

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Bakteriologie

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Jürgen Heesemann

Molekular-epidemiologische Untersuchung
klinischer Isolate des
***Enterobacter cloacae* Komplexes und**
Identifizierung eines Genotyp-spezifischen
Fitnessfaktors mit Krankenhaus-hygienischer Relevanz

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der
Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anita Natalie Stumpf
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Ostermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Haas

Priv. Doz. Dr. P. Nelson

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2008

*Meinem Großvater
Ernst Prüfer (1910-2001)*

Inhalt

I.	Detailliertes Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	V
II.	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1.	Einleitung	1
2.	Materialien	14
3.	Methoden	25
4.	Ergebnisse	52
5.	Diskussion	87
6.	Zusammenfassung	109
7.	Literaturverzeichnis	112
8.	Anhang	128
9.	Danksagung	145
10.	Lebenslauf	147

I. Detailliertes Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Systematik des Genus <i>Enterobacter</i>	2
1.2	Systematik des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes	3
1.3	Bedeutung des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes in der Krankenhaus-Hygiene	6
1.3.1	Antibiotika-Resistenzen im <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex	6
1.3.2	Klonale Ausbrüche	7
1.3.3	Methoden zum Nachweis klonaler Ausbrüche	7
1.4	Klinische Risikofaktoren für Infektionen mit <i>Enterobacter</i>	8
1.5	Das geringe Wissen über Fitness- und Pathogenitätsfaktoren beim <i>E. cloacae</i> Komplex	9
1.6	Methoden zum Auffinden Pathogenitäts-assoziiierter Gene	11
1.7	Ziele der Arbeit	13
2	Materialien	14
2.1	Bakterienstämme und Isolate	14
2.2	Geräte	16
2.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.4	Puffer & Lösungen	18
2.5	Nährmedien und Antibiotika	19
2.5.1	Nährmedien	19
2.5.2	Antibiotika	19
2.6	Nukleinsäuren	20
2.6.1	Desoxynukleotide	20
2.6.2	<i>Primer</i>	20
2.6.3	Größenmarker	22
2.7	Enzyme	23
2.8	Molekulargenetische Kits	23

2.9	Software und Computer	24
3	Methoden	25
3.1	Arbeiten mit Bakterien	25
3.1.1	Lagerung von Bakterien	25
3.1.2	Kulturbedingungen	25
3.1.3	Photometrische Messung der Bakteriendichte	25
3.1.4	Herstellung eines Gesamtzelllysats	25
3.1.5	Silberresistenzprüfung	26
3.2	Pulsed-Field Gelelektrophorese (PFGE)	27
3.2.1	Einschließen der Bakterien in Agarose-Blöckchen	27
3.2.2	Lyse der Zellwände und Verdau durch Proteinase K	28
3.2.3	Verdau des bakteriellen Chromosoms	28
3.2.4	PFGE	28
3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
3.4	“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC)- und “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP) –PCR	31
3.5	Reinigung von PCR-Produkten	33
3.6	Gelelektrophorese	34
3.7	Sequenzierung	34
3.7.1	Dye-Terminator-Methode	35
3.7.2	DNA-Fällung	36
3.7.3	Sequenzierung	36
3.8	Subtraktive Hybridisierung	36
3.8.1	Präparation chromosomaler DNA	40
3.8.2	Präparation von Plasmid-DNA	41
3.8.3	Photometrische Messung von DNA-Konzentrationen	42
3.8.4	Verdau von DNA	42
3.8.5	Reinigung der verdauten DNA	43
3.8.6	Adaptor-Ligation	44

3.8.7	Erste Hybridisierung	44
3.8.8	Zweite Hybridisierung	45
3.8.9	PCR Amplifikation	45
3.9	TopoCloning	47
3.10	Phylogenetische Tests	49
3.10.1	Distanzanalyse	49
3.10.2	„Neighbour-joining“	49
3.10.3	„Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA)	50
3.10.4	„Bootstrapping“	50
3.11	Datenauswertung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Klinische Prävalenz der genetischen Cluster des <i>E. cloacae</i> Komplexes	52
4.1.1	Phylogenetische Untersuchung der <i>hsp60</i> -Sequenzen	52
4.1.2	Verlässlichkeitsprüfung der gefundenen genetischen Cluster	52
4.1.3	Prospektive Untersuchung der Prävalenz der verschiedenen Spezies und genetischen Cluster in der Klinik	54
4.1.4	Material-abhängige Häufigkeiten der Genotypen	55
4.2	Relevanz des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes für nosokomiale Infektionen	59
4.2.1	Validierung von Tests der Hygiene-Diagnostik im <i>E. cloacae</i> Komplex	59
4.2.2	Gegenüberstellung von Sequenzclustern und ERIC-PCR-Mustern	66
4.2.3	Ausbrüche	66
4.3	Subtraktive Hybridisierung	71
4.3.1	Subtraktive Hybridisierung der Stämme EN-373 und 501R3 (=163)	71
4.3.2	Subtraktive Hybridisierung der Stämmen EN-373 und E6 (=164)	74
4.3.3	IncHI-Plasmide	75
4.3.4	<i>Sil</i> -Determinante	76
4.3.5	Kontrolle mittels Suche nach „High Pathogenicity Island“	84
4.4	Die wichtigsten Ergebnisse im Überblick	86

5	Diskussion	87
5.1	Klinische Prävalenz der Genotypen des <i>E. cloacae</i> Komplexes	87
5.2	Assoziation der Genotypen mit bestimmten klinischen Materialien bzw. Erkrankungen	90
5.3	Anwendbarkeit hygienischer Testmethoden beim <i>E. cloacae</i> Komplex	91
5.3.1	Differenzierung mittels ERIC-PCR auf Genotypenebene	92
5.3.2	Differenzierung mittels REP-PCR auf Stammebene	93
5.3.3	Empfohlener Algorithmus in einer vermeintlichen Ausbruchssituation	94
5.4	Prävalenz klonaler Ausbrüchen mit dem <i>E. cloacae</i> Komplex	94
5.5	Subtraktive Hybridisierung zur Identifizierung von Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren	96
5.6	Silberresistenz als hygienischer Fitnessfaktor	99
5.6.1	Die <i>sil</i> -Determinante im <i>E. cloacae</i> Komplex	100
5.6.2	Plasmidale versus chromosomale Herkunft der <i>sil</i> -Determinante beim <i>E. cloacae</i> Komplex	103
5.6.3	Funktionalität der Silberresistenz	104
5.6.4	Prävalenz und Verteilung der <i>sil</i> -Determinante im <i>E. cloacae</i> Komplex	105
5.7	Bedeutung der Silberresistenz und Ausblick	107
6	Zusammenfassung	109
7	Literaturverzeichnis	112
8	Anhang	128
8.1	Homologien der <i>sil</i> -Sequenzen	128
8.2	Nukleinsäuresequenzen der <i>sil</i> -Gene	130
8.3	Abgeleitete Aminosäuresequenzen der <i>sil</i> -Gene	138
8.4	Klinische Studienstämme	141
9	Danksagung	145
10	Lebenslauf	147

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Unrooted Neighbour-joining Tree“ basierend auf der Analyse des Gens <i>hsp60</i> von 23 Isolaten des <i>E. cloacae</i> Komplexes (vom Klinikum Großhadern)	2
Abbildung 2: DNA-DNA-Hybridisierungsergebnisse: (A) Untersuchung von Grimont & Grimont ⁷¹ ; (B) Untersuchung von Lindh und Ursing ^{71,88,123}	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Ketten-Reaktion	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der ERIC- bzw. REP-PCR.	32
Abbildung 5: Überblick über die CLONTECH PCR-Select Methodik	37
Abbildung 6: Sequenzen der CLONTECH PCR-Select Adaptoren und <i>Primer</i>	38
Abbildung 7: Erste Hybridisierung der suppressiven subtraktiven Hybridisierung	39
Abbildung 8: Zweite Hybridisierung der suppressiven subtraktiven Hybridisierung	39
Abbildung 9: Verdau der chromosomale DNA für die subtraktive Hybridisierung	43
Abbildung 10: Elektrophorese der Produkte der PCRs der subtraktiven Hybridisierung	47
Abbildung 11: pCR [®] 2-1-TOPO-vector, 3.9 kb	48
Abbildung 12: „Neighbour-joining Tree“ nach Analyse des <i>hsp60</i> -Gens	53
Abbildung 13: Kreisdiagramm der Prävalenzen der Genotypen im Gesamtkollektiv aller 196 untersuchten Isolate.	54
Abbildung 14: Kreisdiagramme der Prävalenzen der Genotypen bei den verschiedenen klinischen Materialien	57
Abbildung 15: Identifikation der klonalen Isolate mittels PFGE	60
Abbildung 16: <i>hsp60</i> „Neighbour-joining Tree“ und UPGMA Tree der ERIC-PCR Bandenmuster von 56 prospektiv gesammelten klinischen Isolate des <i>E. cloacae</i> Komplexes	62
Abbildung 17: UPGMA Tree der REP-PCR Bandenmuster	64
Abbildung 18: UPGMA Tree (Pearson-Koeffizient) der ERIC-PCR Bandenmuster einer zufälligen Auswahl von 113 Stämmen aller Genotypen des <i>E. cloacae</i> Komplexes	67

Abbildung 19: UPGMA Tree der REP-PCR Bandenmuster aller Isolate aus dem 3-monatigen Zeitraum und aller Blutkulturisolate der untersuchten Jahre	69
Abbildung 20: RepHIA-PCR der Teststämme 373, 501R3 und E6	75
Abbildung 21: <i>sil</i> -Determinante mit den Genen <i>silP</i> ORF105 <i>silAB</i> ORF96 <i>silC</i> <i>silRS</i> <i>silE</i>	77
Abbildung 22: PCR über <i>silC</i> , <i>silP</i> , <i>silR</i> und <i>silS</i>	78
Abbildung 23: (A) Graphische Darstellung der <i>sil</i> -Determinante mit Darstellung der mittels PCR nachgewiesenen DNA-Abschnitte. (B) PCRs über <i>sil</i> -Determinante	79
Abbildung 24: Wachstumskurven der Teststämme in LB-Flüssigmedium in Abhängigkeit von der AgNO ₃ Konzentration	83
Abbildung 25: Wachstum der Teststämme auf LB-Agar in Abhängigkeit von der Silbernitrat-Konzentration	84
Abbildung 26: PCR <i>fyuA</i> der High Pathogenicity Island	85
Abbildung 27: Verdau <i>fyuA</i>	85
Abbildung 28: PCR <i>irp1</i> der Teststämme 456, 221 und 301	85
Abbildung 29 (A): Die genetische Organisation der <i>sil</i> -Determinante; (B) Silberresistenz Protein Produkte (nach Silver et al., 2003 ¹⁶⁶)	101
Abbildung 30: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silS</i> von ENAS 373 und pMG101	131
Abbildung 31: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silR</i> von ENAS 373 und pMG101	132
Abbildung 32: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silC</i> von ENAS 373 und pMG101	133
Abbildung 33: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silB</i> von ENAS 373 und pMG101	134
Abbildung 34: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silA</i> von ENAS 373 und pMG101	135
Abbildung 35: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von ORF105 von ENAS 373 und pMG101	136

Abbildung 36: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von <i>silP</i> von ENAS 373 und pMG101	137
Abbildung 37: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silS</i> von ENAS 373 mit pMG101	138
Abbildung 38: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silR</i> von ENAS 373 mit pMG101	138
Abbildung 39: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silC</i> von ENAS 373 mit pMG101	139
Abbildung 40: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silB</i> von ENAS 373 mit pMG101	139
Abbildung 41: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silA</i> von ENAS 373 mit pMG101	140
Abbildung 42: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von ORF105 von ENAS 373 mit pMG101	140
Abbildung 43: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>silP</i> von ENAS 373 mit pMG101	140

III. Abkürzungsverzeichnis

Abd	Abdomen
Abstr	Abstrich
Ag	Silber
AgNO ₃	Silbernitrat
AS	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
BK	Blutkultur
bp	base pairs, Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDC	Center of disease control
CIP	Collection de l'institut Pasteur
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid
CTP	Cytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DNA/ DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENAE	<i>Enterobacter aerogenes</i>
ENAM	<i>Enterobacter amnigenus</i>
ENAS	<i>Enterobacter asburiae</i>
ENCA	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
ENCL	<i>Enterobacter cloacae</i>
ENCL-CL	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
ENCL-DI	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>
ENCO	<i>Enterobacter cowanii</i>
ENDI	<i>Enterobacter dissolvens</i>
ENGE	<i>Enterobacter gergoviae</i>
ENHO	<i>Enterobacter hormaechei</i>
ENHO-HO	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>
ENHO-OH	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
ENHO-ST	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
ENIN	<i>Enterobacter intermedius</i>
ENKO	<i>Enterobacter kobei</i>
ENNI	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>
ENPY	<i>Enterobacter pyrinus</i>
ENSA	<i>Enterobacter sakazakii</i>
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
ESCO	<i>Escherichia coli</i>
Fe	Eisen
g	gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HAAL	<i>Hafnia alveii</i>

HKG	House-keeping Gen
HPI	High Pathogenicity Island
<i>hsp</i>	heat shock protein, Hitze-Schock Protein
i.e.	id est („das ist“)
Kath	Katheter
kb	Kilobasen
KbE	Kolonie bildende Einheit
kDa	kilo Dalton
KLPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Liter
LB	Luria Bertani
LEPN	<i>Legionella pneumoniae</i>
μ	micro
m	milli
M	Mega
MDa	Mega Dalton
min	Minute
MNI	Mittlere Nukleotid Identität
n	nano, Anzahl
NK	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Ketten Reaktion
PFGE	Pulsed-field Gelelektrophorese
PK	Positivkontrolle
REP	Repetitive extragenic palindromic
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Respirationstrakt
SAEN	<i>Salmonella enterica</i> Serotyp Enteritidis
SATM	<i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhimurium
SATY	<i>Salmonella enterica</i> Serotyp Typhi
sec	Sekunde
SH	Subtraktive Hybridisierung
SHFL	<i>Shigella flexneri</i>
SSH	Suppressive subtraktive Hybridisierung
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TE	Tris/ EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units, Einheiten
UGT	Urogenitaltrakt
UPGMA	“Unweighted pair group method with arithmetic mean”
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Wunde
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Es gibt kaum eine bakterielle Gattung, die so vielseitig ist wie das Genus *Enterobacter*. Es ist einzuordnen in der Familie der *Enterobacteriaceae*, wie z.B. auch *Salmonella enterica* oder *Escherichia coli*. Sein Vorkommen erstreckt sich von Bachläufen⁸⁰ und Pflanzen^{11,150} über Insekten⁴⁰ bis hin zum Gastrointestinaltrakt verschiedenster Säugetiere, einschließlich des Menschen. Das Genus *Enterobacter* ist aber nicht nur im Hinblick auf seine Lebensräume äußerst vielseitig. Es tritt als Krankheitserreger bei Tieren und Pflanzen auf, hat aber auch einen protektiven Effekt. Es gab z.B. Versuche, in denen seine Schutzwirkung auf Gurkensamen gegenüber Wasserschimmelarten nachgewiesen wurde¹⁵⁰. Für den Menschen besteht die Bedeutung des Genus *Enterobacter* in erster Linie in seiner Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen.

In diesem Zusammenhang gewann das Genus *Enterobacter* in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung^{52,60,88,159,183}. Die Daten des „National Nosocomial Infection Surveillance System Reports“² zeigten einen steten Zuwachs an Infektionen mit *Enterobacter* Arten. Im NNIS System Report vom Juni 1999 war das Genus *Enterobacter* für mehr als jede zehnte Pneumonie (11,2%) auf Intensivstationen verantwortlich. Damit standen Arten dieser Gattung an dritter Stelle hinter *Staphylococcus aureus* (18,1%) und *Pseudomonas aeruginosa* (17%). In derselben Studie zeigte sich, dass *Enterobacter* Arten jede zwanzigste auf Intensivstationen erworbene Bakteriämie (4,9%) und Harnwegsinfektion (5,1%) verursachten². Die entsprechenden Daten für Patienten auf pädiatrischen Intensivstationen waren ähnlich hoch oder höher (Pneumonien: 9,8%; Bakteriämien 6,8%; Harnwegsinfektionen 9,5%)¹⁶⁸. Das Genus *Enterobacter* war für jede zehnte postoperative Infektion verantwortlich und rangierte damit an fünfter Stelle hinter *Enterokokken* (15,3%), Koagulase-negativen *Staphylokokken* (12,6%), *Staphylococcus aureus* (11,2%) und *Pseudomonas aeruginosa* (10,3%)². In einer Studie über postoperative Peritonitiden verursachten *Enterobacter* Spezies 12% der untersuchten Infektionen¹⁵². Ebenso mehrten sich in den letzten Jahren die Berichte über Infektionen und Ausbrüchen mit *Enterobacter* Arten auf Verbrennungsstationen^{33,46,62,103,122,128,130,131,134}.

Die Letalität von Bakteriämien durch *Enterobacter* Arten bewegte sich mit 30% im selben Bereich wie die anderer Gattungen der Familie der *Enterobacteriaceae*^{16,17,45,159}. Bei Pneumonien durch *Enterobacter* Arten lag die Letalität in mehreren Studien mit 14-71% deutlich höher als die von den meisten anderen gram-negativen Erregern^{28,107,121,126,159}.

1.2 Systematik des *Enterobacter cloacae* Komplexes

Innerhalb der Gattung *Enterobacter* hat der *Enterobacter cloacae* Komplex die größte klinische Bedeutung. Dabei ist das, was in der Klinik als *E. cloacae* identifiziert wird, selten wirklich ein *E. cloacae*^{71,88,123}. Vielmehr versteckt sich hinter dem Phänotyp des Komplexes eine Vielzahl von Arten und Genovaren, i.e. Organsimen, die zwar ein distinktes genetisches Cluster darstellen, aber die Kriterien zur Definition einer Art nicht erfüllen. Diese Vielfalt wurde in Studien mit verschiedenen Methoden dargestellt, darunter Bio-, Sero- und Phagentypisierung^{50,192,194}, Pulsed-Field Gelelektrophorese und PCR-basierte Methoden^{30,52}.

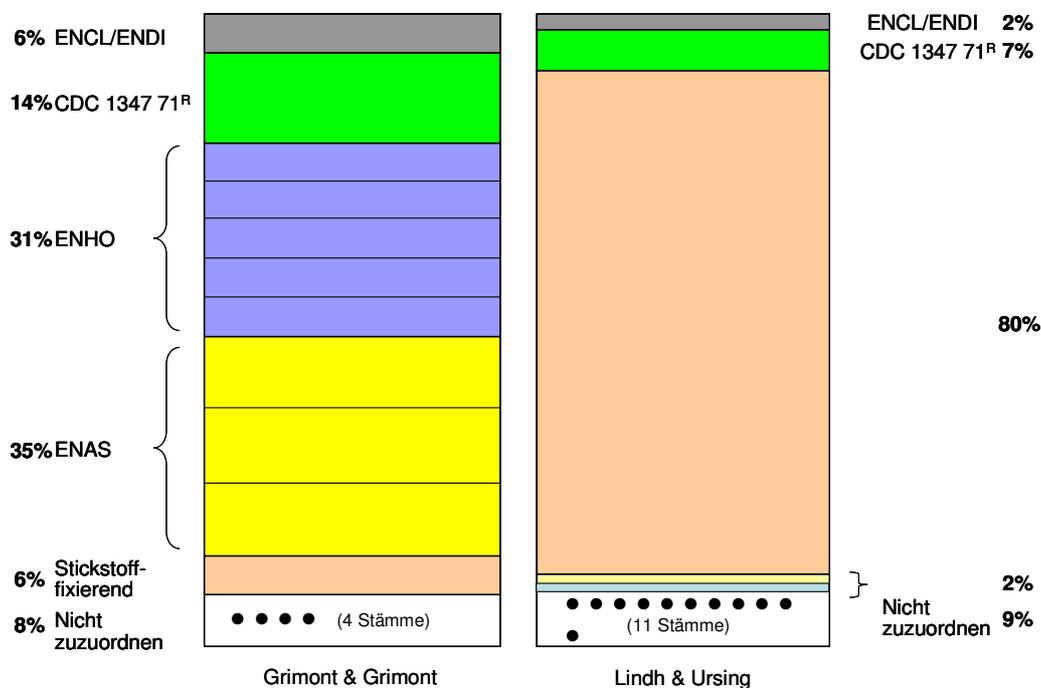


Abbildung 2: DNA-DNA-Hybridisierungsergebnisse: (A) (links): Untersuchung von Grimont & Grimont⁷¹ an Stämmen einer Stammsammlung des Institut Pasteur (CIP): Cluster um die Typstämme *E. cloacae* (ENCL) und *E. dissolvens* (ENDI) ■, den Referenzstamm CDC 1347 71^R ■, den Typstamm *E. hormaechei* (ENHO) ■ mit fünf Untergruppen, den Typstamm *E. asburiae* (ENAS) ■ mit drei Untergruppen und eine Gruppe Stickstoff-fixierender Stämme, die keinem bekannten Typ- oder Referenzstamm zuzuordnen waren ■. • Stämme ohne Zuordnung zu einer der Gruppen.

2 (B) (rechts): Untersuchung von Lindh & Ursing¹²³ an klinischen Isolaten: Cluster um die Typstämme *E. cloacae* (ENCL) und *E. dissolvens* (ENDI) ■, um den Referenzstamm CDC 1347 71^R ■. Eine Gruppe enthielt 80% der Stämme ohne Zuordnung zu einem bekannten Typ- oder Referenzstamm ■. ■ und ■ 2 weitere Gruppen ohne bekannten Typstamm, • Stämme ohne Zuordnung zu einer der Gruppen.

Bereits Anfang der 90er Jahre wurde der *Enterobacter cloacae* Komplex mittels DNA-DNA-Hybridisierung untersucht. Grimont & Grimont ⁷¹ beschrieben an einer retrospektiven Sammlung des Institut Pasteur fünf Cluster (Abbildung 2a), von denen eines die Typstämme *E. cloacae* und *E. dissolvens* enthielt, jedoch nur 6% der Studienstämme repräsentierte. 14% der untersuchten Stämme gruppieren sich um den Referenzstamm CDC 1347 71^R und konnten keiner damals bekannten Art zugeordnet werden. Ein drittes Cluster bildete sich um den Typstamm von *E. hormaechei*. Dieses Cluster umfasste 31% der Studienisolate und spaltete sich in fünf Untergruppen mit verschiedenen Biovarien auf. 35% der untersuchten Isolate bildeten ein viertes Cluster, das in drei Subgruppen zerfiel (4a, 4b und 4c) und den Typstamm von *E. asburiae* (Gruppe 4a) enthielt. Das fünfte Cluster enthielt keine bekannte Art und bestand ausschließlich aus Stickstoff-fixierenden Stämmen. Vier der untersuchten Stämme ließen sich keiner der fünf beschriebenen Gruppen zuordnen.

