,

OUÉDRAOGO, N., AFROUGH, B., BAH, A., BAUM, J. H., BECKER-ZIAJA, B., BOETTCHER, J. P., CABEZA-CABRERIZO, M., CAMINO-SANCHEZ, A., CARTER, L. L., DOERRBECKER, J., ENKIRCH, T., DORIVAL, I. G. G., HETZELT, N., HINZMANN, J., HOLM, T., KAFETZOPOULOU, L. E., KOROPOGUI, M., KOSGEY, A., KUISMA, E., LOGUE, C. H., MAZZARELLI, A., MEISEL, S., MERTENS, M., MICHEL, J., NGABO, D., NITZSCHE, K., PALLASH, E., PATRONO, L. V., PORTMANN, J., REPITS, J. G., RICKETT, N. Y., SACHSE, A., SINGETHAN, K., VITORIANO, I., YEMANABERHAN, R. L., ZEKENG, E. G., TRINA, R., BELLO, A., SALL, A. A., FAYE, O., FAYE, O., MAGASSOUBA, N., WILLIAMS, C. V., AMBURGEY, V., WINONA, L., DAVIS, E., GERLACH, J., WASHINGTON, F., MONTEIL, V., JOURDAIN, M., BERERD, M., CAMARA, A., SOMLARE, H., CAMARA, A., GERARD, M., BADO, G., BAILLET, B., DELAUNE, D., NEBIE, K. Y., DIARRA, A., SAVANE, Y., PALLAWO, R. B., GUTIERREZ, G. J., MILHANO, N., ROGER, I., WILLIAMS, C. J., YATTARA, F., LEWANDOWSKI, K., TAYLOR, J., RACHWAL, P., TURNER, D., POLLAKIS, G., HISCOX, J. A., MATTHEWS, D. A., O'SHEA, M. K., JOHNSTON, A. M., WILSON, D., HUTLEY, E., SMIT, E., DI CARO, A., WOELFEL, R., STOECKER, K., FLEISCHMANN, E., GABRIEL, M., WELLER, S. A., KOIVOGUI, L., DIALLO, B., KEITA, S., RAMBAUT, A., FORMENTY, P., et al. 2016. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530, 228-232.

REUTER, S., SIGGE, A., WIEDECK, H. & TRAUTMANN, M. 2002. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets*. *Critical Care Medicine*, 30, 2222-2228.

ROBERT KOCH-INSTITUT 2007. Zur Surveillance der Antibiotikaresistenz in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 44, 405-412.

ROSENTHAL, V. D., MAKI, D. G., JAMULITRAT, S., MEDEIROS, E. A., TODI, S. K., GOMEZ, D. Y., LEBLEBICIOGLU, H., ABU KHADER, I., MIRANDA NOVALES, M. G., BERBA, R., RAMIREZ WONG, F. M., BARKAT, A., PINO, O. R., DUENAS, L., MITREV, Z., BIJIE, H., GURSKIS, V., KANJ, S. S., MAPP, T., HIDALGO, R. F., BEN JABALLAH, N., RAKA, L., GIKAS, A., AHMED, A., THULE, T. A. & GUZMAN SIRITT, M. E. 2010. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. *Am J Infect Control*, 38, 95-104.e2.

RUPPITSCH, W. 2016. Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation / Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, . 67(4), 199-224.

SAGRIPANTI, J. L. & BONIFACINO, A. 2000. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. *J AOAC Int*, 83, 1415-22.

SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-8.

- SCHELSTRAETE, P., HAERYNCK, F., VAN DAELE, S., DESEYNE, S. & DE BAETS, F. 2013. Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12, 1-8.
- SHUTT, C. K., POUNDER, J. I., PAGE, S. R., SCHAECHER, B. J. & WOODS, G. L. 2005. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 43, 1187-92.
- SNITKIN, E. S., ZELAZNY, A. M., THOMAS, P. J., STOCK, F., HENDERSON, D. K., PALMORE, T. N. & SEGRE, J. A. 2012. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*, 4, 148ra116.
- STJARNE ASPELUND, A., SJOSTROM, K., OLSSON LILJEQUIST, B., MORGELIN, M., MELANDER, E. & PAHLMAN, L. I. 2016. Acetic acid as a decontamination method for sink drains in a nosocomial outbreak of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*, 94, 13-20.
- SULLIVAN, C. B., DIGGLE, M. A. & CLARKE, S. C. 2005. Multilocus sequence typing. *Molecular biotechnology*, 29, 245.
- SWAN, J. S., DEASY, E. C., BOYLE, M. A., RUSSELL, R. J., O'DONNELL, M. J. & COLEMAN, D. C. 2016. Elimination of biofilm and microbial contamination reservoirs in hospital washbasin U-bends by automated cleaning and disinfection with electrochemically activated solutions. *J Hosp Infect*, 94, 169-74.
- TRAUTMANN, M., BAUER, C., SCHUMANN, C., HAHN, P., HOHER, M., HALLER, M. & LEPPER, P. M. 2006. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 209, 325-31.
- TRAUTMANN, M., HALDER, S., LEPPER, P. M. & EXNER, M. 2009. Reservoir von *Pseudomonas aeruginosa* auf der Intensivstation. *Bundesgesundheitsbl*, 52, 339-344.
- TRINKWV 2001. Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die durch Artikel 4 Absatz 21 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist. *Bundesgesetzblatt*.
- TUMBARELLO, M., REPETTO, E., TRECARICHI, E. M., BERNARDINI, C., DE PASCALE, G., PARISINI, A., ROSSI, M., MOLINARI, M. P., SPANU, T., VISCOLI, C., CAUDA, R. & BASSETTI, M. 2011. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiol Infect*, 139, 1740-9.
- URWIN, R. & MAIDEN, M. C. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*, 11, 479-87.
- VAN DIJK, E. L., AUGER, H., JASZCZYSZYN, Y. & THERMES, C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30, 418-426.

- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19, 6823-31.
- WALKER, J. & MOORE, G. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *Journal of Hospital Infection*, 89, 324-327.
- WENDEL, A. F., KOLBE-BUSCH, S., RESSINA, S., SCHULZE-RÖBBECKE, R., KINDGEN-MILLES, D., LORENZ, C., PFEFFER, K. & MACKENZIE, C. R. 2015. Detection and termination of an extended low-frequency hospital outbreak of GIM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Germany. *American Journal of Infection Control*, 43, 635-639.
- WETERINGS, V., BOSCH, T., WITTEVEEN, S., LANDMAN, F., SCHOULS, L. & KLUYTMANS, J. 2017. Next-Generation Sequence Analysis Reveals Transfer of Methicillin Resistance to a Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strain That Subsequently Caused a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak: a Descriptive Study. *J Clin Microbiol*, 55, 2808-2816.
- WIELER, L. H. & BROICH, K. 2018. Antibiotikaresistenzen: Große Herausforderungen erfordern komplexe Lösungen. *Bundesgesundheitsbl*, 61, 495-498.
- WILLMANN, M., BEZDAN, D., ZAPATA, L., SUSAK, H., VOGEL, W., SCHROPPEL, K., LIESE, J., WEIDENMAIER, C., AUTENRIETH, I. B., OSSOWSKI, S. & PETER, S. 2015a. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J Antimicrob Chemother*, 70, 1322-30.
- WILLMANN, M., EL-HADIDI, M., HUSON, D. H., SCHUTZ, M., WEIDENMAIER, C., AUTENRIETH, I. B. & PETER, S. 2015b. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 7335-45.
- WILLMANN, M., KUEBART, I., MARSCHAL, M., SCHROPPEL, K., VOGEL, W., FLESCH, I., MARKERT, U., AUTENRIETH, I. B., HOLZL, F. & PETER, S. 2013. Effect of metallo-beta-lactamase production and multidrug resistance on clinical outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*, 13, 515.
- XUE, Z., HESSLER, C. M., PANMANEE, W., HASSETT, D. J. & SEO, Y. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiol Ecol*, 83, 101-11.
- ZAFER, M. M., AL-AGAMY, M. H., EL-MAHALLAWY, H. A., AMIN, M. A. & EL DIN ASHOUR, S. 2015. Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. *BMC Infectious Diseases*, 15, 122.

ZANKARI, E., HASMAN, H., COSENTINO, S., VESTERGAARD, M., RASMUSSEN, S., LUND, O., AARESTRUP, F. M. & LARSEN, M. V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 67, 2640-4.

ZHANEL, G. G., SIMOR, A. E., VERCAIGNE, L., MANDELL, L. & THE CANADIAN CARBAPENEM DISCUSSION, G. 1998. Imipenem and meropenem: Comparison of in vitro activity, pharmacokinetics, clinical trials and adverse effects. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 9, 215-228.

ZHANG, J., CHIODINI, R., BADR, A. & ZHANG, G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*, 38, 95-109.

ZHOU, Z., HU, B., GAO, X., BAO, R., CHEN, M. & LI, H. 2016. Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. *J Infect Chemother*, 22, 450-5.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinischen Mikrobiologie und Hygiene an der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Frau Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter, Oberärztin und Herrn Dr. med. Jan Liese, Oberarzt.