Lindh & Ursing ¹²³ beschrieben 1991 an einer Sammlung von 123 klinischen Isolaten aus einem Krankenhaus in Kopenhagen ebenfalls die beiden Cluster um *E. cloacae* / *E. dissolvens* und den Referenzstamm CDC 1347 71^R, die durch 2% bzw. 7% der Studienstämme vertreten waren. Sie beschrieben außerdem 11 (8.9%) nicht zuzuordnende Stämme und drei weitere Cluster, die keiner damals bekannten Art zugeschrieben werden konnten. Eines davon enthielt 80% der untersuchten Isolate (Abbildung 2b).

Im Gegensatz zu Grimont & Grimont ⁷¹ und Lindh & Ursing ¹²³, die genetische Verwandtschaft mittels DNA-DNA-Hybridisierung ermittelten, analysierten Hoffmann & Roggenkamp ⁸⁸ Stamm-Stamm-Verwandtschaften auf der Basis von Sequenzvergleichen Protein-kodierender Gene. 13 genetische Cluster konnten nach Vergleich von Abschnitten dreier Gene voneinander abgegrenzt werden. Bei diesen Genen handelte es sich um das *groEL* Homolog *hsp60*, das für das Hitze-Schock-Protein 60kDa kodiert, *rpoB*, dem Gen der β -Untereinheit der RNA-Polymerase, und *hemB*, das ein Enzym der Häm-Synthese (Porphobilinogen-Synthase) kodiert. Nur 3% der Isolate wurden dem Typstamm *E. cloacae* (Cluster XI) zugeordnet. 13% der untersuchten Stämme gruppieren sich um die Art *E. asburiae* (Cluster I), *E. cancerogenes*, *E. dissolvens* (Cluster XII), *E. hormaechei* (Cluster VII), *E. kobei* (Cluster II) oder *E. nimipressuralis* (Cluster X). Die restlichen 84% der Isolate bildeten sechs weitere genetische Cluster (III, IV, V, VI, VIII und IX) und eine instabile Sequenzgruppe (xiii). Diese sieben Gruppen konnten auf der Basis der Sequenzdaten keiner bekannten Art sicher zugeordnet werden ⁸⁸.

Wie schon in den früheren Studien konnte auch in neuen DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten gezeigt werden, dass *E. cloacae* und *E. dissolvens* zwar distinkte genetische Cluster bildeten, aber zur selben DNA-DNA-Hybridisierungsgruppe gehörten. Da phänotypisch unterschiedliche Genovare einer Spezies als Subspezies bezeichnet werden, wurde der Äskulin-positive (spaltet Äskulin mittels einer β -Glucosidase in Glucose und Äskuletin) *E. dissolvens* als neue Subspezies des Äskulin-negativen *E. cloacae* beschrieben: *E. cloacae* subsp. *dissolvens*⁸⁹. Aufgrund der DNA-DNA-Hybridisierungs-Untersuchungen wurde außerdem Cluster V mit dem Typstamm EN-119^T (=DSM =CIP) als neue Spezies beschrieben: *Enterobacter ludwigii*⁹¹.

Die Cluster VI und VIII und das Cluster VII um *E. hormaechei* wurden als drei neue Subspezies von *E. hormaechei* beschrieben: *E. hormaechei* subsp. *oharae*, *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* und *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*⁹⁰.

Die Speziesbeschreibungen von *E. asburiae* und *E. kobei* wurden erweitert⁸⁹: Als entscheidende Identifizierungsmerkmale für *E. asburiae* dienen eine positive Äskulinreaktion, und zur Abgrenzung von *E. cloacae* subsp. *dissolvens* Wachstum auf α -Laktose und fehlendes Wachstum auf Putreszin. *E. kobei* kann innerhalb des *E. cloacae* Komplexes klar durch einen negativen Äskulintest von *E. asburiae* und *E. cloacae* subsp. *dissolvens* und durch eine negative L-Fukose Reaktion von *E. hormaechei* abgegrenzt werden. Abgrenzung von *E. cloacae* subsp. *cloacae* ist durch unterschiedliche Verstoffwechslung von α -Laktose und 3-Hydroxybutyrat, sowie verschiedenes Wachstum in Kaliumcyanid (KCN) möglich. Weiterhin offen blieb die Taxonomie der Cluster III und IX sowie der Sequenzgruppe xiii.

Die Verteilung der Genotypen im Krankenhaus, deren klinische Relevanz und insbesondere Assoziationen der einzelnen Genotypen zu bestimmten nosokomialen Infektionen sind bislang völlig unklar. Eine Affinität bestimmter Genotypen zu spezifischen Infektionsherden könnte Hinweise auf spezielle Pathogenitätsfaktoren geben.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb im ersten Schritt ca. 200 Stämme einer prospektiv angelegten Sammlung von Isolaten des *E. cloacae* Komplexes aus dem Klinikum Großhadern mittels Sequenzierung eines Genabschnittes des Hitze-Schock-Protein Hsp60 den entsprechenden genetischen Gruppen des *E. cloacae* Komplexes zugeordnet und ihre Verteilung auf die einzelnen klinischen Materialien untersucht.

1.3 Bedeutung des *Enterobacter cloacae* Komplexes in der Krankenhaus-Hygiene

Noch vor drei Jahrzehnten wurde den Spezies des *Enterobacter cloacae* Komplexes nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt^{62,103,154,172} und ihr Platz eher unter den kolonisierenden Bakterien der Normalflora des Darms gesehen¹⁵⁴. Seit einigen Jahren häuften sich jedoch die Berichte über nosokomiale Infektionen mit Arten des *E. cloacae* Komplexes. Es gab kontroverse Meinungen darüber, ob die Infektionen endogener^{15,48,54,60,108,119,132,159,188} oder exogener^{12,37,60,79,82,179,180,182,191} Natur seien. Man vermutete¹⁰⁸, dass für eine Infektion durch den Keim, der zu 40-80% in der normalen Darmflora vorkommt, das Zusammentreffen von bakteriellen Virulenzfaktoren und prädisponierenden Wirtsfaktoren³⁹ nötig sei.

1.3.1 Antibiotika-Resistenzen im *Enterobacter cloacae* Komplex

Eine mögliche Erklärung für die zunehmende Häufigkeit von Infektionen ist die natürliche Ausstattung der Bakterien mit Antibiotika-Resistenzen.

Spezies des *Enterobacter cloacae* Komplexes besitzen eine Ambler Klasse C, Bush Klasse 1 β -Lactamase (AmpC). Dabei handelt es sich um eine chromosomal kodierte β -Lactamase, die eine natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin, Ampicillin plus Clavulansäure und Cefoxitin^{103,140} vermittelt. Die Expression dieser β -Lactamase ist durch β -Lactam-Antibiotika induzierbar. Die starke Expression der AmpC kann zusätzliche Resistenzen gegenüber Piperacillin, Piperacillin plus Tazobactam, Gruppe 2 und Gruppe 3 Cephalosporinen verleihen.

Darüber hinaus besitzen etwa 5% der Stämme des *E. cloacae* Komplexes „Extended Spectrum β -Lactamasen“ (ESBLs)⁹² und sind gegenüber allen Penicillinen und Cephalosporinen resistent.

Im „Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology System Report“ von 1999³ wurden bereits Resistenzraten von *Enterobacter* Arten gegenüber Cephalosporinen der Gruppe 3 von 36,2% auf pädiatrischen Intensivstationen, 25,3% auf allgemeinen Intensivstationen, 22,3% auf Normalstationen und 10,1% bei ambulanten Patienten berichtet.

Eine wohlüberlegte Anwendung von β -Lactam-Antibiotika sowie eine Resistenzprüfung im Einzelfall ist deshalb unbedingt vonnöten, um ein weiteres Ausbreiten multiresistenter

Bakterien des *E. cloacae* Komplexes zu verhindern und eine adäquate Therapie zu gewährleisten^{93,135,147}.

1.3.2 Klonale Ausbrüche

Immer wieder werden klonale Ausbrüche mit Arten des *E. cloacae* Komplexes aus verschiedenen Krankenhäusern geschildert^{9,39,103,106}. Vor allem Neugeborenen-Intensivstationen^{4,9,37,52,53,69,86,117,124,135,147,183,188,191,195} und Verbrennungsstationen^{33,46,62,62,103,122,128,130,131,134} sind häufig betroffen.

Derartige Ausbrüche sind oft schwer zu beherrschen^{4,37,53,103,135}, gehen mit hoher Letalität einher^{62,117,128} und stellen ein erhebliches Hygiene-Problem dar. Unbekannt ist bislang, wie oft Ausbrüche mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes tatsächlich im Krankenhaus vorkommen. Dies wurde in der vorliegenden Studie anhand aller Blutkulturisolate über einen Zeitraum von fünf Jahren sowie einer repräsentativen Auswahl aller anderen Isolate über einem Zeitraum von drei Monaten im Klinikum Großhadern untersucht.

1.3.3 Methoden zum Nachweis klonaler Ausbrüche

Zur Identifizierung klonaler Ausbrüche gibt es verschiedene Methoden. Die Pulsed-Field Gelelektrophorese (PFGE) wird als Goldstandard für die molekulare Typisierung von Bakterien angesehen^{143,178}. Bei dieser Methode wird das gesamte bakterielle Chromosom im Agarblock mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Dabei entstehen je nach Lage und Anzahl der entsprechenden Schnittstellen auf dem Genom verschieden lange DNA-Fragmente. Mittels Elektrophorese in einem pulsierenden Spannungsfeld können Fragmente in einer Größenordnung von 10 bis 100 kb klar separiert werden^{143,178}. Die so entstandenen Bandenmuster werden als spezifisch für das jeweilige Isolat angesehen und können mit anderen Isolaten verglichen werden. Gemäß der Definition von Tenover¹⁷⁸ gehören Isolate mit identischen Mustern zu demselben Stamm. Isolate mit einer genetischen Differenz, d.h. zwei bis drei Fragmentdifferenzen, gelten als „nahe verwandt“, d.h. sie stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt von demselben Stamm ab und sind damit „wahrscheinlich am Ausbruch beteiligt“. Die PFGE ist eine stark diskriminative Methode und hat gezeigt, dass sie den meisten anderen Methoden zur molekularen Typisierung überlegen ist. Ein Nachteil ist, dass sie sehr arbeits- und kostenintensiv ist.

Versalovic et al. beschrieben 1991¹⁸⁷ eine Methode zur Typisierung bakterieller Genome, die auf PCR-Amplifikation repetitiver DNA Elemente basiert. Die Autoren verwendeten dabei zwei Haupttypen von repetitiven Elementen: die „repetitive extragenic palindromic (REP) elements“ und die „enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences“. Bei beiden handelt es sich um kurze Sequenzabschnitte, die auf dem Genom aller Arten der Familie der *Enterobacteriaceae* vorhanden sind, jedoch bei verschiedenen Stämmen in unterschiedlicher Lokalisation und Anzahl vorkommen. Mit entsprechend komplementären *Primern* können die DNA Abschnitte zwischen den repetitiven Elementen amplifiziert werden. Man erhält so verschieden lange inter-REP oder inter-ERIC Fragmente, die, wenn sie elektrophoretisch aufgetrennt werden, spezifische Bandenmuster ergeben. Limitierend ist hierbei allerdings die Extensionsgrenze der Polymerase, d.h. inter-REP bzw. inter-ERIC Fragmente von über ca. 2,5 kb werden nicht mehr amplifiziert. Mittlerweile wurden noch weitere PCR-basierte Methoden beschrieben, um einen genetischen Fingerabdruck zu erstellen^{143,151,176}. Nur wenige wurden bislang beim *E. cloacae* Komplex angewendet. Im Gegensatz zur PFGE, sind die PCR-basierten Methoden relativ preiswert, leicht durchzuführen und liefern schnell Ergebnisse.

Unklar ist aber bislang noch, inwiefern die Methoden innerhalb des *E. cloacae* Komplexes tatsächlich auf Stammebene differenzieren. In einigen Studien wurden die PCR-basierten Methoden zwar als sehr diskriminativ beschrieben, hierbei wurde jedoch die Heterogenität des Komplexes nicht berücksichtigt. Deshalb wäre es möglich, dass die Isolate der entsprechenden Studien zu unterschiedlichen Genotypen des Komplexes gehörten und somit nicht auf Stammebene, sondern vielmehr auf der Ebene von Genotypen unterschieden wurde. Eine Validierung der Anwendbarkeit dieser Methoden zur Differenzierung einzelner Stämme innerhalb des *E. cloacae* Komplexes steht also noch aus. Nur damit kann eine verlässliche Untersuchung der Häufigkeit von Ausbrüchen erfolgen. So wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst anhand von zwei repräsentativen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes die Anwendbarkeit der PCR-basierten Methoden analysiert, und anschließend die Stammsammlung auf klonale Ausbrüche hin untersucht.

1.4 Klinische Risikofaktoren für Infektionen mit *Enterobacter* Arten

Obwohl auch ambulant erworbene Infektionen mit Arten des *E. cloacae* Komplexes beschrieben worden waren, war die überwiegende Mehrheit bisher beschriebener Infektionen

nosokomialer Genese^{103,107}. Patienten, die längere Zeit im Krankenhaus verbrachten, v.a. auf Intensivstationen, hatten ein erhöhtes Risiko an Infektionen durch den *E. cloacae* Komplex zu erkranken^{7,23,54,132,146}. Außerdem spielte die Schwere der Grunderkrankung eine entscheidende Rolle. Besonders Malignome, Verbrennungswunden und Diabetes mellitus erhöhten das Risiko für eine Infektion^{27,28,59,103,190,193}. Prädisponierend zeigten sich weiterhin Immunsuppression jeglicher Art, Frühgeburtlichkeit und zerstörte oder überbrückte natürliche Barrieren, wie sie bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, bei Verbrennungen und „medical devices“, z.B. zentralen Venenkatheter, Blasenkatheatern oder Endotrachealtuben vorkommen^{7,9,78,131,132,146,159,191,193}.

Der einzige unabhängige Risikofaktor für eine Infektion mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes, der bislang in Studien bewiesen wurde, ist allerdings eine vorangegangene Antibiotika-Therapie, vor allem mit Cephalosporinen der Gruppe 3. Die intensive Anwendung von β -Lactam Antibiotika fördert Resistenzentwicklung durch Selektion von induzierten AmpC-Bildnern (siehe 1.3.1)^{54,103,132,135}, führt zu vermehrter Kolonisation mit Mitgliedern des *Enterobacter cloacae* Komplexes^{37,58,155} und zu einer erhöhten endogenen Infektionsgefahr durch multiresistente Keime^{48,54}.

Dadurch wird die Behandlung mit Antibiotika, v.a. mit Gruppe 3 Cephalosporinen zu einem der Hauptrisikofaktoren für die Kolonisation und Infektion mit dem *E. cloacae* Komplex^{7,16,23,27,104,146,193}.

Studien belegen, dass wohlüberlegter und reduzierter Einsatz von Cephalosporinen die Inzidenz nosokomialer Infektionen mit multiresistenten *Enterobacter* Spezies verringern konnte und zu einer geringeren Mortalität durch *Enterobacter* Bakteriämie führte^{27,54,132}.

1.5 Das geringe Wissen über Fitness- und Pathogenitätsfaktoren beim *E. cloacae* Komplex

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, die das bakterielle Überleben sichern und Pathogenität von Mikroorganismen bedingen. Unter Fitnessfaktoren versteht man insbesondere solche Faktoren, die das bakterielle Überleben in der Umwelt erleichtern und damit einen Selektionsvorteil bieten. So wird es solchen Erregern ermöglicht Infektionen bei abwehrgeschwächten Patienten hervorzurufen. Zu diesen Faktoren gehören Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika oder Antiseptika, die Fähigkeit Biofilme zu bilden oder auch die vereinfachte Aufnahme essentieller Substanzen wie die Aufnahme von

Eisen. Welche Faktoren jedoch für die Fitness und Pathogenität des *E. cloacae* Komplexes verantwortlich sind, wurde bislang wenig untersucht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Stämme des *E. cloacae* Komplexes unter Eisenmangel zwei Siderophore (Enterochelin und Aerobactin) produzieren. Dabei handelt es sich um kleine Moleküle, die mit hoher Affinität Fe^{3+} binden^{19,41}. Sie werden in die Umgebung abgegeben, binden Fe^{3+} und werden wieder aktiv in die Zelle aufgenommen. Insbesondere in Bereichen, in denen wenig freies Fe^{3+} zur Verfügung steht, sind Siderophore von Bedeutung. So wird die Versorgung mit dem für Wachstum und Virulenz essentiellen Faktor Eisen gewährleistet^{31,108,184,185}. Eine häufige Quelle für Eisen ist auch die Aufnahme von Häm⁶³. Erst kürzlich wurde das Hämaufnahmesystem eines Stammes des *E. cloacae* Komplexes von Roggenkamp et al. kloniert, sequenziert und teilweise charakterisiert¹⁵³.

Es gab einige Studien, in denen bekannte Toxine auch bei *Enterobacter* Arten nachgewiesen wurden^{13,112-114,162,167}. Darunter waren ein dem Cholera toxin verwandtes Enterotoxin¹¹³, ein Hämolyysin, das Hämorrhagien und schwere histologische Veränderungen bei Ratten verursachte¹⁶⁷, und Saxitoxin, ein paralytisches Toxin, das zur Blockierung nervaler Natriumkanäle fähig ist und mit einer Erkrankung bei Rindern, dem sogenannten „Bovinen Paraplegischen Syndrom“ (BPS), assoziiert ist³⁸.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit zur Hämagglutination^{5,108}, die Adhärenz an humanen Zelllinien¹²⁵ und die Fähigkeit zur Penetration von Epithelbarrieren bei *Enterobacter cloacae* gezeigt¹⁰⁸.

Keller et al.¹⁰⁸ konnten neben Aerobactin-Produktion, Hämagglutination und Invasion von *E. cloacae* in humane Zelllinien in 50 von 54 Teststämmen Serumresistenz nachweisen. Einer der Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems führt durch Kontakt mit Lipopolysacchariden der Bakterienmembran (alternativer Weg) zur Aktivierung des Komplementsystems. Dadurch kommt es zu einer komplement-abhängigen Lyse der Bakterienmembranen, einem Zusammenbruch der Membrantransportfunktionen und dadurch zum Tod der Bakterien. Durch spezielle Oberflächenbeschaffenheit der Mikroorganismen wird die Interaktion mit der Komplementkomponente C3b im Blut verhindert und damit das terminale Komplementsystem nicht aktiviert. Die Bakterien können im Blut überleben und sind serumresistent.

Alle bisherigen Untersuchungen zu Pathogenitätsfaktoren beim *E. cloacae* Komplex versuchten unter Enterobakterien verbreitete Toxine und Oberflächenproteine in Einzelfällen

auch bei *Enterobacter* nachzuweisen. Studien zur Prävalenz, Verteilung und praktischen Bedeutung einzelner Faktoren innerhalb des *E. cloacae* Komplexes fehlen bislang völlig. Hierbei stellt sich nicht nur die Frage, welche Faktoren den Vertretern des *E. cloacae* Komplexes ihre Pathogenität verleihen, sondern auch ob diese Faktoren im Hinblick auf die Heterogenität des Komplexes in Zusammenhang mit der Verteilung der einzelnen Genotypen im Krankenhaus stehen. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt nach Unterschieden zwischen pathogenen und apathogenen Vertretern einer Stammsammlung des *E. cloacae* Komplexes gesucht.

1.6 Methoden zum Auffinden Pathogenitäts-assoziiertes Gene

Im Jahr 1990 wurde erstmals eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, genetische Unterschiede zwischen virulenten und avirulenten Stämmen einer Spezies mittels Subtraktionshybridisierung herauszuarbeiten. So können mit Hilfe der so genannten „subtraktiven Hybridisierung“ (SH) ^{173,196} Pathogenitätsfaktoren auf DNA-Ebene aufgespürt werden. Seither wurden unterschiedliche Subtraktionsmethoden beschrieben.

Grundsätzlich wird dabei die DNA eines apathogenen Stamms (*Driver*) mit der eines sehr nah verwandten pathogenen Stamms (*Tester*) hybridisiert. Nach Entfernung der identischen DNA-Abschnitte bleiben die Gene übrig, die nur der pathogene Stamm besitzt.

1990 wurde die so genannte Festphasentechnik entwickelt. Biotinylierte einzelsträngige *Driver*-DNA wurde durch Avidin gebunden und an der Gefäßwand immobilisiert. Nicht-gelabelte *Tester*-DNA wurde zugegeben und hybridisiert. Im Überstand blieb *Tester*-spezifische DNA übrig, die kloniert und sequenziert wurde ¹⁷³. Alternativ konnte der Bindungsschritt auch durch Hydroxylapatit Chromatography ⁸⁴ oder oligo(dT)₃₀-Latex Beads ⁸¹ ersetzt werden. Nachteile der Festphasentechniken waren ihre Ineffektivität bei Genen, die in niedriger Konzentration vorlagen, eine relativ große Menge an benötigtem Startmaterial ($\geq 40\mu\text{g}$ DNA) und mehrfach zu wiederholende Subtraktionsschritte ^{1,35}.

Eine andere Technik, die diese Nachteile nicht aufweist, ist die PCR-basierte Form der subtraktiven Hybridisierung, die sogenannte „suppressive subtraktive Hybridisierung“ (SSH). Hierbei wird die *Tester*-DNA mit zwei verschiedenen Adaptoren ligiert und dann mit *Driver*-DNA hybridisiert. In einer anschließenden PCR werden nur DNA-Fragmente mit Adaptoren an beiden Enden exponentiell vervielfältigt. Die Amplifikation von DNA mit demselben Adapter an beiden Enden wird mit Hilfe des PCR-Suppressionseffekts ^{25,35,127,165} unterdrückt.

Der Effekt beruht darauf, dass lange, inverse DNA-Enden eine starke Affinität zur Ringbildung haben, wodurch die *Primer*-Bindung verhindert wird. So werden bei der suppressiven subtraktiven Hybridisierung die erwünschten DNA-Fragmente selektiv amplifiziert. Die Vervielfältigung der unerwünschten DNA-Abschnitte wird gleichzeitig unterdrückt.

Bei der PCR-basierten Form ist nur eine Subtraktionsrunde nötig, bereits 2µg DNA sind ausreichend, und es kann eine hohe Effektivität erzielt werden. Initial wurde die Methode 1996³⁵ beschrieben und bei Bakterien erstmals 1998 in einer *Helicobacter pylori* Studie eingesetzt⁶. Seither wurde die SSH erfolgreich bei verschiedenen Spezies angewendet.

Parsons et al.¹⁴⁵ nutzten sie, um bei einem multiresistenten und bei Mukoviszidose-Patienten weit verbreiteten *Pseudomonas aeruginosa* Stamm Gene zu finden, die ihn von anderen *P. aeruginosa* Stämmen unterschieden. Srinivasan et al.¹⁷¹ untersuchten uropathogene *Escherichia coli* Stämme auf Virulenzfaktoren, die im Zusammenhang mit den verursachten Harnwegsinfektionen standen. Sorsa et al.¹⁷⁰ identifizierten 2003 mit Hilfe der SSH Virulenz-assoziierte Loci bei uropathogenen *Escherichia coli*. In der vorliegenden Arbeit wurde die suppressive subtraktive Hybridisierung angewandt, um gezielt genetische Unterschiede zwischen nah verwandten pathogenen und apathogenen Stämmen des *E. cloacae* Komplexes zu identifizieren. Anschließend wurde die Verteilung entsprechender Faktoren innerhalb des *E. cloacae* Komplexes untersucht.

1.7 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen in Bezug auf den *Enterobacter cloacae* Komplex bearbeitet werden:

1. Welche klinische bzw. Krankenhaus-hygienische Bedeutung kommt jeder einzelnen Spezies und jedem genetischen Cluster zu? Dies wurde anhand einer prospektiv angelegten Sammlung von Isolaten des Klinikums Großhadern untersucht. Als Indikatoren wurde die Prävalenz der Genotypen in repräsentativen Stichproben von Isolaten aus der Routine Diagnostik des Klinikums zwischen 1997 und 2002 gewählt.
2. Inwiefern können PCR-basierte Methoden (ERIC- und REP-PCR) zur Stammdifferenzierung innerhalb des *E. cloacae* Komplexes und zum Nachweis von klonalen Ausbrüchen angewendet werden? Dies wurde anhand zweier Genotypen untersucht.
3. Wie häufig kommen klonale Ausbrüche mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum Großhadern vor? Um der Fragestellung nachzugehen, wurden alle Blutkultur-Isolate des *E. cloacae* Komplexes aus fünf Jahren und eine repräsentative Stichprobe der Varia-Isolate genetisch charakterisiert und klonale Ausbrüche ermittelt.
4. Welche molekularen Faktoren verleihen den Stämmen des *E. cloacae* Komplex seine Krankenhaus-hygienische Bedeutung? Wie sind diese Faktoren bei den einzelnen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes verteilt? Mit Hilfe der Methode der subtraktiven Hybridisierung wurde nach Fitness- bzw. Pathogenitätsfaktoren gesucht, die die steigende Prävalenz des *E. cloacae* Komplexes als nosokomialer Erreger erklären könnten. Die Verteilung in den einzelnen Genotypen wurde untersucht, und nach einem Zusammenhang mit der unterschiedlichen Prävalenz der Genotypen in der Klinik gesucht.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme und Isolate

Es wurden 196 *Enterobacter*-Isolate von Patienten des Klinikums München-Großhadern aus dem Zeitraum von 1997 bis 2002 untersucht (siehe Tabelle 24 im Anhang 8.4). Darin enthalten waren alle Blutkulturisolat des *E. cloacae* Komplexes, die von 06/1997 bis 06/2002 im Universitätsklinikum München-Großhadern isoliert wurden. Die Blutkulturisolat machten insgesamt 67 der 196 Studienisolate aus. Die restlichen 129 Studienisolate wurden von 2000 bis 2002 randomisiert gesammelt, indem eine Laborhilfskraft an ca. zwei Tagen pro Woche alle aus Patientenmaterial des Klinikums Großhadern isolierten *E. cloacae* der Sammlung zuführte. Diese waren mittels API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) als Isolate des *E. cloacae* Komplexes identifiziert worden. Dabei wurde physiologischen Eigenschaften und Resistenzkriterien keine Beachtung geschenkt. Die 129 Studienstämme umfassten 59 Isolate aus dem Respirationstrakt, 21 aus dem Urogenitaltrakt, 13 aus dem Gastrointestinaltrakt, sieben intraabdominelle Isolate, acht Katheter-assoziierte Isolate, 19 Isolate von Haut- bzw. Wundabstrichen und zwei Isolate aus Pleurapunktaten. Bei der Studie wurde jeweils nur das erste Isolat jedes Patienten berücksichtigt. Eine Untergruppe des Studienkollektivs entsprach 55% der gesamten Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes im Zeitraum von 11/2001 bis 02/2002. Zwei Isolate (268 und 425) waren von demselben Patienten isoliert worden und dienten als interne Kontrolle bei der Klonalitätsprüfung.

Aus der internationalen *Enterobacter* Stammsammlung, bestehend aus 241 Stämmen aus 23 Ländern (vergleiche Hoffmann & Roggenkamp⁸⁸), wurden als Repräsentanten der genetischen Cluster ohne Typstamm die Stämme EN18, EN25, EN28, EN30, EN114, EN117 und EN119 herangezogen. Weiterhin wurden die Isolate EN363, EN364, EN520 und EN524 aus der internationalen Stammsammlung analysiert (siehe Tabelle 24 im Anhang 8.2).

Die 14 in Tabelle 1 aufgeführten *Enterobacter*-Typstämme wurden verwendet. Als zusätzliche Referenz für die genetische Gruppe 2 von Lindh und Ursing¹²³ und Grimont & Grimont⁷¹ (vergleiche Einleitung 1.2) diente der Referenzstamm CDC 1347 71^R.

Tabelle 1: Verwendete Typstämme des Genus *Enterobacter* mit zugehörigen ATCC-/ CIP-Nummern

Spezies	ATCC ¹ / CIP ² Nummer
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048 ^T
<i>Enterobacter asburiae</i>	ATCC 35953 ^T
<i>Enterobacter kobei</i>	ATCC BAA-260 ^T
<i>Enterobacter hormaechei</i>	ATCC 49162 ^T
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	ATCC 9912 ^T
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047 ^T
<i>Enterobacter dissolvens</i>	ATCC 23373 ^T
<i>Enterobacter amnigenus</i>	ATCC 3072 ^T
<i>Enterobacter cancerogenes</i>	ATCC 33241 ^T
<i>Enterobacter cowanii</i>	CIP 107300 ^T
<i>Enterobacter gergoviae</i>	ATCC 33028 ^T
<i>Enterobacter intermedius</i>	ATCC 33110 ^T
<i>Enterobacter pyrinus</i>	ATCC 49851 ^T
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544 ^T

¹ATCC: American Type Culture Collection, ² Collection de l'institut Pasteur

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die Stämme der Tabelle 2 verwendet: *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α mit Plasmid pMG101 (S. Silver, Chicago, USA) und die Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes 163 (=501R3), 164 (=E6) (D.P. Roberts, Beltsville, USA), die von Pflanzen isoliert worden waren, und 373 (V. Fernandez-Baca, Palma de Mallorca, Spanien), der drei Frühgeborene auf einer Intensivstation auf Mallorca infiziert hatte. Als Spezies-fremde Referenz diente ein *Citrobacter koseri* Isolat (53) aus der Stammsammlung des Max von Pettenkofer-Institutes, Nebenstelle München-Großhadern.

Für die Klonierungen wurden kompetente Zellen des Stammes *Escherichia coli* TOP-10 benutzt (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Stämme für molekulargenetische Arbeiten

Stamm	Spezies	Genetik	Plasmid	Referenz
<i>Escherichia</i>				
DH5 α	<i>E. coli</i>	<i>supE44, lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	-	Stammsammlung Pettenkofer-Inst., München
DH5 α pMG101	<i>E. coli</i>	<i>supE44, lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	pMG101	Simon Silver, Chicago, USA
TOP10	<i>E. coli</i>	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZM15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	-	Invitrogen BV
<i>Enterobacter</i>				
501R3 (=163)	<i>E. asburiae</i>	Spontaneous rif ^r mutant of <i>E. cloacae</i> Ec CT501	nicht bekannt	D.P. Roberts, Beltsville, USA
E6 (=164)	<i>E. asburiae</i>	Nicht bekannt	nicht bekannt	D.P. Roberts, Beltsville, USA
373	<i>E. asburiae</i>	Nicht bekannt	nicht bekannt	S. Alberti, Palma de Mallorca, Spanien
53	<i>Citrobacter koseri</i>	Nicht bekannt	nicht bekannt	Stammsammlung Pettenkofer-Inst., München

2.2 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaagen	AT 261 Delta Range PN 323	Mettler Mettler
Autoklav	Varioklav	H + P Labortechnik
Brutschränke	B12	Haereus, Hanau
Elektrophoresekammern	Modell 200/ 2.0 Power Supply Power Pac 200	BioRad, Bioplastics BioRad, Bioplastics
Gelbild-Drucker	P91D	Mitsubishi
Heizblöcke	Typ 5012 6101	Liebisch
Hybridisierungsöfen	OV 3	Biometra
Mix-Quirl	Vortex-Genie 2	Sientific Industries
PCR-ThermoCycler	GeneAmp PCR System 2700 GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt PE Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter	Digital pH-Meter	Knick
Photoanlage	UV-Systeme 312 nm	Intas
Photometer	Ultraspec 3100pro	Amersham Biosciences
Pipetten	P10-P5000 P10-P1000	Eppendorf, Hamburg Gilson
Pulsfeld-Controller	GN Controller	Pharmacia
Pulsfeld-Kammer	Gene Navigator	Pharmacia
Schüttler	Celloshaker Variospeed	Chemetron
Schüttelinkubatoren	Thermomixer compact Orbital Shaker 420 Orbital Inkubator S150	Eppendorf, Hamburg Forma Scientific Stuart Scientific
Sequenziermaschine	ABI 377 DNA Sequenzer	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Spannungsquellen	Model 200/2.0 Power Pac 200	BioRad BioRad
Sterilwerkbank	Lamina Air HBB 2436	Haereus
Transilluminator		Intas
Umwälzpumpe	Multitemp II	Pharmacia LKB
Zentrifugen	1K 15 3K 30 Megafuge	Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Haereus

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Substanz	Beschreibung	Hersteller
Agarose	Seakem LE Agarose InCert Agarose Seakem Agarose Gold	Cambrex BMA Cambrex
Aqua dest. (H ₂ O)	Deionisiertes H ₂ O für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg
Brain-Heart Infusion (BHI)		Oxoid
Borsäure (H ₃ BO ₃)		Merck
Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Indikator pH: 3.0-4.6	Merck
Chloroform (CHCl ₃)		Merck, Darmstadt
CTAB (C ₁₉ H ₄₂ BrN)	Cetyltrimethylammoniumbromid 10% CTAB in 0,7% NaCl	Acros
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Ethylendiamintetraacetat; 0,2M	Serva, Heidelberg
Einmalküvetten		Brand
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	90%	Merck
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	1 mg/ml	BioRad
Glaspipetten		Eppendorf
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)		Acros
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	87%	Merck
Isoamylalkohol (C ₅ H ₁₂ O)		Merck
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	70%	Merck
Kaliumchlorid (KCl)		Merck
Laurylsarcosine (C ₁₅ H ₂₉ NO ₃)		Sigma
Magnesiumchlorid (Cl ₂ Mg)	25mM	Fermentas
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)		Acros
Natronlauge (NaOH)	1M	Merck
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	3M	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	5M	Merck
Nukleotidmix (dNTPs)	100mM, 25µmol	Fermentas
Parafilm	Parafilm „M“	American National Can
PCR-Tubes	0,2ml	Applied Biosystems
Phenol (C ₆ H ₆ O)	Tris gepuffert, pH 8.0	Biomol
Pipettenspitzen	P10 - P5000	Brand
Polyethylenglykol ([C ₂ H ₄ O] _x)	50% PEG4000 Solution	Fermentas
Salzsäure (HCl)	37%	Merck
SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Natriumlaurylsulfat; 10%	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃)	67,96 mg in 10 ml H ₂ O=40mM; FW:169,9	Sigma
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Trypton	2%	Merck
Tubes	1,5ml und 2ml 10ml 50ml	Brand Sarstedt Necton-Dickinson
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside	Sigma
Yeast Extract	0,5%	Oxoid

2.4 Puffer & Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Fertigpuffer

Lösung /Puffer	Zusammensetzung	Firma
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit		Applied Biosystems
Enzympuffer (Tango Y+)	33mM TrisAcetat (pH 7.9 bei 37°C) 10mM MgAcetat 66mM Kaliumacetat 0.1mg/ml BSA	Fermentas
10X Ligationspuffer	400mM Tris-HCl 100mM MgCl ₂ 100mM DTT 5mM ATP (pH 7.8 bei 25°C)	Fermentas
PCR-Puffer (10X)	15mM MgCl ₂ 100mM Tris-HCl 500mM KCl 0,01% (w/v) Gelatine pH 8,3	PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Tabelle 6: Zusammensetzungen selbstgemischter Puffer und Lösungen

Lösung /Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
DNA-Probenpuffer	25mg Bromphenolblau 2,4ml Glycerin ad 10ml mit Aqua dest.	Merck Merck Fresenius
Lyse-Puffer	Laurylsarcosine (10%) EDTA (0,75M; pH 9) Aqua dest	Sigma Serva Fresenius
TAE-Puffer (50X)	0,4M Tris 0,2M NaAcetat 20mM EDTA, pH 7,4 ad 1000ml mit H ₂ O	Merck Merck Serva Fresenius
TBE-Puffer (10X)	108g Tris 55g Borsäure 40ml 0.5M EDTA, pH 8.0 ad 1000ml mit H ₂ O	Merck Merck Serva, Heidelberg Fresenius
TE (pH 7,5)	10mM Tris 5mM EDTA, pH 7,5 ad 1000ml mit H ₂ O	Merck Serva, Heidelberg Fresenius
TE (pH 8,0)	10mM Tris 1mM EDTA, pH 8,0 ad 1000ml mit H ₂ O	Merck Serva, Heidelberg Fresenius
TN-Puffer (pH7.5)	10mM Tris 150mM NaCl ad 1000ml mit H ₂ O	Merck Merck Fresenius

2.5 Nährmedien und Antibiotika

2.5.1 Nährmedien

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren (121°C, 1bar, 20 min). Festmedien entstanden durch Zugabe von 15g Agar pro Liter Medium. Blutagarplatten (BD Columbia 5% SB) wurden direkt von BioMerieux bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung	Hersteller
Luria-Bertani-(LB)-Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 5g NaCl ad 1L H ₂ O _{dest} pH 7,4 - 7,6 mit NaOH einstellen	Merck Oxoid Merck Fresenius Merck
Luria-Bertani-(LB)-Medium ohne NaCl	10g Trypton 5g Hefeextrakt ad 1L H ₂ O _{dest} pH 7,4 - 7,6 mit NaOH einstellen	Merck Oxoid Fresenius Merck
Brain-Heart-Infusion-(BHI)-Medium	37g BHI-Fertigpulver Ad 1L H ₂ O _{dest}	Oxoid Fresenius
SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Yeast Extrakt 10mM NaCl 2.5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glucose ad 6ml H ₂ O	Merck Oxoid Merck Merck Fermentas Acros Acros Fermentas

2.5.2 Antibiotika

Das verwendete Antibiotikum wurde in H₂O gelöst, sterilfiltriert (0,22µm), 1:1 mit Ethanol (96%) verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Stammlösung wurde in 1:100 Verdünnung den entsprechenden Medien zugegeben.

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Firma	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	Sigma	50% Ethanol	10	100

2.6 Nukleinsäuren

2.6.1 Desoxynukleotide

Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) wurden als 100mM Lösung von Fermentas bezogen.

2.6.2 *Primer*

Die PCR-*Primer* (lyophilisiert, entsalzt) wurden von Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die verwendeten *sil-Primer* basierten auf konservierten Regionen der Alignments der entsprechenden Gen-Homologien verschiedener Enterobakterien. Die Sequenzen der folgenden GenBank Accession Nummern wurden dazu verwendet: *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (AF067954), *Escherichia coli* (AY214164), *Serratia marcescens* (BX664015) und *Klebsiella pneumoniae* (AP006726).

Tabelle 9: Verwendete Primer

Primer	5`-.....3`-Sequenz	Beschreibung bzw. Referenz	T _{max}
HSP-1218-F	GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC	Hoffmann et al., 2003	61.7°C
HSP-1559-R	ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG	Hoffmann et al., 2003	63.5°C
REP1R-I *	IIICGICATCIGGC ***	Versalovic et al., 1991	53.7°C
REP2-I *	ICGICTTATCIGGCCTAC ***	Versalovic et al., 1991	53.7°C
ERIC1-R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Versalovic et al., 1991	61.6°C
ERIC2	AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG	Versalovic et al., 1991	63.5°C
PCR Primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Clontech	59.7°C
Nested Primer1	TCGAGCGCCGCCCGGGCAGGT	Clontech	74.9°C
Nested Primer2	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	Clontech	65.5°C
Adaptor 1	5`-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3` 3`-GGCCCCGTCCA-5`	Clontech	
Adaptor 2R	5`-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3` 3`-GCCGGCTCCA-5`	Clontech	
M13-F	GTA AACGACGGCCAG	391-406 auf Vektor pCR@2.1-TOPO	46.7°C
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	205-221 auf Vektor pCR@2.1-TOPO	46.6°C
RepHIA-F	ACCTTTCTTAACYTCTTGATA ***	SEMA pR478 Position 813-793 (BX664015)	51.2°C
RepHIA-R	TGTGGTATCAGTTCWACAAACAT ***	SEMA pR478 Position 364-386 (BX664015)	57.8°C
sil 1105 **	GTTCGTCATGGTTTCATGAGC	silE; pMG101 Position 1105-1105 (AF067954)	57.9°C
sil 2279 **	GCGGGTAAARACATCCTCAAT ***	silS; pMG101 Position 2279-2299 (AF067954)	56.9°C
sil 3019 **	CTGACCTTTTTTATCAGCCTG	silS; pMG101 Position 3019-2999 (AF067954)	55.9°C
sil 2999 **	CAGGCTGATAAAAAAGGTCAG	silS; pMG101 Position 2999-3019 (AF067954)	55.9°C
sil 3244 **	CCCTGATGGCGAAKGAAGAA ***	silR; pMG101 Position 3244-3263 (AF067954)	56.9°C
sil 3572 **	AACGGCTGGGATATCRTSCG ***	silR; pMG101 Position 3572-3553 (AF067954)	58.8°C
sil 4090 **	CGGGCTGGCGHAMCTTTTTG ***	silC; pMG101 Position 4090-4111 (AF067954)	62.6°C
sil 4470 **	CCAGTTGCTGRYTGAAATAGC ***	silC; pMG101 Position 4470-4449 (AF067954)	57.9°C
sil 6031 **	TCCATATCCATAAAVGGCGAT ***	silB; pMG101 Position 6031-6011 (AF067954)	55.2°C
sil 6549 **	ATTCAGGGDATGGACCCGGT ***	silB; pMG101 Position 6549-6568 (AF067954)	60.0°C
sil 7280 **	CCGGGATAGCTGGTTTTRATA ***	silA; pMG101 Position 7280-7260 (AF067954)	56.9°C
sil 9936 **	TGGCGTGGTSATGCTGATGTA ***	silA; pMG101 Position 9936-9956 (AF067954)	59.8°C
sil 11163 **	TGTTACTGGCATCTTCGGTA	silP; pMG101 Position 11163-11143 (AF067954)	57.9°C
sil 11882 **	GGCGATAAGCTCCGCATCAGA	silP; pMG101 Position 11882-11902 (AF067954)	61.7°C
sil 12405 **	TCCACTTTTTCAAGACGCTCA	silP; pMG101 Position 12405-12385 (AF067954)	56.0°C
irp1 - F	TGAATCGCGGTGTCTTATGC	Schubert et al., 2000	57°C
irp1 - R	TCCCTCAATAAAGCCCACGCT	Schubert et al., 2000	57°C
fyuA - F	GCGACGGGAAGCGATGATTA	Schubert et al., 2000	56°C
fyuA - R	TAAATGCCAGGTCAGTCACT	Schubert et al., 2000	56°C

* :Verdünnung auf 50 pmol/µl
 **: Consensus-Sequenz aus konservierten Bereichen der *sil*-Determinante von *S. enterica* Serotyp Typhimurium (AF067954), *E. coli* AY214164), *S. marcescens* (BX664015) und *K. pneumoniae* (AP006726)
 ***: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanodin, T = Thymin, I = Inosin; D = G, T oder A; H = A, C oder T; K = G oder T; M = A oder C; R = A oder G; S = G oder C; V = G, C oder A; W = A oder T, Y = C oder T

2.6.3 Größenmarker

Tabelle 10: Verwendete Größenmarker

Marker	Firma	Größenfragmente in bp	Abb.
100bp-DNA-Marker	Fermentas	3000 2000 1500 1200 1031 900 800 700 600 500 400 300 200 100	
λ -HindIII-Marker	Fermentas	23130 9416 6557 4361 2322 2027 564 125	
λ -DNA-PFGE-Marker	Amersham Biosciences	50kb - 1Mb Konkatamere des monomeren Genoms von λ cl857 Sam7 (48.5kb) teilen sich in mind. 20 Banden mit Zwischenräumen von 49 kb auf	

Ungeschnittene λ -DNA mit einer Länge von 48.5kb (Konzentration 1 μ g/ μ l) wurde von Fermentas bezogen.

2.7 Enzyme

Tabelle 11: Verwendete Enzyme

Enzym	Beschreibung	Firma
Ligase T4 DNA	30u/µl	Fermentas
Lysozym	10 mg/ml	Roth
Polymerasen		
AmpliTaq Gold	5 U/µl	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
AmpliTaq	5 U/µl	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Proteinase K	20 mg/ml	Sigma
Restriktionsenzyme		
<i>Rsa</i> I	10u/µl; Schnittstelle: GT↓AC	Fermentas
<i>Spe</i> I (<i>Bcu</i> I)	10u/µl; Schnittstelle: A↓CTAGT	Fermentas
<i>Xba</i> I	10u/µl; Schnittstelle: T↓CTAGA	Fermentas
RNase	10 mg/ml	Sigma

2.8 Molekulargenetische Kits

Tabelle 12: Verwendete molekulargenetische Kits

Kits	verwendeter Inhalt	Firma
NucleoSpin-Extract	NE-Puffer (5mM Tris/HCl, pH 8.5) NT2-Puffer NT3-Puffer	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Doly Prep	S1-S3 Puffer N2, N3, N5 Puffer	Qiagen, Hilden
Clontech PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit	Adaptoren 1 & 2R (siehe 2.6.2) 4x Hybridisierungspuffer Dilutionspuffer PCR-Primer 1 (siehe 2.6.2)	Clontech, Palo-Alto, USA
50x Advantage Polymerase Mix	50x Advantage Polymerase dNTPs (10mM) 10X Polymerase Puffer	Clontech, Palo-Alto, USA
Topo TA Cloning Kit	Vektor: pCR2.1. TOPO Salt Solution: 1.2M NaCl; 0.06M MgCl ₂	Invitrogen

Soweit im Methodenteil nicht anders beschrieben, wurden die Protokolle und Empfehlungen des Herstellers befolgt.

2.9 Software und Computer

Zur Bearbeitung und Auswertung der Sequenzen wurden die Programme EditSeq, SeqMan und MegAlign (DNA Star Inc., Madison, USA) auf einem Apple G4 unter dem Betriebssystem OS9 verwendet. Zur Berechnung phylogenetischer Verwandtschaftsgrade wurde PAUP (Altimec) für Mac OS9 benutzt.