Die in der Arbeit verwendeten Daten der Resistenztestung wurden aus der Routinediagnostik übernommen, selbstständig zusammengetragen, zugeordnet und interpretiert. Die Einarbeitung in die DNA-Extraktion, die Library Präparation, sowie die Durchführung der Sequenzierung erfolgte durch Mitglieder der Arbeitsgruppe. Die Kultivierung der Stämme, die Reinheitskontrolle und DNA-Extraktion und Library Präparation wurden selbstständig durchgeführt. Die Sequenzen der Stämme wurden eigenständig generiert, wobei zur Auslastung der Geräte bei 3 der insgesamt 5 durchgeführten Sequenzierläufe Unterstützung durch Baris Bader (Mitglied der AG Peter/Liese, MTA-L) bestand.

Die Visualisierung der von mir erhobenen Daten (Abbildungen 7-12) wurden mit Hilfe von Herrn Dr. med. Jan Liese dargestellt.

Die Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter und Herrn Dr. med. Jan Liese.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter und Herrn Dr. med. Jan Liese verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Köln, den 7.01.2022

8. Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Apl. Prof. Dr. Silke Peter für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Erstellung der Arbeit bedanken. Sie war immer ansprechbar und versuchte mich immer wieder mit aufmunternden Worten zu motivieren.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Dr. Jan Liese danken, für die Erstellung des Themas und jede weitere Inspiration der Arbeit, sowie für die Betreuung und Beantwortung vieler Fragen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Baris Bader für die tolle, freundschaftliche mit sehr viel Spaß verbundene Einarbeitung in die NGS Sequenzierung und weitere Laborarbeiten. Diese wunderbare Hilfe hat zum Gelingen der praktischen Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der AG Peter/Liese für ihre ausgezeichnete Hilfe und Unterstützung im Labor.

Darüber hinaus möchte ich mich noch bei meinen wunderbaren Freunden für die unterstützende Hilfe und aufmunternden Worte während meines Studiums bedanken.

Abschließend möchte ich meiner ganzen Familie danken. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Vater und meinen Bruder für die tolle Unterstützung nicht nur während der Dissertation, sondern auch während meines Studiums.

9. Anhang

9.1. Ergebnisse Antibiotogramm der Patientenisolate

Anhang Tabelle 1 Übersicht über die Ergebnisse der phänotypischen Antibiotogramme der klinischen *P. aeruginosa* Isolate

Legende: CAZ: Ceftazidim, FEP: Cefepim, CIP: Ciprofloxacin, LVX: Levofloxacin, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, MEM: Meropenem, PIP: Piperacillin, PTZ: Piperacillin/Tazobactam, AMI: Amikacin, CO: Colistin, IMP: Imipenem R: „resistent“, S: „sensibel“, I: „intermediäre“ Stämme werden so behandelt, als wenn der Stamm resistent wäre.

Patienten	mAMI	mCAZ	mCIP	mCO	mFEP	mGEN	mLVX	mMEM	mPIP	mPTZ	mTOB
1		S	S		S	S	S	S	S	S	S
2		S	S		S	S	S	S	S	S	S
3		S	S		S	S	S	S	S	S	S
4		S	S		S	S	S	S	S	S	S
5		S	S		S	S	S	S	S	S	S
6		S	S		S	S	S	S	S	S	S
7		S	S		S	S	R	S	R	R	S
8		S	S		S	S	R	S	R	R	S
9		S	R		S	S	R	S	S	S	S
10		S	S		S	S	R	S	R	S	S

11		S	S		S	S	R	S	R	R	S
12		S	S		S	S	S	S	S	S	S
13		S	I		S	S	I	S	S	S	S
14		S	S		S	S	S	S	S	S	S
15		S	S		S	S	S	S	S	S	S
16		S	R		S	S	R	S	S	S	S
17		S	S		S	S	S	I	S	S	S
18		S	S		S	S	S	S	S	S	S
19		S	S		S	S	S	S	S	S	S
20		S	S		S	S	S	S	S	S	S
21		S	R		S	S	R	R	S	S	S
22		S	S		S	S	S	S	S	S	S
23		S	S		S	S	S	S	S	S	S
24		S	S		S	S	S	S	S	S	S
25	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
26		S	S		S	S	S	S	S	S	S

27		S	S		S	S	S	S	S	S	S
28		S	S		S	S	S	S	S	S	S
29		S	S		S	S	S	S	S	S	S
30		S	S		S	S	S	S	S	S	S
31	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
32		S	S		S	S	S	S	S	S	S
33		S	S		S	S	S	S	S	S	S
34		S	S		S	S	I	S	R	R	S
35	S	R	I	S	S	S	R	S	R	R	S
36		S	S		S	S	S	S	S	S	S
37		R	S		S	S	S	S	R	S	S
38		S	S		S	S	S	S	S	S	S
39	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
40		S	S		S	S	S	S	S	S	S
41	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
42	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R

43		S	S		S	S	S	S	S	S	S
44		S	S		S	S	S	S	S	S	S
45		S	S		S	S	S	S	S	S	S
46		S	S		S	S	I	S	S	S	S
47		S	R		S	S	R	S	S	S	S
48		S	S		S	S	S	S	S	S	S
49	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
50	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
51		S	S		S	S	S	S	S	S	S
52		S	S		S	S	S	S	S	S	S

9.2. Assembly der Patienten

Anhang Tabelle 2 Assembly der Patienten mit Sequence_count, N50 Wert und GC Gehalt

File_ID	Sequence_count	N50	% GC
37_S66_scaffolds.fasta	86	272264	66,06158469
43_S72_scaffolds.fasta	81	311860	66,26543927
44_S73_scaffolds.fasta	112	223246	66,16382069
45_S16_scaffolds.fasta	174	377775	66,04198175
47_S76_scaffolds.fasta	77	323163	66,36233551
48_S77_scaffolds.fasta	62	375003	66,27417368
42_S71_scaffolds.fasta	121	249402	65,74090884
1_S29_scaffolds.fasta	127	458011	66,01211499
2_S30_scaffolds.fasta	110	404516	66,15799481
3_S31_scaffolds.fasta	169	269170	66,16118889
4_S19_scaffolds.fasta	214	194271	65,81225315
6_S34_scaffolds.fasta	122	353578	66,3631743
7_S35_scaffolds.fasta	93	258247	66,16800624
8_S36_scaffolds.fasta	83	405937	66,29297367
9_S38_scaffolds.fasta	100	373324	66,40439011
10_S20_scaffolds.fasta	57	612500	66,07638077
11_S40_scaffolds.fasta	178	424418	66,22427717
12_S41_scaffolds.fasta	82	419279	66,06802165
13_S42_scaffolds.fasta	130	201498	66,2180836
17_S46_scaffolds.fasta	130	269294	66,08979979
19_S48_scaffolds.fasta	84	449524	66,34949858
20_S49_scaffolds.fasta	71	342517	66,07722169
22_S51_scaffolds.fasta	96	268086	66,23039739
23_S52_scaffolds.fasta	71	341409	66,40825832
26_S55_scaffolds.fasta	187	180611	66,08971834
27_S56_scaffolds.fasta	67	425868	66,28790456
28_S57_scaffolds.fasta	81	426059	66,435524
33_S62_scaffolds.fasta	115	280988	66,18457299
34_S63_scaffolds.fasta	109	269420	66,18884121
36_S65_scaffolds.fasta	81	542584	66,34846325
39_S68_scaffolds.fasta	141	276975	65,72455397
40_S69_scaffolds.fasta	88	426077	66,50307072
41_S70_scaffolds.fasta	137	269165	66,1307502
46_S31_scaffolds.fasta	74	459869	65,89038937
49_S78_scaffolds.fasta	123	268107	65,74137019
50_S79_scaffolds.fasta	117	262463	65,74202256
51_S80_scaffolds.fasta	171	309355	66,13722154
52_S81_scaffolds.fasta	67	488850	66,54698312
5_S33_scaffolds.fasta	117	217633	66,13825096
14_S43_scaffolds.fasta	145	226468	66,02446255
15_S44_scaffolds.fasta	103	350840	66,30528002
16_S45_scaffolds.fasta	90	277549	66,26175807
18_S47_scaffolds.fasta	102	397309	66,10994696

21_S50_scaffolds.fasta	98	269165	66,13925468
24_S14_scaffolds.fasta	791	449025	65,76413709
29_S58_scaffolds.fasta	94	291513	66,30544916
30_S59_scaffolds.fasta	93	378160	66,39854624
31_S15_scaffolds.fasta	172	269440	66,19513337
32_S61_scaffolds.fasta	70	421050	65,95396636
35_S64_scaffolds.fasta	115	352627	66,44708687
25_S54_scaffolds.fasta	189	198324	66,06413844
38_S64_scaffolds.fasta	653	417864	65,8450404
Stats_Line	mean_sequence_count	mean_N50	mean_GC
means:	135	338108,6538	66,15246378

9.3. Assembly der Umweltstämme

Anhang Tabelle 3 Assembly der Umweltstämme mit Sequence_count, N50 Wert und GC Gehalt

File_ID	Sequence_count	N50	%GC
UU218_5_S16_scaffolds.fasta	37	799026	66,6105734
UU339_5_S91_scaffolds.fasta	83	391507	65,95618219
UU463_5_S93_scaffolds.fasta	41	626883	66,61532773
UU604_4_S95_scaffolds.fasta	92	257510	66,06671453
UU732_8_S96_scaffolds.fasta	63	282667	66,38811975
UU750_4_S1_scaffolds.fasta	126	252793	66,04689442
UU787_10_S2_scaffolds.fasta	134	187669	66,16748033
UU793_14_S4_scaffolds.fasta	103	391119	66,243836
UU822_10_S6_scaffolds.fasta	157	244588	66,00288129
UU823_10_S7_scaffolds.fasta	207	187669	66,12912109
UU825_14_S8_scaffolds.fasta	134	393199	66,25128576
UU833_11_S10_scaffolds.fasta	155	245942	66,11278725
UU1582_37_30_S86_scaffolds.fasta	161	376700	65,99014505
UU879_9_S14_scaffolds.fasta	162	397576	65,89801605
UU881x_9_S30_scaffolds.fasta	170	251043	65,0356879
UU882_9_S16_scaffolds.fasta	153	243862	65,47506737
UU914_12_S17_scaffolds.fasta	110	464107	66,2077516
UU916_9_S18_scaffolds.fasta	116	377452	66,15546161
UU954_10_S21_scaffolds.fasta	140	207001	66,18785451
UU958_12_S22_scaffolds.fasta	131	392477	66,22152995
UU961_9_S23_scaffolds.fasta	134	233132	66,11910303
UU985_9_S24_scaffolds.fasta	105	400637	65,88429747
UU986_9_S25_scaffolds.fasta	87	419738	66,06437015
UU988_9_S26_scaffolds.fasta	161	241845	65,47084458
UU1004_9_S2_scaffolds.fasta	83	458105	65,99124915
UU1005_9_S3_scaffolds.fasta	135	210660	65,49063614
UU1006_12_S49_scaffolds.fasta	113	378637	66,21540782
UU1044_9_S6_scaffolds.fasta	103	458111	66,07338147
UU1079_9_S9_scaffolds.fasta	121	210660	66,04172485

UU1231_9_S36_scaffolds.fasta	119	341437	66,30176446
UU1080_12_S10_scaffolds.fasta	161	210660	66,00566638
UU1081_12_S11_scaffolds.fasta	114	388879	66,2165894
UU1082_9_S12_scaffolds.fasta	88	458111	66,06851411
UU1083_9_S13_scaffolds.fasta	88	386139	65,87365517
UU1106_19_S50_scaffolds.fasta	120	245942	66,1152611
UU1107_14_S17_scaffolds.fasta	87	429151	66,33557444
UU1111_25_S18_scaffolds.fasta	86	418781	66,13413129
UU1114_12_S19_scaffolds.fasta	122	368682	66,21760583
UU1117_11_S20_scaffolds.fasta	192	435573	65,94643698
UU1120x_11_S21_scaffolds.fasta	248	284724	65,97576881
UU1121_11_S22_scaffolds.fasta	118	210660	66,09470004
UU1143_22_S24_scaffolds.fasta	115	233375	65,98807595
UU1141_S23_scaffolds.fasta	101	245942	66,1220433
UU1149_25_S25_scaffolds.fasta	73	365276	66,14257034
UU1150_9_S26_scaffolds.fasta	110	383148	65,92711464
UU1154_12_S28_scaffolds.fasta	106	462030	66,21206241
UU1158x_9_16_S22_scaffolds.fasta	163	260518	65,04883068
UU1222_19_S31_scaffolds.fasta	95	243863	66,11754707
UU1223_22_S32_scaffolds.fasta	118	248094	65,96003322
UU1227_9_S33_scaffolds.fasta	111	241839	66,10618472
UU1228_9_S34_scaffolds.fasta	83	376670	66,00611782
UU1075_20_S7_scaffolds.fasta	121	234127	66,06757019
UU1232_11_S37_scaffolds.fasta	103	385890	65,94686801
UU1276_20_25_S39_scaffolds.fasta	136	249360	65,71488945
UU1280_12_S42_scaffolds.fasta	111	378394	66,21564339
UU1281_15_S43_scaffolds.fasta	104	341439	66,19968095
UU1283_21_S44_scaffolds.fasta	96	242370	66,14502903
UU1286_19_S45_scaffolds.fasta	116	242330	66,12329238
UU1287_24_S46_scaffolds.fasta	113	241940	66,05623918
UU1288_24_S47_scaffolds.fasta	77	378112	65,96034944
UU1316_19_S16_scaffolds.fasta	246	239188	65,56201704
UU1317_14_S4_scaffolds.fasta	72	412497	66,04995735
UU1326_30_S52_scaffolds.fasta	78	304883	66,4753493
UU1330_15_S54_scaffolds.fasta	101	341439	66,19829604
UU1363_31_S55_scaffolds.fasta	147	269440	66,13187381
UU1364_19_S56_scaffolds.fasta	126	241839	66,11838282
UU1365_19_S57_scaffolds.fasta	112	284739	66,12574862
UU1368_24_S58_scaffolds.fasta	106	378021	66,04937027
UU1371_30_S59_scaffolds.fasta	157	241845	65,49192144
UU1373_29_S61_scaffolds.fasta	104	388374	66,21508662
UU1443_31_S62_scaffolds.fasta	81	410347	66,37820502
UU1449_20_S63_scaffolds.fasta	108	185437	66,22101595
UU1451_25_S64_scaffolds.fasta	119	223666	66,03260269
UU1453_16_S65_scaffolds.fasta	97	234426	66,29162732
UU1456_31_S66_scaffolds.fasta	99	338539	66,01546976
UU1474_27_S67_scaffolds.fasta	95	394979	66,21043279
UU1477_29_S68_scaffolds.fasta	122	359967	66,11742087
UU1489_43_16_S69_scaffolds.fasta	83	391034	66,2529694

UU1512_31_S70_scaffolds.fasta	133	268856	65,94129741
UU1521_27_S73_scaffolds.fasta	142	241845	65,47777991
UU1516_28_20_25_S72_scaffolds.fasta	88	350418	66,38162863
UU1525_29_S75_scaffolds.fasta	109	423866	66,24366854
UU1526_34_S76_scaffolds.fasta	102	392132	66,21600699
UU1530_47_S77_scaffolds.fasta	143	241845	65,47596007
UU1532_47_S78_scaffolds.fasta	63	421183	66,3837065
UU1533_43_S79_scaffolds.fasta	100	413556	66,01590338
UU1567_35_S80_scaffolds.fasta	80	374962	66,08142415
UU1572_24_S81_scaffolds.fasta	89	303129	66,07919286
UU1573_39_S82_scaffolds.fasta	128	207380	66,19207123
UU1578_25_S83_scaffolds.fasta	119	232472	66,03304054
UU1580_27_S84_scaffolds.fasta	106	341437	66,24341364
UU1581x_27_S11_scaffolds.fasta	126	284739	66,10147288
UU1586_29_S89_scaffolds.fasta	111	349403	66,21514264
UU1590_47_S90_scaffolds.fasta	58	424418	66,25490734
UU1591_43_S91_scaffolds.fasta	161	241845	65,47958681
UU1610_35_S92_scaffolds.fasta	74	410013	66,38801415
UU1621_27_S95_scaffolds.fasta	118	378632	66,26455288
UU1625_29_S2_scaffolds.fasta	100	394206	66,21105933
UU1629_38_S5_scaffolds.fasta	99	378237	66,25816998
UU1626_29_S4_scaffolds.fasta	92	464078	66,21222783
UU1665_39_S6_scaffolds.fasta	82	373238	66,12465983
UU1671_27_S7_scaffolds.fasta	147	262463	65,75832833
UU1672_40_37_30_S8_scaffolds.fasta	80	422064	66,03848209
UU1676_29_S11_scaffolds.fasta	101	378454	66,19245889
UU1742_43_S26_scaffolds.fasta	138	245942	65,4755927
UU1677_29_S12_scaffolds.fasta	92	421887	66,20565332
UU1678_34_S13_scaffolds.fasta	93	232636	66,50193739
UU1680_38_S14_scaffolds.fasta	97	423697	66,25426614
UU1722_41_S16_scaffolds.fasta	95	211818	66,20170455
UU1729_27_S2_S17_scaffolds.fasta	76	346446	66,29190187
UU1730_27_S2_S18_scaffolds.fasta	64	423866	66,28156203
UU1731_40_37_30_S19_scaffolds.fasta	134	241845	65,48876605
UU1732_47_S20_scaffolds.fasta	95	435231	66,02009694
UU1734_47_S21_scaffolds.fasta	92	413556	66,00851025
UU1735_29_S22_scaffolds.fasta	118	388854	66,20601179
UU1738_42_S23_scaffolds.fasta	93	241208	66,10280189
UU1739_42_S24_scaffolds.fasta	113	232890	66,10158272
UU1740_43_S25_scaffolds.fasta	94	266089	66,3320641
UU1746_42_28_S27_scaffolds.fasta	73	311597	65,97416721
UU1785_27_S2_S30_scaffolds.fasta	65	426332	66,2655399
UU1787_47_S32_scaffolds.fasta	92	413340	66,01227104
UU1788_35_S33_scaffolds.fasta	74	420981	66,38143657
UU1789_42_S34_scaffolds.fasta	143	239576	66,09483819
UU1790_47_S35_scaffolds.fasta	124	294812	65,74940592
UU1791_43_S36_scaffolds.fasta	152	241845	65,47311793