Die Bilder der Gelelektrophoresen wurden mit Intas GDS Application (Intas) erstellt und mit GelComparII (Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgien) auf einem Pentium IV mit Windows XP ausgewertet. Statistische Berechnungen erfolgten mit SPSS Version 11.5 (SPSS Inc., Chicago). Deskriptive Statistik und Diagramme wurden mit Microsoft Excel erstellt (Microsoft Office, 2002).

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Lagerung von Bakterien

Alle Stämme und Isolate wurden bei -80°C in LB (Luria-Bertani) Medium mit 20% Glycerin gelagert.

3.1.2 Kulturbedingungen

Zum Bearbeiten wurden die Bakterien aufgetaut und mit 3-Ösen-Ausstrich so auf Blutagarplatten ausgestrichen, dass nach 16-18 Stunden im Brutschrank bei 37°C deutliche Einzelkolonien sichtbar waren. Falls diese nicht eindeutig zu trennen waren, wurde zunächst eine Subkultur angelegt. Danach wurde je eine Kolonie in Flüssigmedium (2,5ml Luria-Bertani für PCR; 10ml BHI für PFGE) überimpft und wiederum 16-18 Stunden bei 37°C mit 150x/min geschüttelt. Die Kulturröhrchen wurden hierbei so gewählt, dass durch einen großen Oberfläche:Volumen-Quotienten eine optimale Sauerstoffversorgung und damit gute Wachstumsbedingungen gewährleistet waren, z.B. Erlenmeyer-Kolben.

3.1.3 Photometrische Messung der Bakteriendichte

Um die Konzentration einer Bakterienkultur in Flüssigmedium zu bestimmen, wurde die optische Dichte der Kultur spektralphotometrisch durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Dazu wurde die Kultur in 1:10 Verdünnung mit dem verwendeten Medium gegen den Leerwert des jeweiligen Mediums photometrisch gemessen. In der exponentiellen Wachstumsphase hat eine Bakterienkultur eine optische Dichte im Bereich von 0,3 bis 0,7, das entspricht etwa $1 - 2,5 \times 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten (KbE).

3.1.4 Herstellung eines Gesamtzelllysats

Je 100 μl einer Übernachtskultur wurden bei Raumtemperatur 2 Minuten bei 10.000 rpm in der Mikrozentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Aqua dest. aufgenommen (1:10 Verdünnung für *hsp60*-PCR; 1:3 Verdünnung für ERIC-/REP-PCR).

Die verdünnte Bakteriensuspension wurde bei 100°C für 10 Minuten aufgeköcht, um die DNA freizusetzen. Damit sich Membranen und andere Zellbestandteile absetzen, wurde bei 4°C und 10.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in frische Gefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.1.5 Silberresistenzprüfung

Die Teststämme wurden in je 3ml LB-Medium ohne NaCl mit aufsteigenden AgNO₃ Konzentrationen (Tabelle 13) ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach 36h wurden 20µl aus der höchsten Konzentration, die Wachstum zeigte, entnommen und in neu angesetztes LB-Medium ohne NaCl mit AgNO₃ überimpft und erneut inkubiert.

Tabelle 13: Silbernitrat-Konzentrationen für LB-Flüssigmedium

Nährmedium	Menge an 40mM AgNO ₃	Endkonzentration
3ml LB ohne NaCl	0,0µl	0µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	0,75µl	10µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	1,50µl	20µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	2,25µl	30µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	3,00µl	40µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	3,75µl	50µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	7,50µl	100µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	15,00µl	200µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	30,00µl	400µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	45,00µl	600µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	60,00µl	800µM AgNO ₃
3ml LB ohne NaCl	75,00µl	1000µM AgNO ₃

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden 20µl aus den höchsten AgNO₃-Konzentrationen mit Wachstum frisch in alle Konzentrationsstufen in Flüssigmedium (LB ohne NaCl) sowie auf mit Silbernitrat angereicherte LB-Platten ohne NaCl überimpft (AgNO₃-Konzentrationen: 0µM, 50µM, 100µM, 400µM, 600µM und 800µM)

Nach 16-18h Inkubation bei 37°C wurde das Wachstum abgelesen bzw. gemessen.

Die optische Dichte der bebrüteten Flüssigmedien wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.1.3).

3.2 Pulsed-Field Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE gilt als der Goldstandard für die genetische Differenzierung von bakteriellen Stämmen¹⁷⁸. Hierbei wird die gesamte DNA eines Bakteriums mit einem Restriktionsenzym verdaut, und die Fragmente der Länge nach in einem elektrischen Feld in 1% Agarose aufgetrennt. Die Spannung wechselt wiederholt die Orientierung, wodurch nach einer Laufzeit von ca. zehn Stunden auch große DNA-Fragmente sauber getrennt werden können. Da bei jedem Isolat das gesamte Chromosom an immer derselben Basenfolge geschnitten wird, sind genetisch identische Stämme an ihrem gleichen Bandenmuster erkennbar. Gemäß der Definition von Tenover¹⁷⁸ gelten Isolate mit < 4 verschiedenen Banden, d.h. < 2 verschieden lokalisierten Restriktionsschnittstellen, als „nahe verwandt“. So kann ein globaler Vergleich des ganzen Chromosoms erfolgen, und klonale Isolate können aufgrund ihrer Bandenmuster identifiziert werden.

3.2.1 Einschließen der Bakterien in Agarose-Blöckchen

Bakterienkulturen in der logarithmischen Phase wurden nach Pelletierung in 10ml TN-Puffer aufgenommen und bei 3.000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die gewaschenen Bakterien wurden in einer 1:10-Verdünnung mit TN-Puffer auf eine optische Dichte von 0,8-0,9 (Wolfram-Lampe bei 600nm Wellenlänge) eingestellt (siehe 3.1.3).

Vorbereitung der Gussformen:

Die Formen für die Blöckchen wurden vor Gebrauch 1 Stunde in Natronlauge (1M NaOH) gereinigt, um Protein- und DNA-Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden sie zweimal je 1 Stunde mit destilliertem Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und auf einer Seite mit Parafilm verschlossen.

Herstellung der InCert[®] Agarose:

100mg InCert[®] Agarose wurden abgewogen und mit 5ml Aqua dest. aufgekocht bis die Agarose sich vollständig gelöst hatte. Um eine vorzeitige Verfestigung der Agarose zu verhindern, wurde sie, solange die Blöckchen gegossen wurden, im Wasserbad bei 50°C flüssig gehalten.

Je 50µl der verdünnten Bakteriensuspension wurden mit 50µl 2%iger InCert[®] Agarose vermischt und in die Förmchen pipettiert. Die Agarose-Blöckchen wurden anschließend 1-2h bei 4°C ausgehärtet.

3.2.2 Lyse der Zellwände und Verdau durch Proteinase K

Nach dem Aushärten wurden die Blöckchen jeweils in ein Gemisch von 2,7ml Lyse-Puffer und 300µl Proteinase K (20mg/ml) gegeben und darin 72 Stunden bei 50°C inkubiert. Bei diesem Schritt wurden die Bakterienzellwände aufgebrochen und die Proteine verdaut.

3.2.3 Verdau des bakteriellen Chromosoms

Nachdem die trüben Blöckchen durch 72h Proteinase K Verdau durchsichtig geworden waren, wurden sie von überschüssigem Enzym gereinigt. Dazu wurden sie in je 10ml TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen und eine Stunde vorsichtig geschüttelt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt.

Anschließend wurden die 100µl Blöckchen halbiert. Die eine Hälfte wurde in TE-Puffer (pH 8,0) bei 4°C gelagert. Die andere Hälfte wurde in 1:9 verdünntem Enzym-Puffer (50µl Enzym-Puffer und 400µl H₂O) bei 4°C vorinkubiert. Hierbei diffundierte der Puffer für den nachfolgenden Verdau in das Agarose-Blöckchen.

Nach 3 Stunden Vorinkubation wurde die eigentliche Reaktion angesetzt. Die DNA-enthaltenden Blöckchen wurden in einem Gemisch von 15µl Enzym-Puffer (Buffer Y+, Tango), 135µl H₂O und 3µl (=30U) Restriktionsenzym (*Xba*I bzw. *Spe*I) bei 37°C verdaut. Nach 16-18 Stunden wurde der Verdau unter Zugabe von 10µl DNA-Auftragspuffer und 10-15 min Inkubation bei 4°C beendet.

3.2.4 PFGE

Herstellung des Gels:

Für das 1%ige Agarosegel wurde Agarose Gold (1,5g) mit 150ml 0,5X TBE- Puffer aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war, und in eine geeignete Form mit Kämmen für die Taschen gegossen.

Die Kammer wurde mit 4L 0,5X TBE-Puffer gefüllt und das Gel mit den verdauten Blöckchen, einem λ -DNA-PFGE-Marker (Bereich von 1.000 bis 46.000 bp) (siehe Tabelle 10) und 2 μ g unverdauter λ -DNA (siehe 2.6.3) beladen.

Die PFGE lief 30 Stunden bei 6V/cm mit steigender Pulszeit von 5 bis 35 sec.

Die Kammer wurde zur Kühlung konstant bei 9°C gehalten.

Gelfärbung:

Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad mit 4mg Ethidiumbromid/L H₂O 30 Minuten gefärbt und anschließend 30 Minuten in Wasser gewaschen.

Das Gelbild wurde unter UV-Licht fotografiert und zur Auswertung gespeichert.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

1986 veröffentlichte Karl Mullis ¹³⁷ eine Methode, die eine Revolution in der Molekularbiologie darstellte und ihm 1993 den Nobelpreis für Chemie einbrachte: die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Während es vorher sehr schwierig und aufwändig war, genetisches Material zu isolieren, war es nun möglich, große Mengen an DNA durch Amplifikation zu gewinnen.

Die PCR ermöglicht die spezifische Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe von einer thermostabilen Polymerase, Nukleotiden (dNTPs) und entsprechenden *Primern*. Als *Primer* bezeichnet man durchschnittlich 20-30bp lange einzelsträngige Oligonukleotide, die nach Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang von einer Polymerase als Startpunkte der DNA-Synthese des komplementären zweiten Stranges erkannt werden.

Die beiden Stränge der DNA werden zunächst durch Erhitzen getrennt (Denaturierung), im nächsten Schritt können die zwei einzelsträngigen *Primer* an die komplementären Stellen der DNA binden (Annealing). Das thermostabile Enzym Taq-Polymerase baut von den *Primern* ausgehend die komplementären Desoxytrinukleotidphosphate (dNTPs) entlang der DNA-Matrize an (Elongation). Diese neu synthetisierte Doppelstrang-DNA dient im nächsten Cycle als Matrize (Abbildung 3). Da sich in den drei Schritten der entsprechende Genabschnitt jeweils verdoppelt, wird die DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert und liegt nach 25-30 Wiederholungen abhängig von der Ausgangsmenge an Proben-DNA in 2^{25} - 2^{30} Kopien vor.

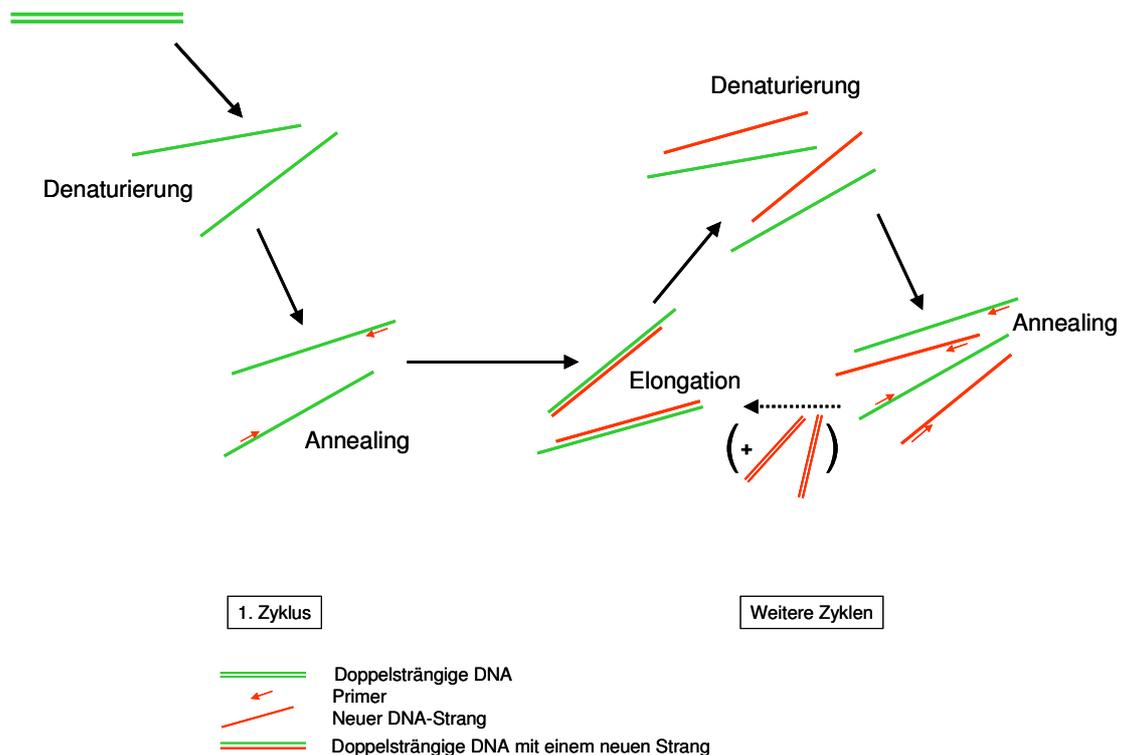


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Zyklische Wiederholungen von Denaturierung, *Primer*-Bindung (Annealing) und Elongation mittels der thermostabilen Taq-Polymerase.

Zur Optimierung der Annealing-Temperaturen wurde bei einer Temperatur von 6°C unter der niedrigsten T_m (maximale Annealingtemperatur) des verwendeten *Primer*-Paars (siehe Tabelle 9) begonnen und diese schrittweise um 2°C erhöht, bis spezifische, einzelne Banden der PCR-Produkte entstanden.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden $50\mu\text{l}$ Ansätze gewählt. Auf Eis wurden je $46,25\mu\text{l}$ des folgenden Gemisches vorgelegt und $3,75\mu\text{l}$ DNA (vergleiche 3.1.4) im DNA-freien Raum zugegeben.

PCR-Standardprotokoll:

10X PCR Puffer (15mM MgCl_2)	5,00 μl
Nukleotide – Mix (100mM)	5,00 μl
<i>Primer</i> – Mix (100mM)	1,00 μl
DNA – Polymerase Gold (5U/ μl)	0,25 μl
Aqua dest.	<u>35,00μl</u>
	<u>46,25μl</u>

Dies führte zu einer Endkonzentration von 1,5mM MgCl₂, 2,5mM je dNTP, 25pmol von jedem *Primer* und 1,25U Polymerase.

Das Standardprogramm bestand aus anfänglicher Denaturierung [95°C; 10 min], gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung [95°C; 30 sec], Annealing [xx°C (siehe Tabelle 14); 30 sec] und Extension [72°C; 90 sec] und wurde abgeschlossen mit einer Extensionszeit [72°C; 15 min]. Danach wurde das fertige PCR-Produkt heruntergekühlt und bei 4°C gelagert.

Bei den *sil*-PCRs wurde die Elongationszeit auf 4 min verlängert.

Folgende *Primer*-Kombinationen wurden verwendet:

Tabelle 14: Verwendete *Primer*-Kombinationen, PCR-Produkte, erwartete Länge der PCR-Produkte und Annealing-Temperaturen der *Primer*

<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>	PCR-Produkt	erwartete Länge	Annealing Temp.
hsp-1218-F	hsp-1559-R	<i>hsp60</i>	341 bp	57,5°C
M-13-F	M-13-R	SSH-Produkt	je nach Insert	50,0°C
RepHIA-F	RepHIA-R	<i>RepHIA</i>	450 bp	51,1°C
sil 1105	sil 3019	<i>silE -> silS</i>	1915 bp	58,0°C
sil 3019	sil 2279	<i>silS</i>	741 bp	58,0°C
sil 2999	sil 3572	<i>silS -> silR</i>	574 bp	58,0°C
sil 3244	sil 3572	<i>silR</i>	329 bp	58,0°C
sil 2999	sil 4470	<i>silS -> silC</i>	1472 bp	58,0°C
sil 4090	sil 4470	<i>silC</i>	381 bp	58,0°C
sil 4090	sil 6031	<i>silC -> silB</i>	1942 bp	58,0°C
sil 6549	sil 7280	<i>silB -> silA</i>	732 bp	58,0°C
sil 9936	sil 11163	<i>silA -> silP</i>	1228 bp	58,0°C
sil 11882	sil 12405	<i>silP</i>	524 bp	58,0°C
irp1-F	irp1-R	<i>irp1</i>	238 bp	57,0°C
fyuA-F	fyuA-R	<i>fyuA</i>	547 bp	56,0°C

3.4 “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC)- und “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP) –PCR

Bei den „Repetitive extragenic palindromic (REP) elements“ und den „Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences“ handelt es sich um kurze Sequenzabschnitte, die sich auf dem Genom aller Arten der Familie der *Enterbacteriaceae* in unterschiedlicher Lokalisation und Anzahl wiederholen. Die ERIC- und REP-PCR sind PCR-Methoden, bei denen die *Primer* an diese repetitiven Abschnitte des Genoms binden. Die *Primer* sind so gerichtet, dass mit der PCR die Abschnitte zwischen den repetitiven

Elementen amplifiziert werden. Da sich die Elemente bei verschiedenen Stämmen an unterschiedlichen Stellen im Genom befinden, ergeben sich spezifische Bandenmuster in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte (Abbildung 4).

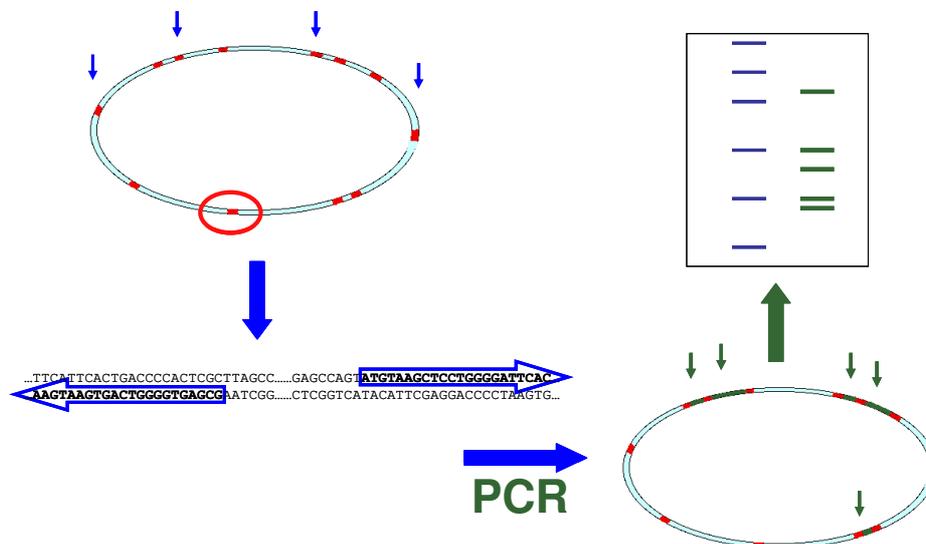


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der ERIC- bzw. REP-PCR. Die Abschnitte zwischen den repetitiven Elementen auf dem Genom werden mit PCR amplifiziert und in einer Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt.

ERIC-/ REP-PCR wurden in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Es wurde bei jeder Reaktion eine Negativkontrolle und ein Kontrollstamm (Stammnummer 18 für ERIC-PCR; Stammnummer 256 für REP-PCR) mitgeführt. Die Kontrollen dienten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der PCRs. Nur Gelelektrophoresen, bei denen der Kontrollstamm identisch reproduziert werden konnte, wurden für die Auswertung verwendet. Die PCR wurde auf Eis pipettiert. 23,9µl (ERIC-PCR) bzw. 23,4µl (REP-PCR) des folgenden Gemisches wurden vorgelegt. 1,1µl (ERIC-PCR) bzw. 1,6µl (REP-PCR) der DNA kamen dazu:

	<u>ERIC-PCR</u>	<u>REP-PCR</u>
10X PCR Puffer (15mM MgCl ₂)	2,5µl	2,5µl
Nukleotide – Mix (100mM)	2,5µl	2,5µl
<i>Primer</i>		
ERIC-Primer (50mM)	1,0µl	REP-Primer (100mM) 0,5µl
DNA – Polymerase (5U/µl)	0,4µl	0,4µl
Aqua dest.	<u>17,5µl</u>	<u>17,5µl</u>
	<u>23,9µl</u>	<u>23,4µl</u>

Dies ergab eine Endkonzentration von 1,5mM MgCl₂, 2,5mM je dNTP, 50pmol von jedem *Primer* und 2U Polymerase.

Die PCR-Reaktion bestand aus einer initialen Denaturierungszeit von 7 min bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung [90°C; 30 sec], Annealing [ERIC: 54°C; REP: 40°C; 1 min] und Elongation [65°C; 8 min], einer einmaligen abschließenden Elongationszeit [65°C; 16 min] und Abkühlen auf 4°C. Bis zum Auftragen auf ein Agarosegel wurden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung der DNA von PCR-Produkten wurde das NucleoSpin-Extract-Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Bis auf wenige Änderungen wurde dabei dem Protokoll des Herstellers gefolgt:

- Probe mit Elutions-Puffer auf 50 µl auffüllen
- 200µl NT2-Puffer dazugeben und mischen
- Die gesamten 250µl auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 7.300 rpm zentrifugieren, um die DNA an den Filter in der Säule zu binden
- Filtrat verwerfen
- Zum Waschen der DNA 600µl NT3-Puffer auf die Säule geben und 1 min bei 15.300 rpm zentrifugieren. Filtrat verwerfen
- Zweiter Waschschrift: 200µl NT3-Puffer auf die Säule geben und 3 min bei 15.300 rpm zentrifugieren. Filtrat verwerfen
- Säule auf ein steriles, DNA- und DNase-freies 1,5ml Eppendorf-Hütchen stellen, 27µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers auf die Säule pipettieren und 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 1 min bei 15.300 rpm zentrifugieren, um die DNA aus dem Filter zu lösen

3.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Darstellung und Auftrennung von DNA-Fragmenten und ihrer Größenbestimmung. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode und trennen sich der Größe nach auf. Die Wanderungsgeschwindigkeit der linearen DNA-Fragmente ist näherungsweise invers proportional zum Logarithmus ihrer Molekularmasse.

Agarosegel:

Für ein 2%iges Agarosegel wurden 2g Agarose mit 100ml 1X TAE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte, und in eine geeigneten Gelkammer gegossen. In das noch flüssige Gel wurden Kämme für die späteren Geltaschen gesteckt. Das Gel musste sich ca. 30 min verfestigen.