UU1825_47_S37_scaffolds.fasta	90	413556	66,01981172
UU1827_37_30_40_S38_scaffolds.fasta	70	529782	65,99966697
UU1830_39_S39_scaffolds.fasta	71	419586	66,20661672
UU1837_43_S40_scaffolds.fasta	135	243856	65,47762199
UU1838_47_S41_scaffolds.fasta	106	210660	66,10171554
UU1839_43_38_S42_scaffolds.fasta	124	294812	65,7515778
UU1844_35_S43_scaffolds.fasta	110	269452	66,1357901
UU1847_29_S44_scaffolds.fasta	96	378424	66,21090752
UU1945_52_S62_scaffolds.fasta	129	221357	65,76212521
UU1883_38_S45_scaffolds.fasta	108	269440	66,1361046
UU1892_39_S47_scaffolds.fasta	94	219990	66,20270969
UU1894_52_S48_scaffolds.fasta	71	426332	66,28914298
UU1897_47_S50_scaffolds.fasta	198	255994	66,2203196
UU1898_47_S51_scaffolds.fasta	79	458111	66,01583128
UU1899_29_S52_scaffolds.fasta	102	390690	66,20838808
UU1901_42_52_S53_scaffolds.fasta	119	294812	65,74955569
UU1903_47_S54_scaffolds.fasta	94	351775	65,95175112
UU1904x_43_38_S12_scaffolds.fasta	236	348890	65,8549111
UU1907_43_47_S56_scaffolds.fasta	74	429151	66,34062192
UU1909_43_47_S57_scaffolds.fasta	142	210660	65,47239548
UU1911_42_28_S58_scaffolds.fasta	113	341437	66,29822674
UU1940_38_S60_scaffolds.fasta	207	235359	65,74321032
UU1946_29_S63_scaffolds.fasta	96	464639	66,21195233
UU1947_47_S64_scaffolds.fasta	189	256083	66,23088671
UU1948_47_S65_scaffolds.fasta	107	435231	66,01097516
UU1949_47_S66_scaffolds.fasta	193	284610	66,22030799
UU1952_42_S67_scaffolds.fasta	93	232727	66,27665278
UU1953x_42_S13_scaffolds.fasta	268	175612	65,49359542
UU1954_38_43_S69_scaffolds.fasta	97	277572	66,06296752
UU1990ax_31_S3_scaffolds.fasta	49	450557	66,47385962
UU1993x_44_S23_scaffolds.fasta	112	253331	66,07657876
UU1996_51_S72_scaffolds.fasta	109	232472	66,0297032
UU1997_37_40_S73_scaffolds.fasta	79	529797	65,99635367
UU1998_47_S74_scaffolds.fasta	204	258331	66,23063129
UU2000_47_S75_scaffolds.fasta	188	277491	66,21980981
UU2002_42_52_S77_scaffolds.fasta	114	268107	65,75343731
UU2004_47_52_S78_scaffolds.fasta	89	241827	66,09932515
UU2005_43_38_52_S79_scaffolds.fasta	88	400637	65,87606067
UU2007_42_48_52_S80_scaffolds.fasta	82	458110	66,00475911
UU2035_51_S82_scaffolds.fasta	147	237606	66,02871842
UU2038_37_40_S84_scaffolds.fasta	75	304883	66,48293507
UU2040_37_40_S85_scaffolds.fasta	66	529883	65,99899161
UU2041_47_51_S86_scaffolds.fasta	188	277577	66,21140742
UU2043_47_51_S87_scaffolds.fasta	100	435189	66,01832473
UU2053_43_38_48_52_S89_scaffolds.fasta	127	262463	65,71106307

UU2094_37_40_S91_scaffolds.fasta	72	376761	65,99881279
UU2099_43_48_52_S93_scaffolds.fasta	82	260478	66,0924541
UU2101_43_47_S94_scaffolds.fasta	124	446098	66,33346486
UU2145_44_S1_scaffolds.fasta	90	257371	66,08387019
UU2153_40_S4_scaffolds.fasta	103	378454	66,21969988
UU2155_40_S5_scaffolds.fasta	201	455225	65,99096921
UU2156_47_51_S6_scaffolds.fasta	76	413469	66,01597963
UU2157_47_51_S7_scaffolds.fasta	150	288762	66,24371066
UU2158_42_49_50_52_S8_scaffold.fasta	115	235059	65,74552911
UU2160x_42_49_50_52_S26_scaffolds.fasta	339	268107	65,72491324
UU2163_42_50_S11_scaffolds.fasta	99	253331	65,9236868
UU2164_47_52_55_S12_scaffolds.fasta	76	335264	65,88075739
UU2166_48_52_S13_scaffolds.fasta	93	385514	65,9552009
UU2168_47_S14_scaffolds.fasta	122	210660	65,47964426
UU2170_42_S15_scaffolds.fasta	87	238851	66,23182685
UU2230_52_48_S17_scaffolds.fasta	180	423222	66,25109683
UU2231_40_S18_scaffolds.fasta	64	529681	66,00150496
UU2492_49_50_S71_scaffolds.fasta	117	268107	65,74473202
UU2232_47_51_S19_scaffolds.fasta	151	277490	66,23961463
UU2234_47_S21_scaffolds.fasta	69	371370	66,34311379
UU2235_47_S22_scaffolds.fasta	116	241845	65,49967393
UU2242bx_52_48_S32_scaffolds.fasta	109	253270	66,10053909
UU2243_40_S26_scaffolds.fasta	71	376761	65,99970364
UU2245_47_51_S28_scaffolds.fasta	144	284610	66,23935809
UU2312_56_57_43_S34_scaffolds.fasta	78	306088	66,33954029
UU2352_52_S48_scaffolds.fasta	112	232496	66,10298743
UU2321_47_51_S38_scaffolds.fasta	174	250439	66,24142766
UU2322ax_42_49_50_52_S2_scaffolds.fasta	141	249474	65,73715276
UU2324_42_50_S40_scaffolds.fasta	64	233859	66,28592229
UU2326_47_S41_scaffolds.fasta	129	195539	65,48016728
UU2353_52_48_S49_scaffolds.fasta	132	431316	66,23715527
UU2357_49_50_52_S52_scaffolds.fasta	109	262463	65,74530308
UU2384_48_S56_scaffolds.fasta	64	399662	66,2921875
UU2388_49_50_52_S58_scaffolds.fasta	118	249415	65,7455129
UU2389_50_S59_scaffolds.fasta	90	378389	66,31106577
UU2440_48_S61_scaffolds.fasta	63	423222	66,26945251
UU2441_48_S62_scaffolds.fasta	101	378389	66,24424795
UU2483_51_S65_scaffolds.fasta	83	394071	66,01984921
UU2485ax_51_S4_scaffolds.fasta	93	459869	66,00768624
UU2486_51_S68_scaffolds.fasta	149	284610	66,21735292
UU2493_50_S72_scaffolds.fasta	118	431316	66,3081737
UU2494_55_52_S73_scaffolds.fasta	118	232829	65,7622995

UU2594_50_S80_scaffolds.fasta	105	335339	66,30343477
UU177_5_S28_scaffolds.fasta	102	391507	65,94433662
UU1003_14_12_S1_scaffolds.fasta	115	431316	66,23864433
UU1084_9_16_S14_scaffolds.fasta	169	242337	65,45621173
UU1157_9_16_S29_scaffolds.fasta	131	242337	65,50444883
UU1273_18_19_39_S38_scaffolds.fasta	118	371560	66,3230153
UU1320_20_25_S51_scaffolds.fasta	69	342517	66,07573775
UU1515_32_17_S1_scaffolds.fasta	159	270601	65,89995714
UU1622_37_30_S96_scaffolds.fasta	101	458110	66,0310304
UU1717_23_24_36_39_43_S15_scaffolds.fasta	98	253279	66,11347542
UU1786_37_30_40_S31_scaffolds.fasta	91	458110	66,01891511
UU1895_37_40_S49_scaffolds.fasta	63	529782	65,99466721
UU1941_43_47_S61_scaffolds.fasta	140	242337	65,47859278
UU2001x_38_S24_scaffolds.fasta	4747	135114	65,61523209
UU2036x_52_48_S25_scaffolds.fasta	247	351773	66,20795095
UU2050bx_43_38_52_48_S6_scaffolds.fasta	150	386117	65,853652
UU2097_47_52_S92_scaffolds.fasta	100	410830	65,95191363
UU2151_52_48_S3_scaffolds.fasta	59	378399	66,29182073
UU2161_42_50_S10_scaffolds.fasta	74	450934	66,24162134
UU2233_42_50_S20_scaffolds.fasta	71	259127	66,10064763
UU2244_47_51_S27_scaffolds.fasta	155	252738	66,24101926
UU2317_52_48_S36_scaffolds.fasta	103	378309	66,24956346
UU2320_47_51_S37_scaffolds.fasta	99	338347	66,02414408
UU2358_49_50_52_S53_scaffolds.fasta	173	213941	65,97882436
UU2484ax_51_S7_scaffolds.fasta	101	434493	66,01516717
UU2484bx_51-S8_scaffolds.fasta	159	294961	66,22418249
UU2485bx_51_S5_scaffolds.fasta	168	284609	66,23556362
Stats_Line	mean_sequence_count	mean_N50	mean_GC
means:	134,3682008	330236,9916	66,05127232

9.4. Übersicht über die 5 größten Cluster der Umweltproben

Anhang Tabelle 4 Übersicht über die 5 größten Cluster mit den dazugehörigen Umweltproben und Entnahmedaten

Cluster	Umweltproben	Entnahmedatum
c12	UU793_14	26.01.15
c12	UU825_14	02.02.15
c12	UU914_12	16.02.15
c12	UU958_12	23.02.15
c12	UU1003_14_12_	02.03.15
c12	UU1006_12	02.03.15
c12	UU1081_12	16.03.15
c12	UU1114_12	23.03.15
c12	UU1154_12	13.04.15
c12	UU1231_9	20.04.15
c12	UU1280_12	04.05.15
c12	UU1281_15	04.05.15
c12	UU1330_15	11.05.15
c12	UU1373_29	18.05.15
c12	UU1474_27	01.06.15
c12	UU1477_29	01.06.15
c12	UU1489_43_16	01.06.15
c12	UU1525_29	08.06.15
c12	UU1526_34	08.06.15
c12	UU1572_24	15.06.15
c12	UU1580_27	15.06.15
c12	UU1586_29	15.06.15
c12	UU1590_47	15.06.15
c12	UU1621_27	22.06.15
c12	UU1625_29	22.06.15
c12	UU1626_29	22.06.15
c12	UU1629_38	22.06.15
c12	UU1676_29	29.06.15
c12	UU1677_29	29.06.15
c12	UU1680_38	29.06.15
c12	UU1730_27_52	06.07.15
c12	UU1735_29	06.07.15
c12	UU1785_27_52	13.07.15
c12	UU1847_29	20.07.15
c12	UU1894_52	27.07.15

c12	UU1899_29	27.07.15
c12	UU1911_42_28	27.07.15
c12	UU1946_29	03.08.15
c12	UU2151_52_48	31.08.15
c12	UU2153_40	31.08.15
c12	UU2230_52_48	07.09.15
c12	UU2317_52_48	21.09.15
c12	UU2353_52_48	28.09.15
c12	UU2384_48	06.10.15
c12	UU2389_50	06.10.15
c12	UU2440_48	12.10.15
c12	UU2441_48	12.10.15
c12	UU2493_50	02.11.15
c12	UU2594_50	16.11.15
c8	UU986_9	02.03.15
c8	UU1004_9	02.03.15
c8	UU1044_9	09.03.15
c8	UU1082_9	16.03.15
c8	UU1111_25	23.03.15
c8	UU1117_11	23.03.15
c8	UU1149_25	13.04.15
c8	UU1150_9	13.04.15
c8	UU1228_9	20.04.15
c8	UU1232_11	20.04.15
c8	UU1456_31	01.06.15
c8	UU1512_31	08.06.15
c8	UU1533_43	08.06.15
c8	UU1582_37_30	15.06.15
c8	UU1622_37_30	22.06.15
c8	UU1672_40_37_30	29.06.15
c8	UU1732_47	06.07.15
c8	UU1734_47	06.07.15
c8	UU1746_42_48	06.07.15
c8	UU1786_37_40_30	13.07.15
c8	UU1787_47	13.07.15
c8	UU1825_47	20.07.15
c8	UU1827_37_30_40	20.07.15
c8	UU1895_37_40	27.07.15
c8	UU1898_47	27.07.15
c8	UU1903_47	27.07.15

c8	UU1948_47	03.08.15
c8	UU1997_37_40	10.08.15
c8	UU2007_42_48_52	10.08.15
c8	UU2040_37_40	17.08.15
c8	UU2043_47_51	17.08.15
c8	UU2094_37_40	24.08.15
c8	UU2097_47_55_52	24.08.15
c8	UU2155_40	31.08.15
c8	UU2156_47_51	31.08.15
c8	UU2166_48_52	31.08.15
c8	UU2231_40	07.09.15
c8	UU2243_40	14.09.15
c8	UU2320_47_51	21.09.15
c8	UU2483_51	02.11.15
c8	UU2484ax_51	02.11.15
c8	UU2485ax_51	02.11.15
c18	UU604_4	08.12.14
c18	UU750_4	19.01.15
c18	UU787_10	26.01.15
c18	UU823_10	02.02.15
c18	UU833_11	02.02.15
c18	UU882_9	09.02.15
c18	UU954_10	23.02.15
c18	UU988_9	02.03.15
c18	UU1005_9	02.03.15
c18	UU1079_9	16.03.15
c18	UU1080_12	16.03.15
c18	UU1084_9_16	16.03.15
c18	UU1106_19	23.03.15
c18	UU1120x_11	23.03.15
c18	UU1121_11	23.03.15
c18	UU1141	13.04.15
c18	UU1157_9_16	13.04.15
c18	UU1222_19	20.04.15
c18	UU1227_9	20.04.15
c18	UU1283_21	04.05.15
c18	UU1286_19	04.05.15
c18	UU1364_19	18.05.15
c18	UU1365_19	18.05.15
c18	UU1371_30	18.05.15

c18	UU1521_27	08.06.15
c18	UU1530_47	08.06.15
c18	UU1581x_27	15.06.15
c18	UU1591_43	15.06.15
c18	UU1717_23_24_36_39_43	06.07.15
c18	UU1731_40_37_30	06.07.15
c18	UU1742_43	06.07.15
c18	UU1791_43	13.07.15
c18	UU1837_43	20.07.15
c18	UU1838_47	20.07.15
c18	UU1909_43_47	27.07.15
c18	UU1941_43_47	03.08.15
c18	UU2004_47_52	10.08.15
c18	UU2168_47	31.08.15
c18	UU2235_47	07.09.15
c18	UU2242bx_52_48	14.09.15
c18	UU2326_47	21.09.15
c15	UU1897_47	27.07.15
c15	UU1947_47	03.08.15
c15	UU1949_47	03.08.15
c15	UU1998_47	10.08.15
c15	UU2000_47	10.08.15
c15	UU2041_47_51	17.08.15
c15	UU2157_47_51	31.08.15
c15	UU2161_42_50	31.08.15
c15	UU2232_47_51	07.09.15
c15	UU2244_47_51	14.09.15
c15	UU2245_47_51	14.09.15
c15	UU2321_47_51	21.09.15
c15	UU2484bx_51	02.11.15
c15	UU2485bx_51	02.11.15
c15	UU2486_51	02.11.15
c16	UU1276_20_25	04.05.15
c16	UU1671_27	29.06.15
c16	UU1790_47	13.07.15
c16	UU1839_43_38	20.07.15
c16	UU1901_42_52	27.07.15
c16	UU1945_52	03.08.15
c16	UU2002_42_52	10.08.15
c16	UU2053_43_38_48_52	17.08.15

c16	UU2158_42_49_50_52	31.08.15
c16	UU2160x_42_49_50_52	31.08.15
c16	UU2322ax_42_49_50_52	21.09.15
c16	UU2357_49_50_52	28.09.15
c16	UU2388_49_50_52	06.10.15
c16	UU2492_49_50	02.11.15
c16	UU2494_52	02.11.15

9.5. Patientenstämme mit nachgewiesenen Resistenzgenen

Anhang Tabelle 5 Patientenstämme mit Resistenzgenen

Legende: Cabapenmasebildner Grün

Patienten	Aminoglykoside	β -Laktam	Fosfomycin	Phenicol	Sulphonamid	Fluro- chinolon	Trimethoprim	Tetracyclin
1	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
2	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{OXA-50}</i>						
3	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{OXA-50}</i>						
4	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
5	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
6	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
7	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
8	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
9	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
		<i>bla_{PAO}</i>						
10	<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				

			<i>bla_{OXA-50}</i>						
11		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
12		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
13		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
14		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>sulI</i>			
		<i>aadA6</i>	<i>bla_{PAO}</i>						
15		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
16		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
17		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
18		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
19		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
20		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
21		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
22		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						

23		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
24		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
25		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
26		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
27		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
28		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
29		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
30		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
31		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{IMP-8}</i>	<i>fosA</i>		<i>sul1</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>		
		<i>aph(3')-XV</i>	<i>bla_{OXA-2}</i>						
		<i>aacA4</i>	<i>bla_{OXA-10} (PSE??)</i>						
		<i>aadA10</i>	<i>bla_{PAO}</i>						
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
32		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
33		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						

34		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
35		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
36		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
37		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
38		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>			<i>dfrA1</i>	
		<i>aadA24</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>						
39		<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sulI</i>		<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
		<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>		<i>catB7</i>				
		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{YM-2}</i>						
			<i>bla_{PAO}</i>						
40		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
41		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>		<i>sulI</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>		
		<i>aacA4</i>	<i>bla_{OXA-2}</i>						
		<i>aadA10</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>						
		<i>aph(3')-XV</i>	<i>bla_{PAO}</i>						
42		<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sulI</i>		<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
		<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
			<i>bla_{YM-2}</i>						
43		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				

			<i>bla_{OXA-50}</i>						
44		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
45		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{OXA-50}</i>						
46		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
47		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
48		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
49		<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sulI</i>		<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
		<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
			<i>bla_{VTM-2}</i>						
50		<i>aadA2</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>cmlA1</i>	<i>sulI</i>		<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>
		<i>aph(3')-IIb</i>	<i>bla_{PAO}</i>		<i>catB7</i>				
		<i>aac(3)-Id</i>	<i>bla_{OXA-4}</i>						
			<i>bla_{VTM-2}</i>						
51		<i>aph(3')-IIB</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
52		<i>aph(3')-IIB</i>	<i>bla_{OXA-50}</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>				
			<i>bla_{PAO}</i>						
	Carbapenemase Gen								