Elektrophorese:

Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit 1X TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. In die Tasche wurde ein Gemisch von je 5µl PCR-Produkt und 1,5µl DNA-Auftragspuffer (zum Binden der DNA) pipettiert. Um aus der Höhe der Banden die Länge des PCR-Produktes ablesen zu können, wurde die erste Spur jeder Gelzeile mit 10µl einer 100 bp (base pairs) - Leiter für den Bereich von 100 bis 3.000 Basenpaaren bestückt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Feldstärke von 10V/cm.

Laufhöhe der <i>Bromphenolblau-Bande</i> des Auftragspuffers:	1% Agarose:	520bp
	2% Agarose:	150bp

Färbung:

Das Gel wurde 20 min in einer Lösung mit 1mg Ethidiumbromid/L H₂O gefärbt und anschließend unter UV-Licht ($\lambda = 312\text{nm}$) digital fotografiert. Die aufgetrennten Nukleinsäuren werden durch das darin interkalierte Ethidiumbromid als fluoreszierende Banden sichtbar.

3.7 Sequenzierung

Die Sequenziermethode basiert auf der 1977 von Sanger beschriebenen Didesoxynukleotid-Methode¹⁶⁰. Hierbei wird zu den Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in vier parallelen Ansätzen je eine kleine Menge eines 2`-3`-Didesoxynukleotid-5`Triphosphats

(ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) zugegeben. Die Polymerase verlängert den *Primer* durch Einbau der Nukleotidtriphosphate. Der Polymerisationsabbruch entsteht durch den Einbau der 2`-3`-Didesoxynukleotide. Diesen Nukleotiden fehlt die 3`OH-Gruppe, die für die Kettenverlängerung notwendig ist. Durch die Mischung der Desoxynukleotidphosphate und Didesoxynukleotidphosphate kommt es zu einer statistischen Verteilung der Kettenabbrüche. So erhält man viele verschieden lange Einzelstrang DNA-Stücke, die elektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt werden können. Die Sequenz kann dann der Reihe nach abgelesen werden. In der ursprünglichen Methode nach Sanger benötigte man daher vier parallele Ansätze pro Sequenzierung mit jeweils einem der vier Didesoxynukleotidphosphate.

3.7.1 Dye-Terminator-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dye-Terminator-Methode angewandt, bei der an jedes der vier Didesoxynukleotide ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, der mittels eines Laserstrahls erkannt und abgelesen werden kann. Somit ist nur noch ein Ansatz, in den alle vier Didesoxynukleotide zugegeben werden, erforderlich.

Für die Vorbereitung der Sequenzierreaktion wurde auf Eis pipettiert. 200ng der gereinigten DNA wurde in PCR-Tubes vorgelegt. Dazu kamen 4,7µl des folgenden Gemisches:

BigDye	4,0µl
<i>Primer</i> (5pmol/µl)	<u>0,7µl</u>
	<u>4,7µl</u>

Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 20µl aufgefüllt.

Programm des ThermoCyclers:

25 Zyklen:

Denaturierung	[96°C; 10 sec]
Annealing	[55°C; 10 sec]
Elongation	[60°C; 4 min]

anschließend Herunterkühlen auf 4°C.

3.7.2 DNA-Fällung

Um die DNA zu fällen, wurden je Ansatz 2µl 3M Natriumacetat und 50µl 96%iges Ethanol zugegeben. Das Pellet wurde 30 min lang bei 15°C und 15.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die DNA wurde mit 750µl 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut zentrifugiert [15 min; 4°C; 15.300 rpm]. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet.

3.7.3 Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem 373A DNA-Sequencer von Applied Biosystems und der entsprechenden Software 373A-Sequencer-Data-Analysis-Program.

3.8 Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung (SH) ist eine leistungsfähige Methode, die angewandt werden kann, um Unterschiede zwischen bakteriellen Genomen zu identifizieren. Obwohl es einige verschiedene Varianten dieser Methode gibt, ist die prinzipielle Idee dahinter dieselbe. Die genomische DNA, die mögliche interessante Sequenzen enthält, ist der *Tester*, die Referenz-DNA ist der *Driver*. *Tester*- und *Driver*-DNA werden hybridisiert, und die hybridisierten DNA-Abschnitte entfernt. Folglich bleiben die nicht-hybridisierten *Tester*-spezifischen DNA-Bereiche übrig.

Eine der Varianten ist die suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)^{35,77}. Sie ist eine PCR-basierte Form der SH. Basierend auf dem so genannten PCR-Suppressionseffekt (US Patent #5,565,340)¹⁶⁵ wird dabei die Amplifikation von unspezifischen Sequenzen verhindert.

Abbildung 5 illustriert die einzelnen Schritte der suppressiven subtraktiven Hybridisierung.

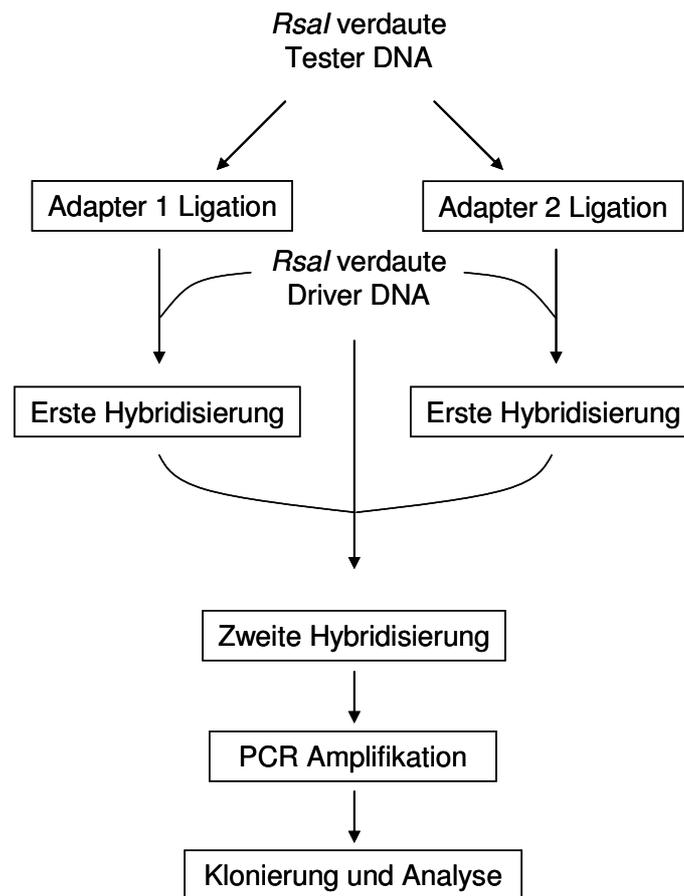


Abbildung 5: Überblick über die CLONTECH PCR-Select Methodik. Die chromosomale DNA, in der spezielle Sequenzen gefunden werden sollen, heißt *Tester* und die Referenz-DNA *Driver*.

Zunächst wurde die chromosomale DNA der ausgewählten Stämme (pro Isolat 1.5 - 2µg DNA) präpariert und mit einem Restriktionsenzym (*RsaI*) verdaut. Die *Tester*-DNA wurde in zwei Anteile aufgeteilt, und jeder der beiden Anteile mit einem anderen Adapter ligiert. Die beiden Adaptoren enthielten Abschnitte mit identischen Sequenzen, so dass später derselbe PCR-Primer (PCR-Primer 1) an diesen Stellen ansetzen konnte (Abbildung 6).

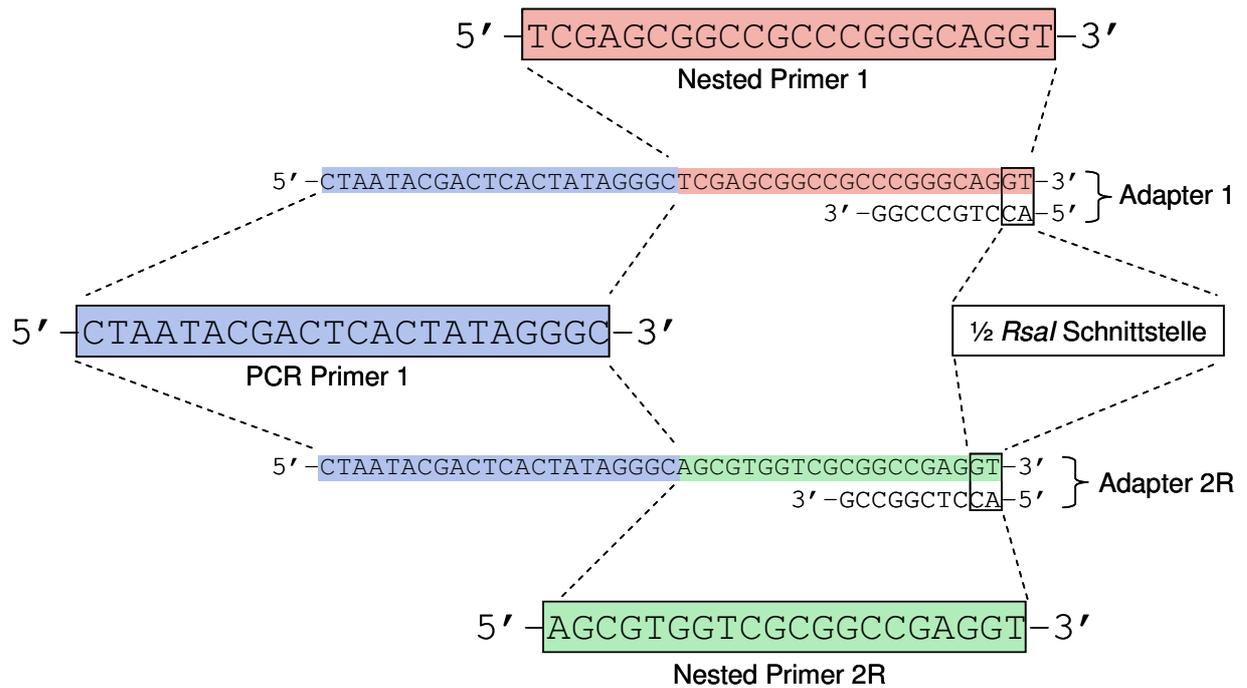


Abbildung 6: Sequenzen der CLONTECH PCR-Select Adaptors und Primer. Wenn die Adaptors mit *RsaI* verdauter DNA ligiert werden, wird die *RsaI*-Schnittstelle vollständig

Anschließend wurden zwei Hybridisierungsschritte durchgeführt.

Im ersten Hybridisierungsschritt wurde in zwei parallelen Ansätzen jeweils die Adapterligierte *Tester*-DNA mit *Driver*-DNA hybridisiert. Zusätzlich zur *Driver*-DNA wurde - abweichend vom Protokoll des Herstellers - noch frische denaturierte *Tester*-Plasmid-DNA zugegeben. Dadurch sollten kleinere multi-copy Plasmide des *Testers* zusätzlich subtrahiert werden.

In diesem Schritt entstanden je fünf Produkte (Abbildung 7): Einzelsträngige DNA mit (a) und ohne Adapter (d) und doppelsträngige DNA mit einem (c), zwei (b) und ohne (e) Adapter.

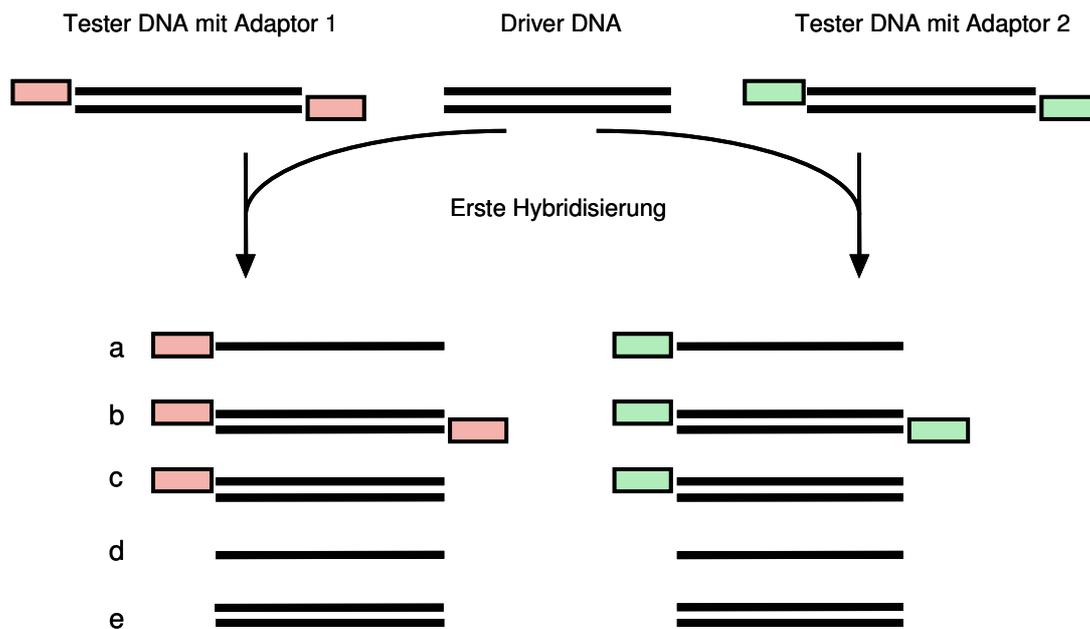


Abbildung 7: Erste Hybridisierung

Im zweiten Hybridisierungsschritt wurden die beiden Produkte der ersten Hybridisierung zusammengegeben und erneut mit frisch denaturierter *Driver*-DNA gemischt. Anschließend wurde zusätzlich frisch denaturierte Plasmid-DNA des *Testers* zugegeben.

Zu den oben genannten Produkten (a - e) kam durch diesen Vorgang noch ein weiteres dazu: doppelsträngige, *Tester*-spezifische DNA mit Adaptor 1 an einem und Adaptor 2 am anderen Ende (Abbildung 8).



Abbildung 8: Zweite Hybridisierung

Die gesamte Probe wurde einer PCR unterzogen, um die *Tester*-spezifischen Sequenzen zu vervielfältigen. Die Adaptoren 1 und 2R haben identische Abschnitte von 22 Nukleotiden. An diese hybridisierte der verwendete *Primer*. Die erste PCR benötigte deshalb nur einen *Primer* zur Amplifikationsreaktion. Dadurch konnte das Problem der *Primer* Dimerisation¹²⁷ umgangen werden. Zusätzlich kam so bei Produkt b der PCR-Suppressionseffekt zum Tragen. Durch die beiden inversen Enden neigte das Produkt b zur loop-Bildung, wodurch das Ansetzen der *Primers* und damit die Amplifikation behindert wurde.

Die einzelsträngig vorliegende DNA (a und d; Abbildung 7) bzw. Produkte ohne Adaptoren (d und e) konnten mit dem verwendeten *Primer* nicht amplifiziert werden. Produkt c konnte aufgrund der einzelnen *Primer*-Bindungsstelle nur linear amplifiziert werden und blieb deshalb niedrig konzentriert. Nur das mit *Tester*-spezifischen Sequenzen angereicherte Produkt f (Abbildung 8) konnte mit diesem *Primer* exponentiell vervielfältigt werden.

Um unspezifische Produkte zu vermeiden, wurden anschließend in einer zweiten PCR zwei *Primer* eingesetzt, die spezifisch an Adaptor 1 (*Nested Primer 1*) bzw. Adaptor 2 (*Nested Primer 2*) banden, und so nochmals ausschließlich Produkte mit zwei unterschiedlichen Adaptoren (Produkt f) amplifizierten.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden in Plasmide ligiert, in Zellen transformiert und kloniert. Die entsprechenden DNA-Abschnitte konnten später sequenziert werden.

3.8.1 Präparation chromosomaler DNA

Eine isolierte Kolonie eines ausgewählten Stamms wurde in 5ml BHI-Medium überführt und 16-18h bei 37°C im Schüttler bei 150x/min inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde bei 10.000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1790µl TE-Puffer (pH 8,0) mit 0,1mg/ml RNase resuspendiert und die Lösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden 100µl Lysozym (10mg/ml) und 10µl RNase (10mg/ml) zugegeben. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurden 100µl 10% SDS und 20µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben, vorsichtig geschüttelt und erneut 1-2h inkubiert bis die Lösung zähflüssig wurde. In diesem Schritt wurden Zellwände und Proteine zerstört bzw. denaturiert.

Zur Fällung von Proteinen und Zellwandbestandteilen wurde CTAB verwendet. Wenn die Salzkonzentration unter 0,5M sinkt, bildet CTAB Komplexe mit Nukleinsäuren¹³⁹ und nicht wie beabsichtigt mit Zellwandresten, denaturierten Proteinen und Polysacchariden. Um das zu verhindern, wurden 333µl 5M NaCl dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach Zugabe von 240µl CTAB/NaCl Lösung wurde das Gemisch unter leichtem Schütteln 10 min bei 65°C inkubiert.

Um die DNA-haltige Lösung von den Proteinen und Polysacchariden zu trennen, wurde ein 24:1 Gemisch Chloroform:Isoamylethanol in annähernd gleicher Menge (2600 µl) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Auf den gewonnenen Überstand wurde in etwa gleicher

Menge Phenol:Chloroform:Isoamylethanol (25:24:1) zugegeben, gut geschüttelt und in gleicher Weise zentrifugiert. Die obere der beiden entstehenden Phasen enthielt die DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt.

Die chromosomale DNA wurde mit 0,7 Volumen 70% Isopropanol gefällt. Nach ca. 5 min vorsichtigem Schütteln zeigte sich die DNA als weißer Faden in der Lösung. Die DNA wurde mit einem Glashaken gefischt, zweimal in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

3.8.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde das Qiagen Doly Prep Kit verwendet. Alle aufgeführten Puffer (S1-S3, N2, N3 und N5) und Säulen sind Teil des Kits.

Eine Kolonie des Plamid-enthaltenden Isolats wurde in 300ml LB Medium überführt und 16-18h bei 37°C und 150x/min inkubiert. Die Kultur wurde bei 7.000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 8ml RNase enthaltenden TE-Puffer (S1) resuspendiert. Anschließend wurden 8ml S2 und 8ml S3 Puffer zugegeben, sehr vorsichtig geschüttelt und 15 min bei 4°C inkubiert. Die nun weißliche Lösung wurde 15 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und nochmals zentrifugiert.

Unterdessen wurden die Säulen mit 2,5ml N2 Puffer äquilibriert. Sobald der Äquilibrierungspuffer vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde der Überstand der Probe auf die Säulen gegeben. Nachdem die Probe komplett durch die Säule gelaufen war, wurde dreimal mit 4ml N3 Puffer gespült. Abschließend wurde die DNA mit 6ml N5-Puffer aus der Membran gelöst und in einem frischen Gefäß aufgefangen. Es wurden 4,5ml Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wurde 30 min bei 15.300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. 4,5ml tiefgekühltes 70% Ethanol wurden zugegeben und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 50µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

3.8.3 Photometrische Messung von DNA-Konzentrationen

DNA wurde in einer 1:100 Verdünnung mit H₂O bei ihrem Absorptionsmaximum (260 nm) gegen den Leerwert von H₂O gemessen. Die Konzentration der doppelsträngigen DNA errechnete sich nach folgender Formel:

$$1 \text{ OD}_{260} \hat{=} 50 \mu\text{g/ml}$$

Zusätzlich wurde die optische Dichte (OD) bei 280nm gemessen. Da dies das Absorptionsmaximum von Proteinen ist, ist die OD₂₈₀ bei Verunreinigung der DNA-Lösung erhöht. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ musste über 1,8 liegen. Lag er niedriger, wurde erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gefällt.

3.8.4 Verdau von DNA

Je 100µl DNA (10µg) der *Tester*- und *Driver*-DNA sowie die Plasmid-DNA des *Testers* wurden mit dem blunt-end Restriktionsenzym *RsaI* 16-18h verdaut.

DNA (100ng/µl)	100,0µl	(10µg)*
10X Puffer	30,0µl	
<i>RsaI</i> (10U/µl)	7,5µl	(75U)*
H ₂ O	157,5µl	
RNAse (10mg/ml)	<u>5,0µl</u>	(50µg)*
	<u>300,0µl</u>	

* absolute Menge

Um zu überprüfen, ob die DNA vollständig geschnitten war, wurden 5µl der verdauten DNA mittels Elektrophorese (1% Agarose) aufgetrennt. Es sollte ein „Schmier“ von ca. 0,1 bis 2 kb zu sehen sein (Abbildung 9). Bei unzureichendem Verdau wurden weitere 3µl Enzym (30U) zugegeben. Die vollständig verdaute DNA wurde für die Ligation gereinigt.

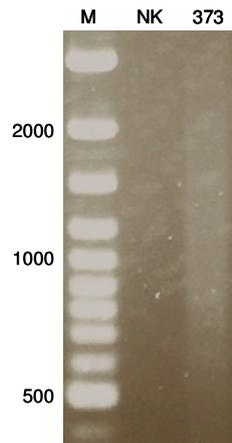


Abbildung 9: Verdau der chromosomalen DNA für die subtraktive Hybridisierung; M: 100bp DNA-Marker; NK: Negativkontrolle; 373: mit *RsaI* verdaute chromosomale DNA von Stamm 373

3.8.5 Reinigung der verdauten DNA

Bevor die DNA ligiert werden konnte, musste sie gereinigt werden. Das Volumen wurde mit H₂O auf 500µl vergrößert. 500µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugegeben, das Gemisch gut geschüttelt und 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Hierbei bildeten sich drei Schichten. In der untersten Schicht befand sich das Chloroform und Phenol, die obere Schicht enthielt die DNA, dazwischen lagen die ausgefällten Proteine. Der DNA-haltige Überstand wurde vorsichtig - ohne Mitnahme der weißen Proteinschicht - abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Dazu wurde in gleicher Menge Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gegeben, gut geschüttelt und zentrifugiert (10 min; 10.000 rpm). Die obere DNA-haltige Phase wurde abgenommen, mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat und 2,8 Volumen 98% Ethanol gemischt und 30 min bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und 10 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20µl H₂O resuspendiert und die Konzentration nach Messung im Spektralphotometer bei 260nm berechnet.

Für die weiteren Schritte musste die *Tester*-DNA auf 120ng/µl und die *Driver*-DNA und *Tester*-Plasmid-DNA auf 600ng/µl verdünnt bzw. konzentriert werden.

3.8.6 Adaptor-Ligation

Die Adaptoren wurden in zwei Ansätzen gemäß folgendem Protokoll bei 14°C an die *Tester*-DNA ligiert. Dabei verband das Enzym Ligase die glatten Enden der Adaptoren mit den glatt geschnittenen DNA-Fragmenten.

<i>Tester</i> -DNA (120ng/μl)	1μl	(120ng)*
Adaptor 1 bzw. 2 (10μM)	2μl	(2pmol)*
PEG	1μl	
10X Ligationspuffer	1μl	
Ligase (30U/μl)	2μl	(60U)*
H ₂ O	<u>3μl</u>	
	<u>10μl</u>	

* absolute Menge

Nach 16h wurde die Ligation durch Zugabe von 1μl 0,2M EDTA gestoppt. Die Ligase benötigt zweiwertige Kationen. Diese werden ihr durch Komplexbildung mit EDTA entzogen. Zusätzlich wurde die Probe 5 min auf 72°C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren.