9.6. Übersicht der Umweltstämme mit nachgewiesenen Resistenzgenen

Anhang Tabelle 6 Umweltstämme mit Resistenzgenen

Legende: Carbapenemasebildner Grün

Umweltstämme	Aminoglykosid	β -Laktam	Phenicol	Fosfo- mycin	Sulphon- amide	Trimetho- prim	Tetra- cyclin	Fluoro- chinolon
UU2234_47	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2322ax_42_49 50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2- like, aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-4-like}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO- like}, bla_{TEM-2}</i>	<i>catB7- like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU2321_47_51	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2320_47_51	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2317_52_48_	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2312_56_57_4 3	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2245_47_51	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2244_47_51	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2243_40	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2242bx_52_48	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1945_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2- like, aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-4-like}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO- like}, bla_{TEM-2}</i>	<i>catB7- like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU2235_4	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1941_43_47	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2234_47	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1940_38	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2233_42_50	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1911_42_28	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2232_47_51	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1909_43_47	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU2231_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1907_43_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1904x_43_38	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1903_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1901_42_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4-like}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{TM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1158x_9_16	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1899_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1157_9_16	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1582_37_30	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1898_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1154_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2230_52_48	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1581x_27	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1150_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1897_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1580_27	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2170_42	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1149_25	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1895_37_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1578_25	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2168_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1573_39	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1143_22	<i>aadA7-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			
UU1894_52	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1892_39	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU2166_48_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1572_24	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1142_19	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1883_38	<i>aph(3')-Iib, aacA4-like</i>	<i>bla_{OXA-10}, bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>		<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			<i>aac(6')Ib-cr-like</i>
UU2164_47_52_5	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1567_35	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1121_11	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2163_42_50	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1533_43	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1120x_11	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1847_29	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2161_42_50	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1117_11	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1532_47	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2160x_42_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VTM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1844_35	<i>aph(3')-Iib, aacA4-like</i>	<i>bla_{OXA-10}, bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>		<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			<i>aac(6')Ib-cr-like</i>
UU2158_42_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VTM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1839_43_38	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VTM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1114_12	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1530_47	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1838_47	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1111_25	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1526_34	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1837_43	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1525_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1107_14	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1830_39	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1521_27	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1106_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1827_37_30_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1516_28_20_25	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1084_9_16	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1825_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2157_47_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1515_32_17	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1083_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1791_43	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2156_47_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1790_47	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{TEM-3}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfxB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1512_31	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1082_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2155_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1789_42	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1489_43_16	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1081_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2153_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1477_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1788_35	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1080_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2151_52_48	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1474_27	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1787_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1079_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2145_44	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1456_31	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1786_37_30_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1075_20	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2101_43_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1785_27_52	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1453_16	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1044_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2099_43_48_52	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1746_42_28	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1451_25	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1006_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2094_37_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2053_43_38_48_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{TEM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfxB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1742_43	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1005_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1449_20	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2050bx_43_38_52_48	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1740_43	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1004_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1443_31	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2043_47_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1739_42	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1003_14_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1373_29s	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2041_47_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1738_42	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU988_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1371_30	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2040_37_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1735_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU986_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1368_24	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1734_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2038_37_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				
UU985_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1365_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1732_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU961_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2036x_52_48	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1364_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2494_55_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4-like}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VIM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1731_40_37_30	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU958_12	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU2035_51	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1363_31	<i>aph(3')-Iib,aacA4-like</i>	<i>bla_{OXA-10}, bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>		<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			<i>aac(6')Ib-cr-like</i>
UU2097_47_55_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1730_27_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU954_10	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1330_15	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2007_42_48_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2594_50	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU916_9	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1729_27_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2005_43_38_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1722_41	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1326_30	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2493_50	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2492_49_50	<i>aac(3)-Id-like,aadA2-like,aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VIM-2}</i>	<i>catB7-like,cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfxB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU914_12	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2004_47_52	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1717_23_24_36_39_43	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1320_20_25	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2002_42_52	<i>aac(3)-Id-like,aadA2-like,aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VIM-2}</i>	<i>catB7-like,cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfxB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU2486_51	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU882_9	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2001x_38	<i>aph(3')-Iib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1680_38	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1317_14	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU881x_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2485bx_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1316_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2000_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1678_34	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				
UU879_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2485ax_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1288_24	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1677_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1998_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU833_11	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1676_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2484bx_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1287_24	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1997_37_40	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU825_14	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1672_40_37_30	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2484ax_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1286_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1996_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1671_27	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{TEM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfxB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU823_10	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2483_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1283_21	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1993x_44	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1665_39	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU822_10	<i>aph(3')-I Ib, aacA4-like</i>	<i>bla_{OXA-10}, bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>		<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			<i>aac(6')I b-cr-like</i>
UU2441_48	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1281_15	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1629_38	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1990ax_31	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU793_14	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2440_48	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1280_12	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1626_29	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1276_20_25	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VIM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1954_38_43	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU787_10	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2389_50	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1625_29	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2388_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-4}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VIM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1-like</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1953x_42	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU750_4	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1273_18_19_39	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2384_48	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1622_37_30	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1952_42	<i>aph(3')-I Ib-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7</i>	<i>fosA-like</i>				

UU1232_11	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU732_8	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2358_49_50_52	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1621_27	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2357_49_50_52	<i>aac(3)-Id-like, aadA2-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-4-like}, bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}, bla_{VTM-2}</i>	<i>catB7-like, cmlA1-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>	<i>dfrB5</i>	<i>tet(G)</i>	
UU1231_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU604_4	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1949_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1610_35	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2353_52_48	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1228_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1948_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU463_5	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1591_43	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2352_51	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1227_9	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1947_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU339_5	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1590_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU2326_47	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1223_22	<i>aadA7-like, aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>sul1</i>			
UU1946_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU218_5	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1586_29	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
UU1222_19	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla_{OXA-50-like}, bla_{PAO-like}</i>	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				

UU177_5	<i>aph(3')-IIb-like</i>	<i>bla</i> _{OXA-50-like} , <i>bla</i> _{PAO-like}	<i>catB7-like</i>	<i>fosA-like</i>				
---------	-------------------------	--	-------------------	------------------	--	--	--	--

9.7. Übersicht der Patientenisolat und zugeordneten Umweltisolaten aufgeschlüsselt nach NGS Clustern

Anhang Tabelle 7 Übersicht der Patientenisolat und der zugeordneten Umweltisolate aufgeschlüsselt nach NGS Clustern

Legende: Grün Übertragungen

NGS Cluster	Patientennummer	ID Umweltisolat_(Patient zu Umweltisolat)
c1	5	
c1	13	
c1	26	
c1	34	
c1		UU961_9
c1		UU1449_20
c1		UU1738_42
c1		UU1739_42
c1		UU1789_42
c1		UU1953x_42
c2	18	
c2	2	
c2	7	
c3	21	
c3	31	
c3	3	
c3	41	
c3		UU822_10
c3		UU1363_31
c3		UU1844_35
c3		UU1883_38
c4	32	
c4		UU177_5
c4		UU339_5
c4		UU1316_19
c5	37	
c5	25	
c5		UU881x_9
c5		UU1158x_9_16
c5		UU1515_32_17
c5		UU1954_38_43
c5		UU2099_43_48_52
c5		UU2233_42_50
c6	44	

c6		UU1573_39
c6		UU1722_41
c6		UU1892_39
c7	47	
c7		UU2170_42
c8	1	
c8	46	
c8		UU986_9
c8		UU1004_9
c8		UU1044_9
c8		UU1082_9
c8		UU1111_25
c8		UU1117_11
c8		UU1149_25
c8		UU1150_9
c8		UU1228_9
c8		UU1232_11
c8		UU1456_31
c8		UU1512_31
c8		UU1533_43
c8		UU1582_37_30
c8		UU1622_37_30
c8		UU1672_40_37_30
c8		UU1732_47
c8		UU1734_47
c8		UU1746_42_48
c8		UU1786_37_40_30
c8		UU1787_47
c8		UU1825_47
c8		UU1827_37_30_40
c8		UU1895_37_40
c8		UU1898_47
c8		UU1903_47
c8		UU1948_47
c8		UU1997_37_40
c8		UU2007_42_48_52
c8		UU2040_37_40
c8		UU2043_47_51
c8		UU2094_37_40
c8		UU2097_47_55_52
c8		UU2155_40
c8		UU2156_47_51
c8		UU2166_48_52

c8		UU2231_40
c8		UU2243_40
c8		UU2320_47_51
c8		UU2483_51
c8		UU2484ax_51
c8		UU2485ax_51
c9	4	
c9	8	
c9	51	
c10	6	
c10	22	
c11	9	
c11	28	
c11	40	
c11		UU1665_39
c12	11	
c12	27	
c12	33	
c12		UU793_14
c12		UU825_14
c12		UU914_12
c12		UU958_12
c12		UU1003_14_12_
c12		UU1006_12
c12		UU1081_12
c12		UU1114_12
c12		UU1154_12
c12		UU1231_9
c12		UU1280_12
c12		UU1281_15
c12		UU1330_15
c12		UU1373_29
c12		UU1474_27
c12		UU1477_29
c12		UU1489_43_16
c12		UU1525_29
c12		UU1526_34
c12		UU1572_24
c12		UU1580_27
c12		UU1586_29
c12		UU1590_47
c12		UU1621_27
c12		UU1625_29

c12		UU1626_29
c12		UU1629_38
c12		UU1676_29
c12		UU1677_29
c12		UU1680_38
c12		UU1730_27_52
c12		UU1735_29
c12		UU1785_27_52
c12		UU1847_29
c12		UU1894_52
c12		UU1899_29
c12		UU1911_42_28
c12		UU1946_29
c12		UU2151_52_48
c12		UU2153_40
c12		UU2230_52_48
c12		UU2317_52_48
c12		UU2353_52_48
c12		UU2384_48
c12		UU2389_50
c12		UU2440_48
c12		UU2441_48
c12		UU2493_50
c12		UU2594_50
c13	17	
c13		UU1993x_44
c13		UU2145_44
c13		UU2163_42_50
c14	20	
c14	38	
c14		UU1320_20_25
c14		UU1567_35
c15	36	
c15		UU1897_47
c15		UU1947_47
c15		UU1949_47
c15		UU1998_47
c15		UU2000_47
c15		UU2041_47_51
c15		UU2157_47_51
c15		UU2161_42_50
c15		UU2232_47_51
c15		UU2244_47_51

c15		UU2245_47_51
c15		UU2321_47_51
c15		UU2484bx_51
c15		UU2485bx_51
c15		UU2486_51
c16	39	
c16	42	
c16	49	
c16	50	
c16		UU1276_20_25
c16		UU1671_27
c16		UU1790_47
c16		UU1839_43_38
c16		UU1901_42_52
c16		UU1945_52
c16		UU2002_42_52
c16		UU2053_43_38_48_52
c16		UU2158_42_49_50_52
c16		UU2160x_42_49_50_52
c16		UU2322ax_42_49_50_52
c16		UU2357_49_50_52
c16		UU2388_49_50_52
c16		UU2492_49_50
c16		UU2494_52
c17		UU218_5
c17		UU463_5
c18		UU604_4
c18		UU750_4
c18		UU787_10
c18		UU823_10
c18		UU833_11
c18		UU882_9
c18		UU954_10
c18		UU988_9
c18		UU1005_9
c18		UU1079_9
c18		UU1080_12
c18		UU1084_9_16
c18		UU1106_19
c18		UU1120x_11
c18		UU1121_11
c18		UU1142_19
c18		UU1157_9_16

c18		UU1222_19
c18		UU1227_9
c18		UU1283_21
c18		UU1286_19
c18		UU1364_19
c18		UU1365_19
c18		UU1371_30
c18		UU1521_27
c18		UU1530_47
c18		UU1581x_27
c18		UU1591_43
c18		UU1717_23_24_36_39_43
c18		UU1731_40_37_30
c18		UU1742_43
c18		UU1791_43
c18		UU1837_43
c18		UU1838_47
c18		UU1909_43_47
c18		UU1941_43_47
c18		UU2004_47_52
c18		UU2168_47
c18		UU2235_47
c18		UU2242bx_52_48
c18		UU2326_47
c19		UU732_8
c19		UU1443_31
c19		UU1516_38_20_25
c19		UU1532_47
c19		UU1610_35
c19		UU1788_35
c20		UU879_9
c20		UU985_9
c20		UU1083_9
c20		UU2005_43_38_52
c20		UU2050bx_43_38_52_48
c20		UU2164_47_52_55
c20		UU2312_43_56_57
c21		UU1107_14
c21		UU1273_18_19_39
c21		UU1740_43
c21		UU1907_43_47
c21		UU2101_43_47
c21		UU2234_47

c22		UU1143_22
c22		UU1223_22
c23		UU1287_24
c23		UU1288_24
c23		UU1368_24
c24		UU1326_30
c24		UU2038_37_40
c25		UU1451_25
c25		UU1578_25
c25		UU1996_51
c25		UU2035_51
c25		UU2352_52
c26		UU1453_16
c26		UU1729_27_52
c26		UU2036x_52_48
c27		UU1678_34
c27		UU1952_42
c27		UU2324_42_50
s1	14	
s2	15	
s3	16	
s4	24	
s5	29	
s6	30	
s7	35	
s8	43	
s9	45	
s10	48	
s11	10	
s12	12	
s13	19	
s14	23	
s15	52	
s16		UU916_9
s17		UU1075_20
s18		UU1317_14
s19		UU1830_39
s20		UU1904x_43_38
s21		UU1940_38
s22		UU1990ax_31
s23		UU2001x_38
s24		UU2358_49_50_52

9.8. Übersicht über die NGS Cluster der Patientenisolate und den zum Patienten zugehörigen Umweltisolaten

Anhang Tabelle 8 Übersicht über die NGS Cluster der Patientenisolate und den zum Patienten zugehörigen Umweltisolate

Legende: Grün markiert Übertragungen

Patientennummer	NGS Cluster/Singletons	zugehörige Umweltisolat	NGS Cluster des Umweltisolat	Übertragung	<i>bla_{VIM-2}/bla_{IMP-8}</i>
1	c8	kein		nein	
2	c2	kein		nein	
3	c3	kein		nein	
4	c9	UU604_4	c18	nein	
		UU750_4	c18	nein	
5	c1	UU177_5	c4	nein	
		UU339_5	c4	nein	
		UU218_5	c17	nein	
		UU463_5	c17	nein	
6	c10	kein		nein	
7	c2	kein		nein	
8	c9	UU732_8	c19	nein	
9	c11	UU961_9	c1	nein	
		UU881x_9	c5	nein	
		UU1158x_9_16	c5	nein	
		UU986_9	c8	nein	
		UU1004_9	c8	nein	
		UU1044_9	c8	nein	
		UU1082_9	c8	nein	

		UU1150_9	c8	nein	
		UU1228_9	c8	nein	
		UU1231_9	c12	nein	
		UU882_9	c18	nein	
		UU988_9	c18	nein	
		UU1005_9	c18	nein	
		UU1079_9	c18	nein	
		UU1084_9_16	c18	nein	
		UU1157_9_16	c18	nein	
		UU1227_9	c18	nein	
		UU879_9	c20	nein	
		UU985_9	c20	nein	
		UU1083_9	c20	nein	
		UU916_9	s16	nein	
10	s11	UU822_10	c3	nein	
		UU787_10	c18	nein	
		UU823_10	c18	nein	
		UU954_10	c18	nein	
11	c12	UU1117_11	c8	nein	
		UU1232_11	c8	nein	
		UU833_11	c18	nein	
		UU1120x_11	c18	nein	
		UU1121_11	c18	nein	
12	s12	UU914_12	c12	nein	
		UU958_12	c12	nein	

		UU1003_14_12_	c12	nein	
		UU1006_12	c12	nein	
		UU1081_12	c12	nein	
		UU1114_12	c12	nein	
		UU1154_12	c12	nein	
		UU1280_12	c12	nein	
		UU1080_12	c18	nein	
13	c1	kein		nein	
14	s1	UU793_14	c12	nein	
		UU825_14	c12	nein	
		UU1003_14_12_	c12	nein	
		UU1107_14	c21	nein	
		UU1317_14	s18	nein	
15	s2	UU1281_15	c12	nein	
		UU1330_15	c12	nein	
16	s3	UU1158x_9_16	c5	nein	
		UU1489_43_16	c12	nein	
		UU1084_9_16	c18	nein	
		UU1157_9_16	c18	nein	
		UU1453_16	c26	nein	
17	c13	UU1515_32_17	c5	nein	
18	c2	UU1273_18_19_39	c21	nein	
19	s13	UU1316_19	c4	nein	
		UU1106_19	c18	nein	
		UU1222_19	c18	nein	

		UU1286_19	c18	nein	
		UU1364_19	c18	nein	
		UU1365_19	c18	nein	
		UU1142_19	c18	nein	
		UU1273_18_19_39	c21	nein	
20	c14	UU1449_20	c1	nein	
		UU1320_20_25	c14	ja	
		UU1276_20_25	c16	nein	
		UU1075_20	s17	nein	
		UU1516_38_20_25	c19	nein	
21	c3	UU1283_21	c18	nein	
22	c10	UU1143_22	c22	nein	
		UU1223_22	c22	nein	
23	s14	UU1717_23_24_36_39_43	c18	nein	
24	s4	UU1572_24	c12	nein	
		UU1717_23_24_36_39_43	c18	nein	
		UU1287_24	c23	nein	
		UU1288_24	c23	nein	
		UU1368_24	c23	nein	
25	c5	UU1111_25	c8	nein	
		UU1320_20_25	c14	nein	
		UU1276_20_25	c16	nein	
		UU1516_38_20_25	c19	nein	
		UU1451_25	c25	nein	
		UU1578_25	c25	nein	

		UU1149_25	c8	nein	
26	c1	kein		nein	
27	c12	UU1474_27	c12	ja	
		UU1580_27	c12	ja	
		UU1621_27	c12	ja	
		UU1730_27_52	c12	ja	
		UU1785_27_52	c12	ja	
		UU1671_27	c16	nein	
		UU1521_27	c18	nein	
		UU1581x_27	c18	nein	
		UU1729_27_52	c26	nein	
28	c11	UU1911_42_28	c12	nein	
29	s5	UU1373_29	c12	nein	
		UU1477_29	c12	nein	
		UU1525_29	c12	nein	
		UU1586_29	c12	nein	
		UU1625_29	c12	nein	
		UU1626_29	c12	nein	
		UU1676_29	c12	nein	
		UU1677_29	c12	nein	
		UU1735_29	c12	nein	
		UU1847_29	c12	nein	
		UU1899_29	c12	nein	
		UU1946_29	c12	nein	
30	s6	UU1582_37_30	c8	nein	