3.8.7 Erste Hybridisierung

Im ersten Schritt wurden, wie oben beschrieben, zwei parallele Ansätze gewählt:

<i>Driver</i> -DNA (600ng/μl)	1μl	(600ng DNA)*
Plasmid-DNA des <i>Testers</i> (600ng/μl)	1μl	(600ng DNA)*
Ligierte DNA von 3.8.6 (12ng/μl)	1μl	(12ng)*
4X Hybridisierungspuffer	<u>1μl</u>	
	<u>4μl</u>	

* absolute Menge

Die Proben wurden 1,5 min bei 98°C denaturiert und anschließend 1,5h bei 63°C hybridisiert. Dabei entstanden die in Abbildung 7 und Abbildung 8 gezeigten Produkte.

3.8.8 Zweite Hybridisierung

Im zweiten Schritt wurden die beiden Ansätze gemischt und ein weiteres Mal mit *Driver*-DNA hybridisiert. Dafür musste zunächst die *Driver*-DNA denaturiert werden. Dies geschah in folgendem Ansatz durch Inkubation bei 98°C für 1,5 min:

<i>Driver</i> DNA (600ng/μl)	0,5μl	(300ng DNA)*
Plasmid-DNA des <i>Testers</i> (600ng/μl)	0,5μl	(300ng DNA)*
2X Hybridisierungspuffer	<u>1,0μl</u>	
	<u>2,0μl</u>	

* absolute Menge

Nach der Denaturierungszeit wurden in schneller Abfolge folgende Schritte durchgeführt:

- Hybridisierung mit Ligation 2 in eine Pipette aufziehen
- Etwas Luft hinterher ziehen
- Frisch denaturierte DNA hinterher ziehen, so dass etwas Luft zwischen den beiden Proben ist
- In die vortemperierte (63°C) Lösung der Ligation 1 pipettieren
- Resuspendieren
- Kurz zentrifugieren
- Über Nacht bei 63°C inkubieren
- 200 μl vorgewärmten (63°C) Dilutionspuffer dazugeben und mischen
- 7 min bei 63°C inkubieren, um unspezifische Hybridisierungen zu eliminieren

Im zweiten Hybridisierungsschritt entstand zusätzlich zu den Produkten (a bis e) aus der ersten Hybridisierung (siehe Abbildung 7) das Produkt f mit unterschiedlichen Adaptoren an den Enden (siehe Abbildung 8).

3.8.9 PCR Amplifikation

Wie oben beschrieben, kann nun *Tester*-spezifische DNA durch PCR exponentiell amplifiziert werden. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

Verdünnte Hybridisierung aus 3.8.8	1,0µl	
dNTPs (10mM)	0,5µl	(5nmol)*
PCR <i>Primer</i> 1 (10µM)	1,0µl	(10pmol)*
50X Advantage Polymerase (1U/µl)	0,5µl	(0,5U)*
10X Polymerase Puffer	2,5µl	
H ₂ O	<u>19,5µl</u>	
	<u>25,0µl</u>	

* absolute Menge

Programm:

Initial 5 min 72°C um die Adaptoren zu vervollständigen.

25 Zyklen:	94°C	30 sec
	66°C	30 sec
	72°C	1,5 min

Um das Ergebnis zu optimieren, wurde eine weitere PCR mit einem *Primer*-Paar, das spezifisch an je einen der Adaptoren bindet, durchgeführt:

PCR-Produkt 1 (1:40 mit H ₂ O verdünnt)	1,0µl	
dNTPs (10mM)	0,5µl	(5nmol)*
<i>Nested Primer</i> 1 (10µM)	1,0µl	(10pmol)*
<i>Nested Primer</i> 2 (10µM)	1,0µl	(10pmol)*
50X Advantage Polymerase (1U/µl)	0,5µl	(0,5U)*
10X Polymerase Puffer	2,5µl	
H ₂ O	<u>19,5µl</u>	
	<u>25,0µl</u>	

* absolute Menge

Programm:

10-12 Zyklen:	94°C	30 sec
	68°C	30 sec
	72°C	1,5 min

Nach 10 Zyklen wurden 12µl entnommen. Der Rest wurde noch zwei weiteren Zyklen unterzogen.

Es wurden je 7µl aus PCR 1, PCR 2 nach 10 Zyklen und PCR 2 nach 12 Zyklen auf einem 2% Agarosegel analysiert. Die Produkte der ersten PCR sollten einen Schmier von 0,2 bis 2 kb bilden, die der zweiten PCR einen Schmier mit einigen klaren Banden (siehe Abbildung 10). War nach 10 Zyklen schon ein deutliches Ergebnis sichtbar, wurde dieses Produkt im Weiteren verwendet.

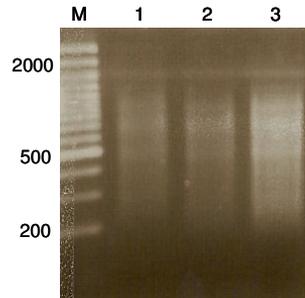


Abbildung 10: M: 100bp DNA-Marker; 1: Elektrophorese-Bild des Produktes der ersten PCR der subtraktiven Hybridisierung, 2 und 3: Produkt der zweiten PCR der SH nach 10 bzw. 12 Cycles

3.9 TopoCloning

Platten gießen

LB-Agar wurde aufgekocht und bis auf etwa 50°C abgekühlt. 400ml LB-Agar wurden mit 4ml Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration 100µg/ml) gemischt. Je 15-20ml wurden in sterile Petri-Schalen gegossen, so dass der Boden gut bedeckt war. Die fertigen Platten wurden an der Luft getrocknet.

TopoCloning

Die fertigen PCR-Produkte wurden mittels TopoCloning in chemisch kompetente *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen BV) kloniert. Dafür wurde das TopoTA-Kit verwendet. Die angegebenen Lösungen und Chemikalien sind Teile des Kits.

4µl des PCR-Produktes wurden mit 1µl Salt Solution und 1µl Topo-Vektor gemischt, 5 min bei 22°C inkubiert und auf Eis gelegt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 2µl des PCR-Vektor-Gemisches 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 sec auf 42°C erwärmt und sofort wieder auf Eis gelegt. Anschließend wurde 500µl SOC-Medium dazugegeben und die Zellen 1h bei 37°C und 300x/min inkubiert. Dann wurden sie auf 5 LB-Agar Platten mit Ampicillin (2x 50µl, 2x 100µl und 1x 200µl) ausplattiert und 16-18h bei 37°C bebrütet.

30 min vor dem Ausplattieren der Zellen auf LB-Agar wurden 40µl X-Gal (40mg/ml) auf jeder Platte verteilt. Der verwendete Vektor enthielt ein Galaktosidasegen. War das Gen intakt, konnte die Zelle X-Gal verstoffwechseln und die Kolonie färbte sich blau. Die Insertionsstelle für das PCR-Produkt lag in diesem Gen, so dass die Funktion bei Aufnahme des PCR-Produkts verloren ging. Man konnte somit an der Koloniefarbe ersehen, ob ein DNA-Fragment in das Plasmid aufgenommen worden war. War Passagier-DNA in das Genom der Plasmid-DNA aufgenommen worden, blieb die Kolonie weiß, im anderen Fall färbte sie sich blau.

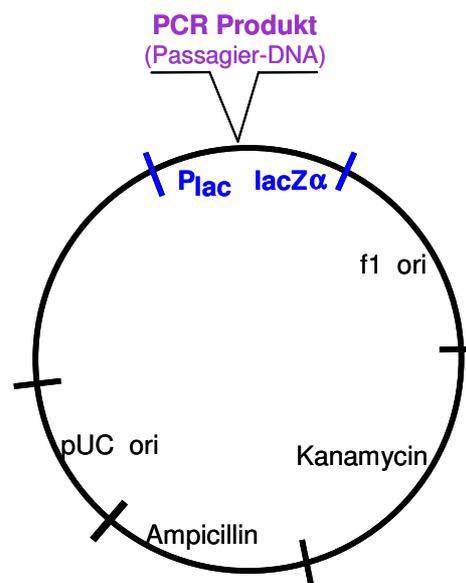


Abbildung 11: pCR[®]2-1-TOPO-vector, 3,9 kb

Nach der Bebrütungszeit wurden die weißen Kolonien auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten sowie in 1ml LB-Flüssigmedium mit 100µg/ml Ampicillin überimpft und 16-18h bei 37°C inkubiert.

Rechts und links der Insertionsstelle des Vektors lagen *Primer*-Bindungsstellen (M13 Forward und Reverse). Durch eine PCR mit diesen *Primern* konnte das Insertionsstück des Vektors amplifiziert (siehe 3.3) und sequenziert (siehe 3.7) werden. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden mit der GenBank-Datenbank auf Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen überprüft (siehe 3.10).

3.10 Phylogenetische Tests

3.10.1 Distanzanalyse

Zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes muss aus den Sequenzdaten zunächst eine Distanzmatrix berechnet werden. Dabei werden die durchschnittlichen Mutationen pro Position zwischen allen Sequenzpaaren ermittelt. Die „Distanz“ ist somit die durchschnittliche Änderung pro Position. Der tatsächliche Abstand zwischen zwei Sequenzen wird dabei unterschätzt, da verschiedene Ereignisse, wie Rückmutationen oder multiple Mutationen an einer Position retrospektiv nicht mehr erkannt werden. Es gibt deshalb Evolutionsmodelle, z.B. Jukes & Cantor, die die Differenz zwischen „tatsächlichem Abstand“ und „beobachtetem Abstand“ in die Distanzmatrix einrechnen.

Algorithmen berechnen aus Distanzen den „besten“ Stammbaum, Sequenzen werden dabei nicht mehr berücksichtigt. Die zwei bekanntesten Distanz-basierten Methoden sind die „Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA) und das „Neighbour-joining“ (NJ).

3.10.2 „Neighbour-joining“

„Neighbour-joining“ ist ein Clustering-Algorithmus, mit dessen Hilfe aus einer Distanzmatrix ein Baumdiagramm abgeleitet werden kann. Hiermit soll anhand von variierenden Merkmalen in der Datenmatrix die Wahrscheinlichkeit einer Abstammungs- oder Verwandtschafts-Beziehung in einer stammbaumartigen Darstellung berechnet werden. „Neighbour-joining“ basiert auf dem "Minimum Evolution Kriterium", das heißt es wird bei der Berechnung der Bäume davon ausgegangen, dass die Veränderung der betrachteten Merkmale keine unbekanntem Zwischenschritte enthält ("minimum evolution")¹⁵⁸.

Ausgehend von einem zunächst sternförmigen "Baum", in dem alle Taxa mit einem "Zentrum" verbunden sind, werden paarweise die DNA-Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt und zu einem Ast des Baumes vereinigt. Die genetischen Distanzen der Sequenzen werden neu berechnet und wieder die nächstverwandten zu einem Ast mit zwei Taxa zusammengefügt. Dies erfolgt solange, bis alle Taxa in dem Baum eingefügt wurden und die Sternstruktur des Baumes völlig aufgelöst wurde. Es werden also in aufeinander folgenden Schritten jeweils die beiden einander nächstgelegenen Sequenzen als „Nachbarn“ definiert. Dabei berechnet das „Neighbour-joining“ nicht alle möglichen Bäume

und wählt zum Schluss die optimalen aus, sondern verwirft schon während des Verfahrens einige Rechenwege. Obwohl der Algorithmus suboptimal ist, wurde er ausführlich getestet und findet normalerweise einen Baum, der dem Optimum relativ nahe kommt. Insbesondere bei großen Datensätzen ist das „Neighbour-joining“ eine häufig verwendete Methode^{118,158,174}.

3.10.3 „Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA)

Die „Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA) ist ein Clustering-Algorithmus, der in der Bioinformatik zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume angewendet wird. Im Gegensatz zum „Neighbour-joining“ basiert UPGMA auf der Annahme der „Molekularen Uhr“, d.h. alle Taxa evolvieren mit derselben konstanten Änderungsrate¹⁶⁹.

Zu Beginn des Algorithmus bildet jedes Objekt ein eigenes Cluster. In jedem Schritt werden die beiden Cluster mit der geringsten Distanz zusammengefasst und die Distanzmatrix neu berechnet. Die Distanz zwischen zwei Clustern ist der Mittelwert der paarweisen Distanzen aller Objekte in beiden Clustern. Ausgehend von ein-elementigen Clustern vereint der Algorithmus sukzessive die beiden nächstverwandten mit einem neuen Knotenpunkt zu einem gemeinsamen Cluster. Gesucht ist ein binärer Baum, dessen Blätter die Objekte darstellen und dessen Kanten möglichst gut die Distanzen in der Distanzmatrix reflektieren. UPGMA ist eine hilfreiche Methode, um schnell ähnliche Isolate zu identifizieren.

3.10.4 „Bootstrapping“

Das „Bootstrapping“ ist eine Methode, um die Zuverlässigkeit von Verzweigungen innerhalb einer phylogenetischen Analyse zu validieren^{42-44,51}. Dabei wird die phylogenetische Analyse 100-1000mal wiederholt. Der Prozentsatz, mit dem ein Cluster wiedererscheint, ist der so genannte Bootstrap-Wert dieses Clusters. Der Bootstrap-Wert ist also ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine phylogenetische Schätzung einer wahren Phylogenie entspricht. Werte von $\geq 70\%$ entsprechen mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 95\%$ einer zutreffenden Annahme⁸⁷. Man spricht hierbei von einer „Unterstützung“ des Clusters. Bei Werten $\geq 80\%$ ist das Cluster „stark unterstützt“, man geht hier davon aus, dass die Annahme in praktisch allen Fällen zutrifft⁸⁷.

3.11 Datenauswertung

Sequenzdaten wurden mit MegAlign (DNA Star, Inc.) und PAUP Version 4.0b10 (Altevec) analysiert. Mit MegAlign wurden in einer paarweisen Clusteranalyse basierend auf der Wilbur-Lipman Methode aus den Sequenzdaten eine Distanzmatrix erstellt. Auf der Grundlage dieser Distanzmatrix konnte ein „Neighbour-joining“ Baum erstellt werden. Mit PAUP 4.0b10 wurden die Bootstrap Werte der genetischen Cluster errechnet. Dabei wurden jeweils 100 Replikationen durchgeführt. Die Distanzmatrix für die „Neighbour-joining“ Bäume wurde nach dem Jukes-Cantor Modell berechnet.

Homologien der DNA- und Proteinsequenzen wurden durch Vergleich der Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken gesucht. Dabei wurde der BLAST Algorithmus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) auf der Website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> verwendet.

Zur Übersetzung von DNA- in Proteinsequenzen wurde das Translate DNA > Protein Tool des ExPASy Proteomics Servers (<http://ca.expasy.org>) verwendet.

Die Agarosegelbilder nach Elektrophorese von ERIC- und REP-PCR wurden mit GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ausgewertet. Dabei wurde eine Clusteranalyse basierend auf dem Dice (REP) bzw. Pearson (ERIC) Koeffizienten durchgeführt, und phylogenetische Bäume nach der UPGMA Methode erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte in SPSS Version 11.5 (SPSS Inc., Chicago). Um Zusammenhangshypothesen zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat (χ^2)-Test nach Pearson und bei erwarteten Häufigkeiten von kleiner als fünf der Fisher`s Exact Test angewendet. Signifikanz wurde bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art unter 5% angenommen ($p < 0.05$).

Die Erstellung von deskriptiver Statistik und Diagrammen erfolgte in Microsoft Excel, 2002 (Microsoft).

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Prävalenz der genetischen Cluster des *E. cloacae* Komplexes

4.1.1 Phylogenetische Untersuchung der *hsp60*-Sequenzen

Um die Prävalenz der einzelnen genetischen Cluster des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum Großhadern zu analysieren, wurden knapp 200 klinische Isolate untersucht. Die Isolate waren prospektiv über einen Zeitraum von fünf Jahren gesammelt worden (vgl. 2.1). Eine Länge von 272 bp des Gens für das Hitze-Schock-Protein Hsp60 wurde von 196 Isolaten des *Enterobacter cloacae* Komplexes sowie den *Enterobacter* Typ- bzw. Referenzstämmen (Tabelle 1) sequenziert. Aus den Sequenzdaten wurde mittels „Neighbour-joining“¹⁵⁸ ein phylogenetischer Baum erstellt (siehe Abb.1).

Die Analyse der 196 klinischen Isolate bestätigte die in der Populationsgenetik von Hoffmann & Roggenkamp beschriebenen 12 genetischen Cluster (I - XII) und eine heterogene Sequenzgruppe (xiii). Diese genetischen Cluster werden fortan auch als Genotypen bezeichnet. Die Nummerierung erfolgte gemäß Hoffmann & Roggenkamp⁸⁸.

4.1.2 Verlässlichkeitsprüfung der gefundenen genetischen Cluster

Die Zuverlässigkeit der gefundenen Cluster wurde mittels Bootstrap-Analyse überprüft. Dabei wurden die Cluster VII und IX mit 72% bzw. 76% unterstützt. Das Bootstrapping der Cluster II, III, IV, V, XI und XII ergab starke Unterstützung ($\geq 80\%$) dieser Gruppen. Ohne Isolat 248 wurde die Gruppe VI mit 89% stark unterstützt. Nicht unterstützt wurden die Cluster I mit dem *E. asburiae* Typstamm (60%), VIII (<50%) und xiii (<50%). Cluster VI, VII und VIII zusammengenommen hatten einen Wert von 51%.

restlichen genetischen Cluster nach Hoffmann und Roggenkamp⁸⁸ (EN18, EN25, EN28, EN30, EN114, EN117 und EN119). Der Baum wurde mit der *hsp60* Sequenz von *E. aerogenes* aus der GenBank Datenbank (ENAE accession no.: AB008141) „gerootet“. Die Clusterbezeichnung entspricht der von Hoffmann & Roggenkamp⁸⁸. Nummern an den Verzweigungspunkten indizieren die Bootstrap Werte nach 100 Wiederholungen. Das klinische Material ist durch Buchstaben hinter den Stammmummern angegeben. a: Blutkultur, b: Respirationstrakt, c: Urogenitaltrakt, d: Abdomen, e: Katheter-assoziiert, f: Gastrointestinaltrakt, g: Wunde/Abstrich, h: Pleura

4.1.3 Prospektive Untersuchung der Prävalenz der verschiedenen Spezies und genetischen Cluster in der Klinik

Bei der Untersuchung der Prävalenzen der verschiedenen Genotypen zeigten sich erhebliche Unterschiede. Zwei der Genotypen repräsentierten zusammen mehr als die Hälfte der Studienisolate (Cluster III, 49 Isolate; Cluster VIII (= *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*), 61 Isolate). Zwei weitere Cluster (V (= *E. ludwigii*) und VI (= *E. hormaechei* subsp. *oharae*)) beinhalteten zusammen knapp 20% der Studienisolate (je 18 Isolate). Eigenständige Cluster bildeten sich um die früher bekannten Typstämme *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. hormaechei* und *E. kobei*. Diese Cluster repräsentierten jedoch lediglich 1 (0,5%) bis 11 (5,6%) Studienisolate. *E. nimipressuralis* war nicht vorhanden (Abbildung 13 und Tabelle 15).

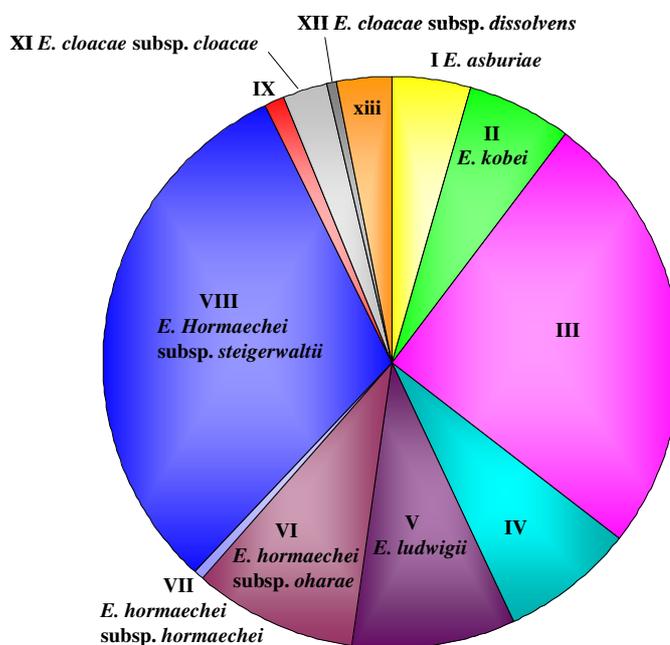


Abbildung 13: Kreisdiagramm der Prävalenzen der Genotypen im Gesamtkollektiv aller 196 untersuchten Isolate. Die Bezeichnung der Gruppen erfolgte gemäß Hoffmann & Roggenkamp⁸⁸.

Tabelle 15: Absolute und relative Häufigkeiten der Spezies/ Genogruppen im Gesamtkollektiv

Genogruppe		Anzahl	Prozent
I	<i>(E. asburiae)</i>	9	4,6%
II	<i>(E. kobei)</i>	11	5,6%
III		49	25,0%
IV		15	7,7%
V	<i>(E. ludwigii)</i>	18	9,2%
VI	<i>(E. hormaechei subsp. oharae)</i>	18	9,2%
VII	<i>(E. hormaechei subsp. hormaechei)</i>	1	0,5%
VIII	<i>(E. hormaechei subsp. steigerwaltii)</i>	61	31,1%
IX		2	1,0%
X	<i>(E. nimipressuralis)</i>	0	0,0%
XI	<i>(E. cloacae subsp. cloacae)</i>	5	2,6%
XII	<i>(E. cloacae subsp. dissolvens)</i>	1	0,5%
xiii		6	3,1%
		196	100,0%

Vier der Genotypen repräsentierten 74,5% der Studienisolate, während die bekannten Spezies *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* und *E. nimipressuralis* zusammen nur 13,8% ausmachten.

4.1.4 Material-abhängige Häufigkeiten der Genotypen

Die genauen Werte der Verteilung der genetischen Cluster auf die verschiedenen klinischen Materialien gehen aus Tabelle 16 und Abbildung 14 hervor.

Tabelle 16: Absolute Anzahl und in Klammern Prozentsatz der verschiedenen Cluster aufgetrennt nach den klinischen Materialien, von denen sie isoliert wurden.

Cluster	BK	RT	UGT	Abd.	Kath.	GIT	W./Ab	Pleura	gesamt
I	0 (0)	7 (12)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	9 (5)
II	1 (1)	6 (10)	0 (0)	1 (14)	0 (0)	1 (8)	2 (11)	0 (0)	11 (6)
III	20 (30)	12 (20)	5 (24)	2 (29)	1 (13)	3 (23)	4 (21)	2 (100)	49 (25)
IV	5 (7)	4 (7)	2 (10)	3 (42)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	15 (8)
V	7 (10)	2 (3)	3 (14)	0 (0)	1 (13)	5 (38)	0 (0)	0 (0)	18 (9)
VI	10 (15)	6 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8)	1 (5)	0 (0)	18 (9)
VII	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
VIII	16 (24)	19 (32)	8 (38)	1 (14)	5 (62)	1 (8)	11 (58)	0 (0)	61 (31)
IX	2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
X	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
XI	2 (3)	1 (2)	1 (5)	0 (0)	1 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (3)
XII	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
xiii	2 (3)	2 (3)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	6 (3)
gesamt	67	59	21	7	8	13	19	2	196

Abkürzungen: BK - Blutkultur, RT - Respirationstrakt, UGT - Urogenitaltrakt, Abd. - Abdomen, Kath. - Katheter-assoziiert, GIT - Gastrointestinaltrakt, W./Abs. - Wunden/ Abstriche

Bei den 67 Isolaten aus Blutkulturen waren fast alle Genotypen vertreten, und es gab nur eine signifikante Abweichung von der nicht-materialgebundenen Verteilung. Genotyp I kam signifikant seltener vor als im Gesamtkollektiv ($p = 0,029$; Fisher`s exact test). Die größten Gruppen waren Cluster III und VIII (= *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*) mit 30% bzw. 24%. Zusammen mit den Clustern V (= *E. ludwigii*) und VI (10% und 15%) machten auch hier diese vier Cluster 79% aus. Die früher bekannten Spezies repräsentierten zusammen 6% der Blutkulturisolate. Die Hälfte davon (insgesamt 3%) waren „echte“ *Enterobacter cloacae* Isolate.

Tabelle 17: Häufigkeiten der einzelnen Genotypen bei den Blutkulturisolaten (n BK), insgesamt (n insgesamt) und Angabe des p-Wertes mit verwendetem Test-Verfahren zu Berechnung der Signifikanz nach Vergleich mit der Verteilung im Gesamtkollektiv der 196 Isolate.

Genotyp	n BK	n insgesamt	p-Werte	Test
I	0	9	0,03	Fisher`s exact test
II	1	11	0,10	Fisher`s exact test
III	20	49	0,26	χ^2 -Test
IV	5	15	0,94	χ^2 -Test
V	7	18	0,66	χ^2 -Test
VI - VIII	27	80	0,92	χ^2 -Test
XI - XII	3	6	0,41	Fisher`s exact test

Bei den 59 Isolaten des Respirationstraktes war der Genotyp um *E. asburiae* mit 12% gegenüber 5% im Gesamtkollektiv signifikant überrepräsentiert ($p < 0,01$; Fisher`s Exact Test). Die am häufigsten vorkommenden Cluster waren III (20%) und VIII (= *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*) (32%).

Während der Genotyp IV bei der material-unabhängigen Verteilung 8% ausmachte, war er bei den 7 abdominalen Isolaten mit 42% signifikant überrepräsentiert (Fisher`s Exact Test; $p = 0,01$). Die Gruppen I, V, VI, VII, IX, X, XI, XII und xiii kamen nicht vor. Als einzige bekannte Spezies war *E. kobei* (II) vertreten.

Bei den 27 Isolaten, die von medizinischen Kathetern oder Wunden isoliert worden waren, überwog Cluster VIII (62% bzw. 58%). Fasste man die als *E. hormaechei* Subspezies beschriebenen Genotypen VI - VIII zusammen, erhielt man für Katheter-assoziierte Isolate 62% ($p = 0,28$; Fisher`s Exact Test) und für Isolate von Wunden/Abstriche 63% ($p = 0,04$; χ^2 -Test). *E. hormaechei* war damit bei Wund-/Abstrich-Isolaten signifikant überrepräsentiert.

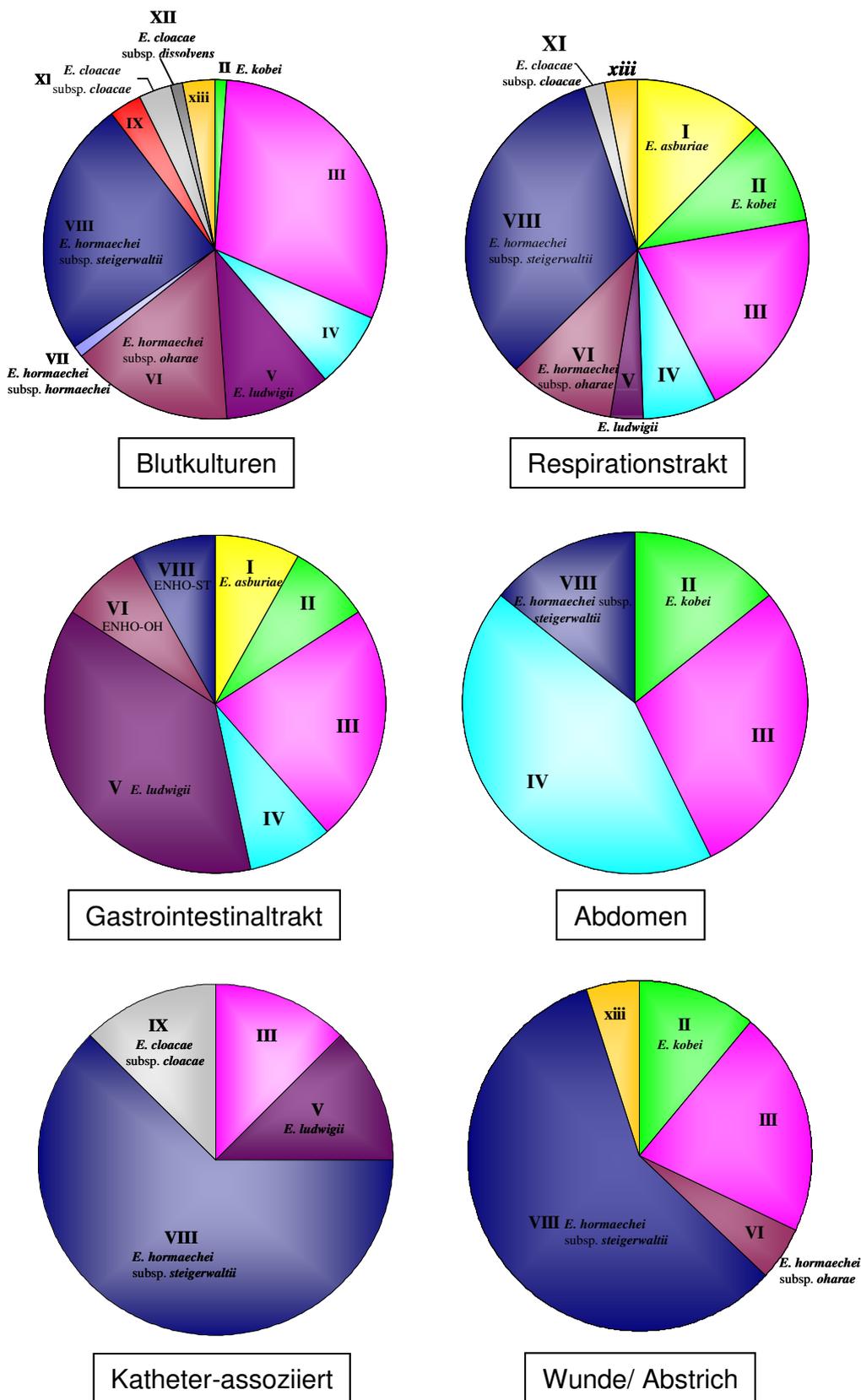


Abbildung 14: Kreisdiagramme der Prävalenzen der Genotypen bei den verschiedenen klinischen Materialien; ENHO-OH: *E. hormaechei* subsp. *oharae*, ENHO-HO: *E. hormaechei* subsp. *hormaechei*, ENHO-ST: *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*

Bei den 13 Isolaten aus dem Gastrointestinaltrakt war Cluster V (= *E. ludwigii*) mit 38% im Vergleich zu 9% im Gesamtkollektiv signifikant überrepräsentiert (Fisher's Exact Test; $p < 0,01$). Hingegen war *E. hormaechei* (Cluster VI-VIII), der im Gesamten 42% ausmacht, mit nur 16% vertreten (Fisher's Exact Test; $p = 0,54$).

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die Prävalenz der genetischen Cluster des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum der Universität München-Großhadern sehr ungleich ist. Vier der 13 Genotypen repräsentieren drei Viertel der klinischen Isolate. Die Spezies *E. hormaechei* (Cluster VI-VIII) machte 40% der Isolate aus.

Die einzelnen Genotypen sind nicht gleichmäßig auf die verschiedenen klinischen Materialien verteilt. So ist z.B. *E. hormaechei* bei Wundinfektionen signifikant überrepräsentiert, *E. asburiae* bei Isolaten des Respirationstraktes und *E. ludwigii* bei gastrointestinalen Isolaten.

4.2 Relevanz des *Enterobacter cloacae* Komplexes für nosokomiale Infektionen

In der internationalen Literatur häufen sich Berichte über Ausbrüche mit *E. cloacae*. Derartige Ausbrüche sind oft schwer zu beherrschen^{4,37,53,103,135} und gehen mit hoher Letalität^{62,117,128} einher. Sollten solche Ausbrüche auch im Klinikum Großhadern sehr häufig sein, würde dies ein erhebliches Hygiene-Problem darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Frage untersucht, welche Rolle klonale Ausbrüche mit Mitgliedern des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum Großhadern spielen. Steigt die Anzahl der Infektionen mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes tatsächlich aufgrund Verbreitung einzelner pathogener Stämme im Sinne von Ausbrüchen oder kommt es vielmehr durch gesteigerten Selektionsdruck zu vermehrten endogenen Infektionen mit verschiedenen Vertretern des Komplexes?

4.2.1 Validierung von Tests der Hygiene-Diagnostik im *E. cloacae* Komplex

Es gibt einige Methoden, die zur Identifizierung von Klonalität verschiedener Isolate verwendet werden. Als Goldstandard wird die PFGE angesehen. Häufig wurden für die Beschreibung von Ausbruchssituationen PCR-basierte Methoden, wie ERIC- und REP-PCR, verwendet. Eine Validierung dieser Methoden mit Berücksichtigung der Heterogenität des *E. cloacae* Komplexes liegt bisher nicht vor. In der vorliegenden Arbeit wurden 44 Isolate des genetischen Clusters III und 12 Isolate des genetischen Clusters VI mit den Methoden der ERIC- und REP-PCR und der PFGE auf Klonalität untersucht.

4.2.1.1 Pulsed-Field Gelelektrophorese

Die PFGE generierte nach Restriktionsverdau mit *XbaI* genetische Fingerabdrücke mit 7 bis 12 Banden pro Isolat (Abbildung 15). Gemäß der Kriterien von Tenover¹⁷⁸ wurden Isolate als klonal betrachtet, wenn die Bandenmuster der PFGE weniger als zwei Restriktionsstellen voneinander abwichen. Eine UPGMA-Cluster-Analyse der PFGE Bandenmuster ergab 52 unterschiedliche Bandenmuster (X-01 bis X-52). Vier der Bandenmuster (X-13, X-29, X-45 und X-49) waren jeweils bei zwei Isolaten identisch, wohingegen alle anderen unterschiedlich waren. Die vier Paare gleicher Bandenmuster gehörten alle zum Cluster III. Bei ihnen wurde die PFGE mit einem anderen Enzym (*SpeI*) wiederholt. In diesem zweiten Lauf waren wiederum die Bandenmuster von drei der Paaren identisch, wohingegen die Bandenmuster des vierten Paares (Isolate 116 und 607) voneinander abwichen (Abbildung 15). Bei einem

der Paare mit identischem Muster (268 und 425) stammten beide Isolate von einem Patienten. Sie dienten als interne Kontrolle. Bei den anderen beiden Paaren stammten die Isolate von verschiedenen Patienten und ließen Übertragung der Stämme von einem auf den anderen oder eine gemeinsame Infektionsquelle vermuten.

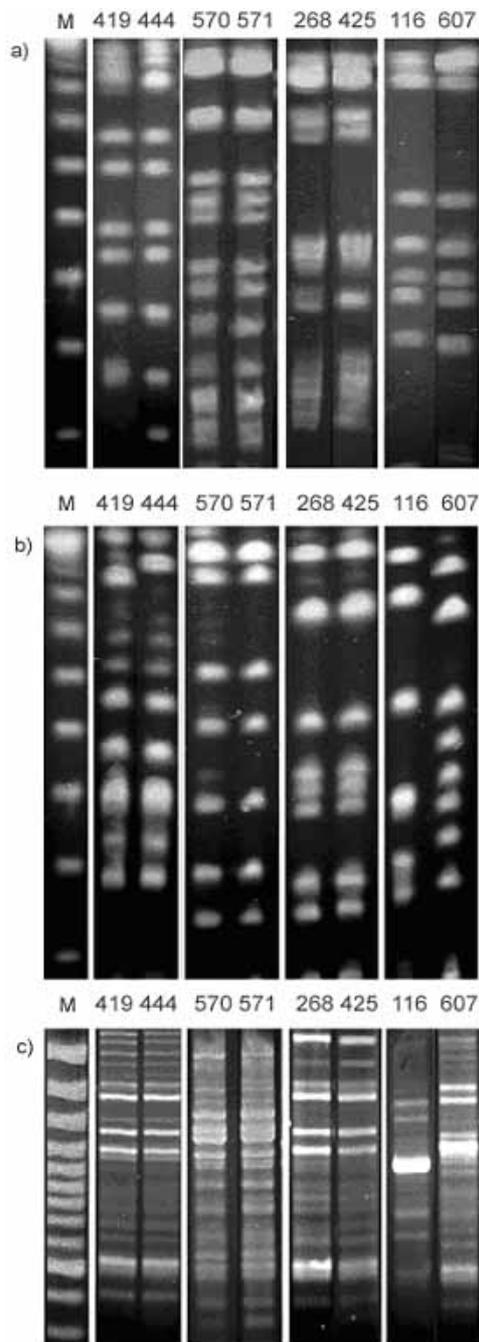


Abbildung 15: Identifikation der klonalen Isolate mittels PFGE. Isolate 268 und 425 waren als interne Kontrolle vom selben Patient isoliert worden. Nach Restriktionsverdau mit *XbaI* (a) wurden 4 Paare mit identischen PFGE Bandenmustern gefunden, von denen drei in einer zweiten PFGE nach Verdau mit *SpeI* reproduziert werden konnten (b). Die Bandenmuster der REP-PCR (c) korrespondierten mit den Ergebnissen der zweiten PFGE.

4.2.1.2 ERIC-PCR

Die ERIC-PCR der 56 Isolate ergab Bandenmuster mit etwa 7 bis 10 Banden pro Isolat (Abbildung 16). Die zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit bei jedem Lauf mitgeführte interne Kontrolle (Isolat Nr. 18) war in jedem Lauf identisch. Es musste somit keiner der ERIC-PCR Ansätze wiederholt werden. Die UPGMA Analyse ergab zwei Hauptgruppen (ERIC cluster i und ERIC cluster ii), die mit den genetischen Gruppen III und VI übereinstimmten (Abbildung 16). Innerhalb der Gruppen konnten 14 Gruppen mit unterschiedlichen Bandenmustern festgestellt werden (E-01 bis E-14). Sieben der Gruppen (E-01, E-02, E-03, E-07, E-08, E-12 und E-14) enthielten jeweils nur ein einziges Isolat, wohingegen zwei Gruppen (E-06 und E-11) je 2 Isolate enthielten, eine (E-13) 3 Isolate, eine (E-04) 4 Isolate, eine (E-10) 5 Isolate, eine (E-09) 14 Isolate und eine (E-05) 19 Isolate enthielt.

Alle Isolate mit identischen Bandenmustern in der PFGE hatten auch gleiche Bandenmuster in der ERIC-PCR, aber nur 7 (14%) der 50 Isolate, die mittels PFGE differenziert werden konnten, konnten auch mit der ERIC-PCR voneinander abgegrenzt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Differenzierbarkeit der Isolate mittels PFGE, ERIC-PCR, REP-PCR und der Kombination von ERIC- und REP-PCR

Methode	Unterscheidbare Stämme	
	n	% ^a
PFGE	50	100%
ERIC-PCR	7	14%
REP-PCR	45	90%
ERIC- + REP-PCR	46	92%

^a Prozentsatz der unterscheidbaren Isolate im Vergleich mit den PFGE Ergebnissen

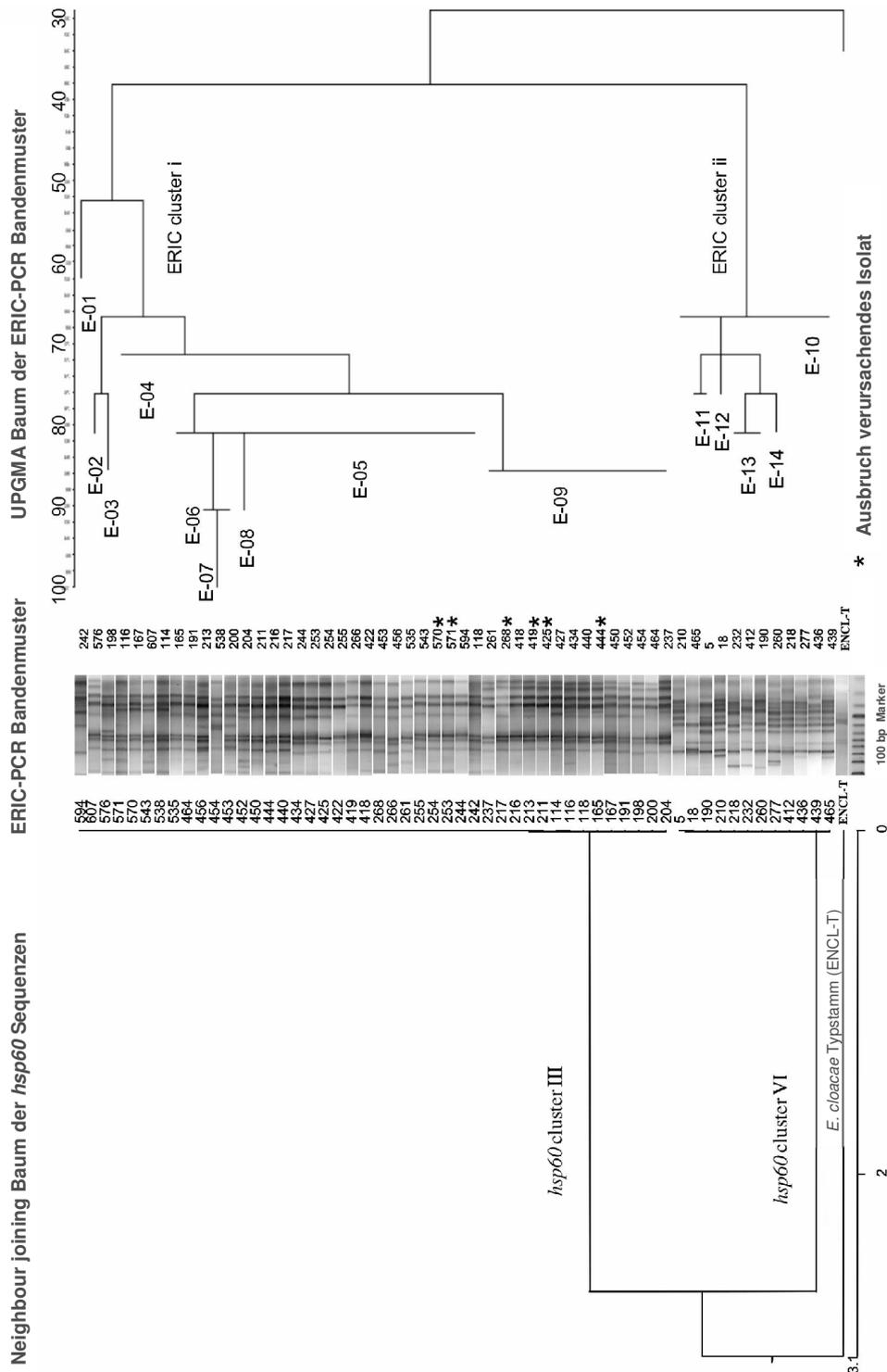


Abbildung 16: *hsp60* „Neighbour-joining Tree“ (links) und UPGMA Tree der ERIC-PCR Bandenmuster (rechts) der 56 prospektiv gesammelten klinischen Isolate des *E. cloacae* Komplexes, inklusive einer internen Kontrolle (268 und 425), die vom selben Patienten mit 3 Tagen Abstand isoliert wurde. Beide Bäume wurden mit dem *E. cloacae* Typstamm (ATCC 13047) „gerootet“. Die beiden Hauptgruppen der ERIC-PCR Bandenmuster (ERIC cluster i und ERIC cluster ii) stimmten mit den analysierten genetischen Clustern (III und VI) überein. Innerhalb dieser beiden ERIC-PCR Hauptgruppen wurden 14 Untergruppen beobachtet.

4.2.1.3 REP-PCR

Die Bandenmuster der REP-PCR Analyse waren komplexer als die der ERIC-PCR. Sie bestanden aus 10 bis 17 Banden pro Isolat (Abbildung 17). Wie bei der ERIC-PCR waren die Bandenmuster der internen Kontrolle 256 immer identisch reproduzierbar, und Wiederholungen der PCR Läufe waren nicht nötig. Wiederum ergab die UPGMA Analyse zwei Hauptgruppen (a und b). Mit Ausnahme von 7 Isolaten (116, 210, 211, 218, 242, 450 und 607) stimmten sie mit den ERIC Clustern i und ii bzw. den genetischen Clustern III und VI des *E. cloacae* Komplexes überein. 50 verschiedene Bandenmuster (R-01 bis R-50) wurden identifiziert. 45 dieser Bandenmuster wurden von nur einem Isolat repräsentiert (R-01, R-02, R-04 bis R-06, R-08 bis R-10, R-12 bis R-37, R-39 bis R-41 und R-43 bis R-50). Vier der REP-PCR Bandenmuster (R-03, R-07, R-11 und R-38) wurden bei jeweils zwei Isolaten gefunden und eine (R-42) bei drei Isolaten. Es gab kein Isolat des genetischen Clusters III, dessen ERIC- oder REP-PCR Bandenmuster identisch mit dem eines Isolats des genetischen Clusters VI war, oder umgekehrt.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der PFGE hatten 90% der Isolate mit unterscheidbaren PFGE Bandenmustern auch unterschiedliche REP-PCR Bandenmuster. Das heißt, dass nur 10% der Isolate, die mittels PFGE unterschieden werden konnten, in der REP-PCR nicht unterscheidbar waren. Wie auch bei der ERIC-PCR, hatten alle Paare, die in beiden Pulsed-Field Gelelektrophoresen gleich waren, auch identische REP-PCR Muster. Das Paar (116 und 607), das zwar in der ersten PFGE identische Bandenmuster zeigte, aber in der zweiten abweichende Bandenmuster hatte, war auch in der REP-PCR ungleich.