		UU1622_37_30	c8	nein	
		UU1672_40_37_30	c8	nein	
		UU1786_37_40_30	c8	nein	
		UU1827_37_30_40	c8	nein	
		UU1371_30	c18	nein	
		UU1731_40_37_30	c18	nein	
		UU1326_30	c24	nein	
31	c3	UU1363_31	c3	ja	Patientenisolat <i>bla</i> _{IMP-8}
		UU1456_31	c8	nein	
		UU1512_31	c8	nein	
		UU1443_31	c19	nein	
		UU1990ax_31	s22	nein	
32	c4	UU1515_32_17	c5	nein	
33	c12	kein		nein	
34	c1	UU1526_34	c12	nein	
		UU1678_34	c27	nein	
35	s7	UU1844_35	c3	nein	
		UU1567_35	c14	nein	
		UU1610_35	c19	nein	
		UU1788_35	c19	nein	
36	c15	UU1717_23_24_36_39_43	c18	nein	
37	c5	UU1582_37_30	c8	nein	
		UU1622_37_30	c8	nein	
		UU1672_40_37_30	c8	nein	
		UU1786_37_40_30	c8	nein	

		UU1895_37_40	c8	nein	
		UU1997_37_40	c8	nein	
		UU2040_37_40	c8	nein	
		UU2094_37_40	c8	nein	
		UU1731_40_37_30	c18	nein	
		UU2038_37_40	c24	nein	
38	c14	UU1883_38	c3	nein	
		UU1954_38_43	c5	nein	
		UU1629_38	c12	nein	
		UU1680_38	c12	nein	
		UU2053_43_38_48_52	c16	nein	
		UU1839_43_38	c16	nein	
		UU1516_38_20_25	c19	nein	
		UU2005_43_38_52	c20	nein	
		UU2050bx_43_38_52_48	c20	nein	
		UU1904x_43_38	s20	nein	
		UU1940_38	s21	nein	
		UU2001x_38	s23	nein	
39	c16	UU1573_39	c6	nein	
		UU1892_39	c6	nein	
		UU1665_39	c11	nein	
		UU1717_23_24_36_39_43	c18	nein	
		UU1273_18_19_39	c21	nein	
		UU1830_39	s19	nein	
40	c11	UU1672_40_37_30	c8	nein	

		UU1786_37_40_30	c8	nein	
		UU1827_37_30_40	c8	nein	
		UU1895_37_40	c8	nein	
		UU1997_37_40	c8	nein	
		UU2040_37_40	c8	nein	
		UU2094_37_40	c8	nein	
		UU2155_40	c8	nein	
		UU2231_40	c8	nein	
		UU2243_40	c8	nein	
		UU2153_40	c12	nein	
		UU1731_40_37_30	c18	nein	
		UU2038_37_40	c24	nein	
41	c3	UU1722_41	c6	nein	
42	c16	UU1738_42	c1	nein	
		UU1739_42	c1	nein	
		UU1789_42	c1	nein	
		UU1953x_42	c1	nein	
		UU2170_42	c7	nein	
		UU2233_42_50	c5	nein	
		UU1746_42_48	c8	nein	
		UU2007_42_48_52	c8	nein	
		UU1911_42_28	c12	nein	
		UU2163_42_50	c13	nein	
		UU2161_42_50	c15	nein	
		UU1901_42_52	c16	ja	blavIM-2

		UU2002_42_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2158_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU1952_42	c27	nein	
		UU2324_42_50	c27	nein	
43	s8	UU1954_38_43	c5	nein	
		UU2099_43_48_52	c5	nein	
		UU1533_43	c8	nein	
		UU1489_43_16	c12	nein	
		UU1839_43_38	c16	nein	
		UU2053_43_38_48_52	c16	nein	
		UU1591_43	c18	nein	
		UU1717_23_24_36_39_43	c18	nein	
		UU1742_43	c18	nein	
		UU1791_43	c18	nein	
		UU1837_43	c18	nein	
		UU1909_43_47	c18	nein	
		UU1941_43_47	c18	nein	
		UU2005_43_38_52	c20	nein	
		UU2050bx_43_38_52_48	c20	nein	
		UU2312_43	c20	nein	
		UU1740_43	c21	nein	
		UU1907_43_47	c21	nein	
		UU2101_43_47	c21	nein	

		UU1904x_43_38	s20	nein	
44	c6	UU1993x_44	c13	nein	
		UU2145_44	c13	nein	
45	s9	kein		nein	
46	c8	kein		nein	
47	c7	UU1732_47	c8	nein	
		UU1734_47	c8	nein	
		UU1787_47	c8	nein	
		UU1825_47	c8	nein	
		UU1898_47	c8	nein	
		UU1903_47	c8	nein	
		UU1948_47	c8	nein	
		UU2043_47_51	c8	nein	
		UU2097_47_52	c8	nein	
		UU2156_47_51	c8	nein	
		UU2320_47_51	c8	nein	
		UU1590_47	c12	nein	
		UU1897_47	c15	nein	
		UU1947_47	c15	nein	
		UU1949_47	c15	nein	
		UU1998_47	c15	nein	
		UU2000_47	c15	nein	
		UU2041_47_51	c15	nein	
		UU2157_47_51	c15	nein	
		UU2232_47_51	c15	nein	

		UU2244_47_51	c15	nein	
		UU2245_47_51	c15	nein	
		UU2321_47_51	c15	nein	
		UU1790_47	c16	nein	
		UU1530_47	c18	nein	
		UU1909_43_47	c18	nein	
		UU1941_43_47	c18	nein	
		UU2004_47_52	c18	nein	
		UU2168_47	c18	nein	
		UU2235_47	c18	nein	
		UU2326_47	c18	nein	
		UU1532_47	c19	nein	
		UU2164_47_52	c20	nein	
		UU1907_43_47	c21	nein	
		UU2101_43_47	c21	nein	
		UU2234_47	c21	nein	
48	s10	UU2099_43_48_52	c5	nein	
		UU1746_42_48	c8	nein	
		UU2007_42_48_52	c8	nein	
		UU2166_48_52	c8	nein	
		UU2151_52_48	c12	nein	
		UU2230_52_48	c12	nein	
		UU2317_52_48	c12	nein	
		UU2353_52_48	c12	nein	
		UU2384_48	c12	nein	

		UU2440_48	c12	nein	
		UU2441_48	c12	nein	
		UU2053_43_38_48_52	c16	nein	
		UU2242bx_52_48	c18	nein	
		UU2050bx_43_38_52_48	c20	nein	
		UU2036x_52_48	c26	nein	
49	c16	UU2158_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2357_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2388_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2492_49_50	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2358_49_50_52	s24	nein	
50	c16	UU2233_42_50	c5	nein	
		UU2389_50	c12	nein	
		UU2493_50	c12	nein	
		UU2594_50	c12	nein	
		UU2163_42_50	c13	nein	
		UU2161_42_50	c15	nein	
		UU2158_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2160x_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2357_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2388_49_50_52	c16	ja	blav _{VIM-2}
		UU2492_49_50	c16	ja	blav _{VIM-2}

		UU2324_42_50	c27	nein	
		UU2358_49_50_52	s24	nein	
51	c9	UU2043_47_51	c8	nein	
		UU2156_47_51	c8	nein	
		UU2320_47_51	c8	nein	
		UU2483_51	c8	nein	
		UU2484ax_51	c8	nein	
		UU2485ax_51	c8	nein	
		UU2041_47_51	c15	nein	
		UU2157_47_51	c15	nein	
		UU2232_47_51	c15	nein	
		UU2244_47_51	c15	nein	
		UU2245_47_51	c15	nein	
		UU2321_47_51	c15	nein	
		UU2484bx_51	c15	nein	
		UU2485bx_51	c15	nein	
		UU2486_51	c15	nein	
		UU1996_51	c25	nein	
		UU2035_51	c25	nein	
52	s15	UU2099_43_48_52	c5	nein	
		UU2007_42_48_52	c8	nein	
		UU2097_47_52	c8	nein	
		UU2166_48_52	c8	nein	
		UU1730_27_52	c12	nein	
		UU1785_27_52	c12	nein	

		UU1894_52	c12	nein	
		UU2151_52_48	c12	nein	
		UU2230_52_48	c12	nein	
		UU2317_52_48	c12	nein	
		UU2353_52_48	c12	nein	
		UU1901_42_52	c16	nein	
		UU1945_52	c16	nein	
		UU2002_42_52	c16	nein	
		UU2053_43_38_48_52	c16	nein	
		UU2158_42_49_50_52	c16	nein	
		UU2160x_42_49_50_52	c16	nein	
		UU2322ax_42_49_50_52	c16	nein	
		UU2357_49_50_52	c16	nein	
		UU2388_49_50_52	c16	nein	
		UU2494_52	c16	nein	
		UU2004_47_52	c18	nein	
		UU2242bx_52_48	c18	nein	
		UU2005_43_38_52	c20	nein	
		UU2050bx_43_38_52_48	c20	nein	
		UU2164_47_52	c20	nein	
		UU2352_52	c25	nein	
		UU1729_27_52	c26	nein	
		UU2036x_52_48	c26	nein	
		UU2358_49_50_52	s24	nein	