Kombinierte man die Ergebnisse von REP- und ERIC-PCR, konnten 92% der Isolate mit unterscheidbaren PFGE Bandenmuster auch mittels der PCR-basierten Methoden unterschieden werden (Tabelle 18).

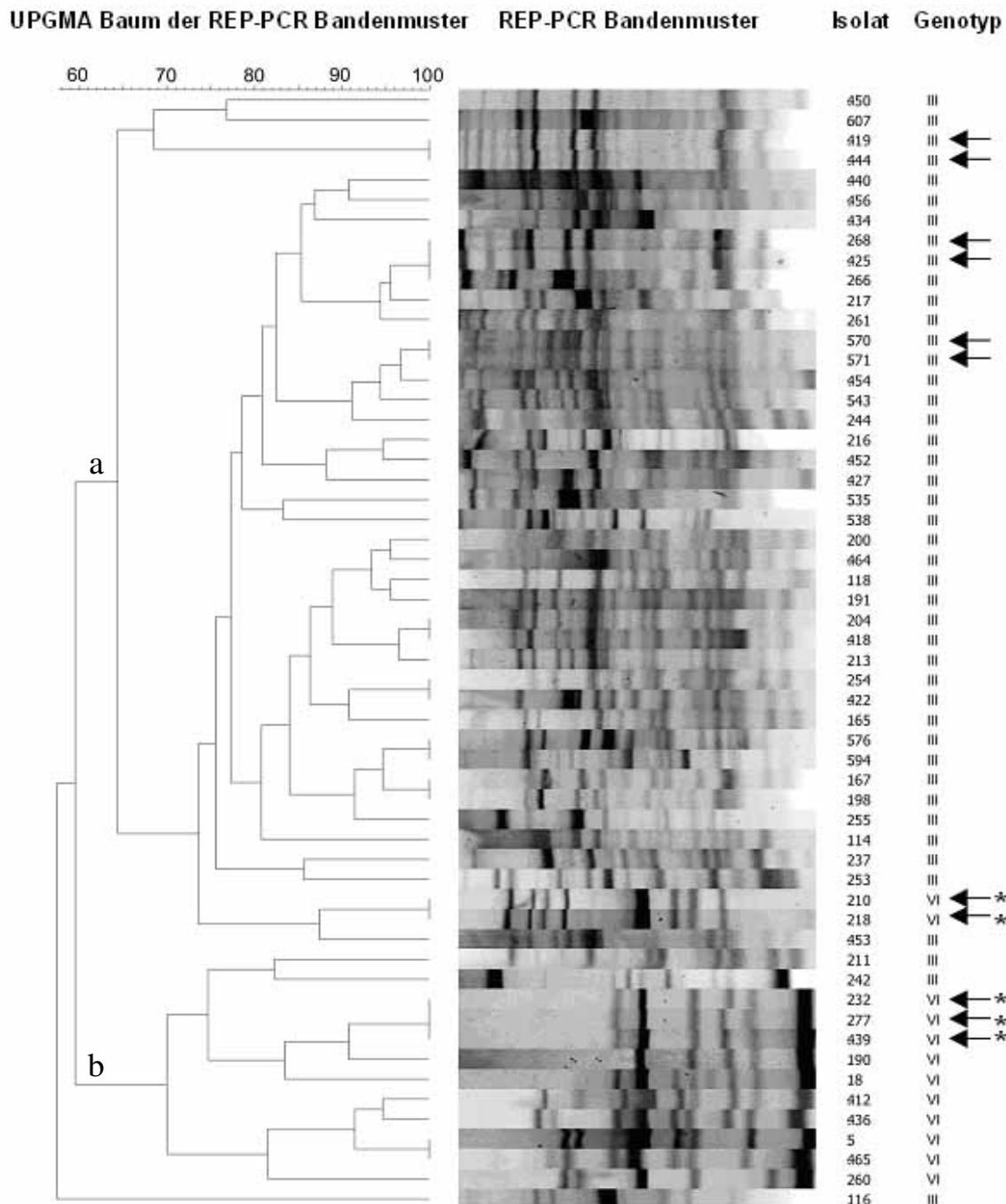


Abbildung 17: UPGMA Tree der REP-PCR Bandenmuster. Wie im „Neighbour-joining Tree“ aus Abbildung 16 entstanden 2 Hauptgruppen (a und b). Mittels REP-PCR konnten 7 Isolate nicht korrekt den entsprechenden Genotypen zugeordnet werden (116, 210, 211, 218, 242, 450 und 607).

← = Isolate mit identischen Bandenmuster in der REP-PCR; * = „fälschlicherweise“ identische Bandenmuster nicht-klonaler Isolate

Tabelle 19: Verwendete Studienisolate der Genotypen III und VI und ihre Charakteristika

Isolat Nummer	Klin. Material	Genet. Cluster ^a	Benennung der Bandenmuster ^b			
			PFGE (Xbal)	PFGE (SpeI)	ERIC	REP
114	Respirationstrakt	III	X-05	-	E-04	R-35
116	Gastrointestinaltrakt	III	X-49	S-05	E-04	R-50
118	Respirationstrakt	III	X-09	-	E-05	R-22
165	Pleura	III	X-38	-	E-05	R-29
167	Katheter	III	X-39	-	E-04	R-32
191	Respirationstrakt	III	X-26	-	E-05	R-23
198	Respirationstrakt	III	X-04	-	E-03	R-33
200	Urogenitaltrakt	III	X-01	-	E-06	R-20
204	Respirationstrakt	III	X-40	-	E-08	R-24
211	Urogenitaltrakt	III	X-47	-	E-05	R-40
213	Respirationstrakt	III	X-03	-	E-06	R-26
216	Urogenitaltrakt	III	X-41	-	E-05	R-15
217	Urogenitaltrakt	III	X-17	-	E-05	R-09
237	Pleura	III	X-50	-	E-09	R-36
242	Abstrich/ Wunde	III	X-31	-	E-01	R-41
244	Abdomen	III	X-02	-	E-05	R-14
253	Abstrich/ Wunde	III	X-10	-	E-05	R-37
254	Respirationstrakt	III	X-21	-	E-05	R-27
255	Urogenitaltrakt	III	X-07	-	E-05	R-34
261	Respirationstrakt	III	X-14	-	E-09	R-10
266	Abdomen	III	X-30	-	E-05	R-08
268	Blutkultur	III	X-45	S-03	E-09	R-07
418	Blutkultur	III	X-08	-	E-09	R-25
419	Blutkultur	III	X-13	S-01	E-09	R-03
422	Blutkultur	III	X-32	-	E-05	R-28
425	Blutkultur	III	X-45	S-03	E-09	R-07
427	Blutkultur	III	X-06	-	E-09	R-17
434	Blutkultur	III	X-18	-	E-09	R-06
440	Blutkultur	III	X-42	-	E-09	R-04
444	Blutkultur	III	X-13	S-01	E-09	R-03
450	Blutkultur	III	X-22	-	E-09	R-01
452	Blutkultur	III	X-33	-	E-09	R-16
453	Blutkultur	III	X-43	-	E-05	R-39
454	Blutkultur	III	X-24	-	E-09	R-12
456	Blutkultur	III	X-23	-	E-05	R-05
464	Blutkultur	III	X-48	-	E-09	R-21
535	Abstrich/ Wunde	III	X-11	-	E-05	R-18
538	Gastrointestinaltrakt	III	X-52	-	E-07	R-19
543	Blutkultur	III	X-15	-	E-05	R-13
570	Blutkultur	III	X-29	S-02	E-05	R-11
571	Blutkultur	III	X-29	S-02	E-05	R-11
576	Respirationstrakt	III	X-12	-	E-02	R-30
594	Abstrich/ Wunde	III	X-44	-	E-05	R-31
607	Gastrointestinaltrakt	III	X-49	S-04	E-04	R-02
5	Respirationstrakt	VI	X-35	-	E-11	R-47
18	Gastrointestinaltrakt	VI	X-16	-	E-12	R-44
190	Respirationstrakt	VI	X-34	-	E-13	R-43
210	Respirationstrakt	VI	X-36	-	E-10	R-38
218	Abstrich/ Wunde	VI	X-37	-	E-10	R-38
232	Respirationstrakt	VI	X-25	-	E-13	R-42
260	Respirationstrakt	VI	X-46	-	E-14	R-49
277	Blutkultur	VI	X-19	-	E-10	R-42
412	Blutkultur	VI	X-27	-	E-13	R-45
436	Blutkultur	VI	X-28	-	E-10	R-46
439	Blutkultur	VI	X-20	-	E-10	R-42
465	Blutkultur	VI	X-51	-	E-11	R-48

^a Bezeichnungen der genetischen Cluster gemäß Hoffmann und Roggenkamp⁸⁸, 2003

^b Fett gedruckt: Cluster mit mehr als einem Isolat

4.2.1.4 Algorithmus

Aus den Beobachtungen für die zwei untersuchten Cluster lässt sich folgender Algorithmus für die Identifikation klonaler Ausbrüche mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes ableiten. Demnach sollte beim klinischen Verdacht auf einen klonalen Ausbruch zunächst eine REP-PCR durchgeführt werden. Sind in der REP-PCR die Bandenmuster identisch, liegt bereits zu 90% Klonalität vor. Diese kann dann durch eine PFGE bestätigt werden. Eine zweite PFGE bringt keinen zusätzlichen Informationsgewinn¹⁷⁵. Dieser Algorithmus wurde im Folgenden zugrunde gelegt.

4.2.2 Gegenüberstellung von Sequenzclustern und ERIC-PCR-Mustern

In 4.2.1.2 wurde am Beispiel zweier Genotypen aufgezeigt, dass die ERIC-PCR nicht gut auf Stammebene differenziert, jedoch zur Differenzierung auf der Ebene von Genovaren gut geeignet ist. Um die Anwendbarkeit der ERIC-PCR auf die Clusterdifferenzierung im gesamten *E. cloacae* Komplex zu überprüfen, wurde eine zufällige Auswahl aus allen genetischen Clustern vorgenommen. Die ERIC-PCR Bandenmuster der 113 ausgewählten Studienstämme und der sechs Typ- bzw. Referenzstämme wurde mit GelCompar II Software analysiert und ein phylogenetischer Baum nach UPGMA Methode erstellt. Hierbei zeigte sich eine gute Abgrenzung der genetischen Cluster II, III, IV und V und der Sequenzgruppe xiii. Die zwei Isolate von *E. cloacae* subsp. *dissolvens* und die sechs Isolate von *E. cloacae* subsp. *cloacae* vermischten sich in einem ERIC-Cluster. Die Isolate des Clusters VIII spalteten sich in zwei Gruppen (VIIIa und VIIIb) auf. Diese entsprachen den Untergruppen, die sich auch in der *hsp60* Analyse gebildet hatten. Die Isolate der Gruppe VIIIb mischten sich in einer ERIC-Gruppe mit den Isolaten des Clusters VI. Bei beiden Clustern gab es je einen Ausreißer (252, VIII; 248, VI). Die Isolate von *E. asburiae* bildeten drei Gruppen (Ia, Ib und Ic). Die Cluster VII und IX, die jeweils nur mit zwei Isolaten vertreten waren, bildeten keine eigenen Gruppen. Bei 113 Isolaten gab es somit nur sieben Ausreißer (6%) (siehe Abbildung 18).

4.2.3 Ausbrüche

Kommt es in einer Klinik zur Häufung von Infektionen mit demselben Krankheitserreger, sehen sich Kliniker und Mikrobiologen vor die Frage gestellt, ob es sich hierbei um „echte“ klonale Ausbrüche oder um unabhängige Häufungen handelt. Um dies sicher und schnell festzustellen, sind valide Methoden nötig. Wie in 4.2.1.3 gezeigt werden konnte, eignet sich die REP-PCR gut zur Identifikation klonaler Isolate auch unter Berücksichtigung der

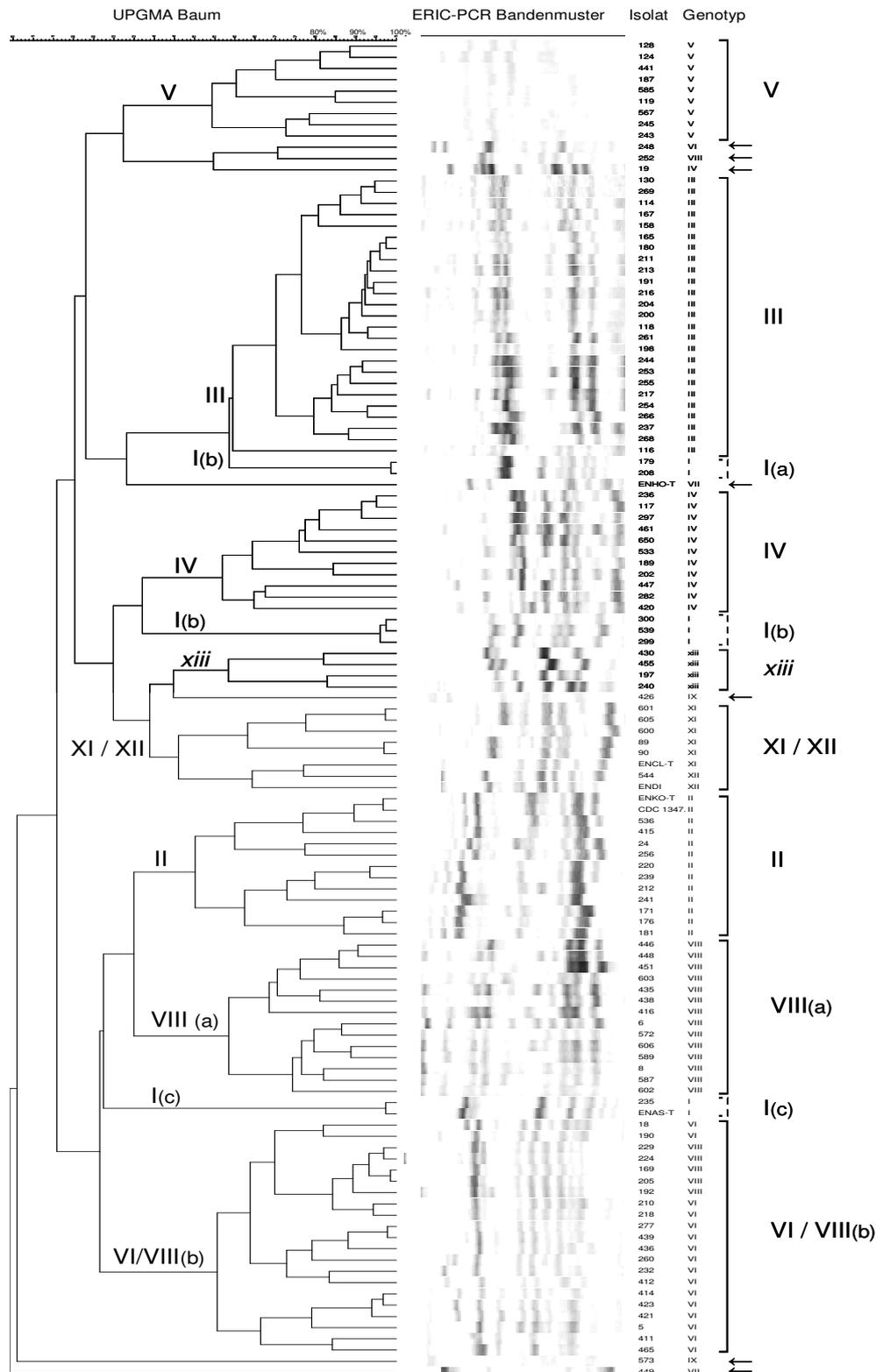


Abbildung 18: UPGMA Tree (Pearson-Koeffizient) der ERIC-PCR Bandenmuster einer zufälligen Auswahl von 113 Stämmen aus allen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes. Ausgewertet mit GelComparII.

←: Markiert „Ausreißer“, d.h. Isolate, die nicht mit den anderen Isolaten des jeweiligen Genotyps eine Gruppe bilden.

Heterogenität des *E. cloacae* Komplexes. Es gibt zahlreiche Berichte über steigende Prävalenzen von Infektionen mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes¹⁵⁹. Gleichzeitig häufen sich Schilderungen von vermeintlichen Ausbrüchen^{52,147,182}. Die tatsächliche Häufigkeit derartiger Ausbrüche sollte im Klinikum der Universität München-Großhadern ermittelt werden.

Dafür wurden alle Varia-Isolate der randomisierten Stammsammlung analysiert, die in einem 3-monatigen Zeitraum (26.10.2001 - 29.01.2002) isoliert worden waren (55% aller Isolate aus diesem Zeitraum). Sollten sich in dem Zeitraum Ausbrüche ereignet haben, ist davon auszugehen, dass in dieser repräsentativen Stichprobe Anhalt dafür gefunden würde. Zusätzlich wurden alle Isolate des *E. cloacae* Komplexes, die in einem Zeitraum von fünf Jahren aus Blutkulturen isoliert worden waren (06/97 - 06/2002), mittels REP-PCR auf Klonalität untersucht. Auf diesem Weg würden über einem Zeitraum von fünf Jahren Ausbrüche mit Stämmen des *Enterobacter cloacae* Komplexes, die zu invasiven Infektionen geführt haben, erkannt werden.

Die mit der REP-PCR erhaltenen Bandenmuster wurden mit GelCompar II ausgewertet, und ein phylogenetischer Baum nach UPGMA Methode erstellt (Abbildung 19). Bei Identität der Bandenmuster wurde die Klonalität mittels PFGE überprüft.

Die Analyse der REP-PCR Bandenmuster ergab vier gleiche Paare (419 und 444; 268 und 425; 570 und 571; 421 und 423). Die ersten drei davon entsprachen den bereits in 4.2.1.3 aufgeführten und mittels PFGE bestätigten klonalen Isolaten (siehe Abbildung 15). Davon war wiederum eins die interne Kontrolle von einem Patienten (268 & 425). Die Isolate 419 und 444 waren von zwei Patienten auf zwei internistischen Stationen im Abstand von knapp zwei Jahren isoliert worden. Die PFGE bestätigte Klonalität. Eine Übertragung konnte wegen des großen Zeitabstandes ausgeschlossen werden. Ob es eine gemeinsame Infektionsquelle gab, ist nicht mehr eindeutig nachvollziehbar.

Bei den Isolaten 570 und 571 handelte es sich um Blutkulturisolate, die im Abstand von vier Tagen von zwei Patienten der chirurgischen Intensivstation G5 isoliert worden waren. Die Klonalität bestätigte sich in der anschließenden PFGE.

Das vierte Paar (421 und 423) bestand aus Isolaten von Blutkulturen zweier Patienten der chirurgischen Intensivstation, isoliert im Abstand von sechs Tagen. Eine PFGE war trotz wiederholter Versuche nicht möglich. Da die beiden Isolate jedoch sowohl in REP- als auch in ERIC-PCR (siehe Abbildung 18) identische Bandenmuster aufwiesen, kann laut der

Analyse in 4.2.1.3 mit 92%iger Sicherheit von einem klonalen Ausbruch ausgegangen werden. Auch die Herkunft von derselben Station und die Kürze der Zeit zwischen den

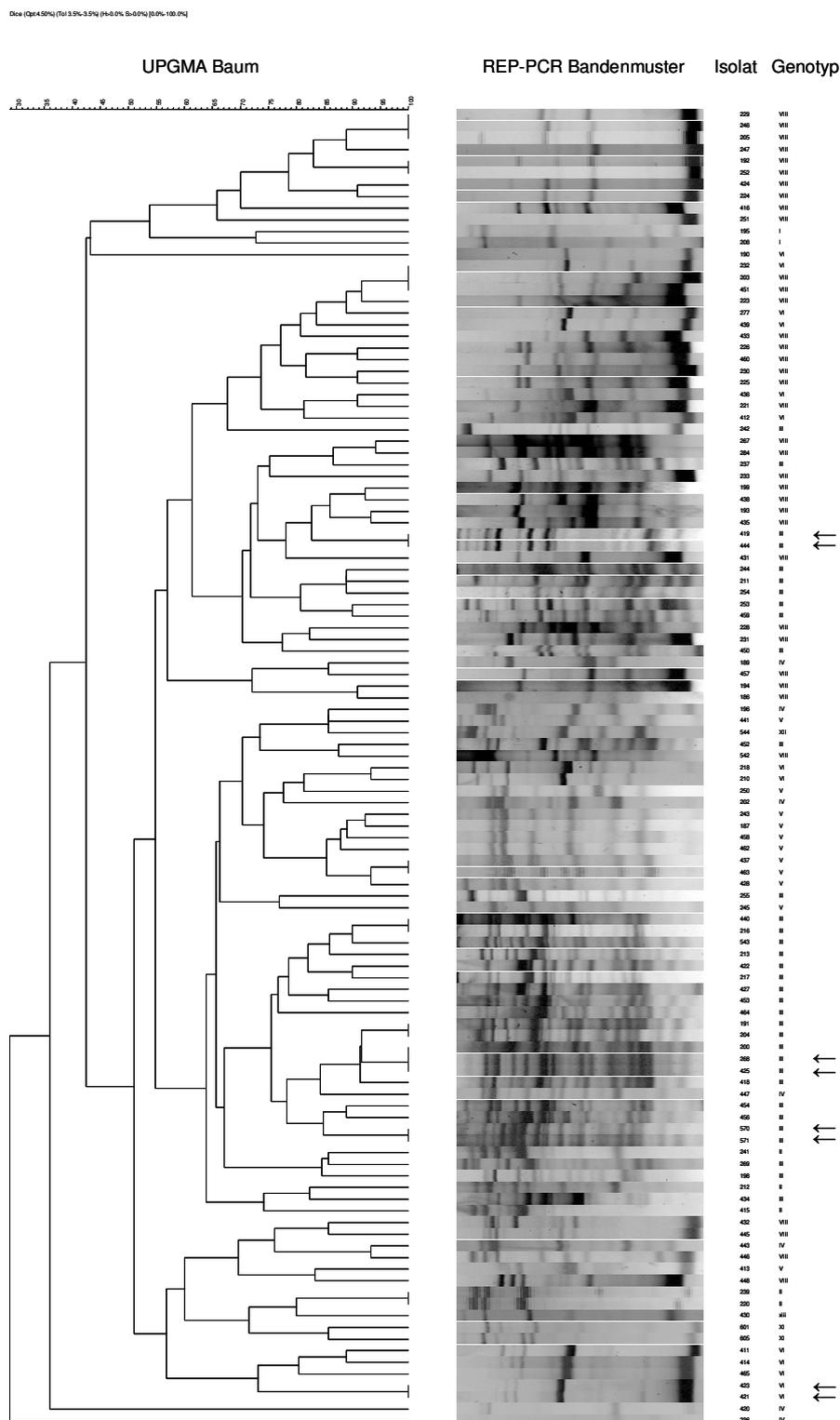


Abbildung 19: UPGMA Tree der REP-PCR Bandenmuster aller Isolate aus dem 3-monatigen Zeitraum (26.10.2001 - 29.01.2002) und aller Blutkulturisolate der untersuchten fünf Jahre.

←: Isolate mit identischen Bandenmuster.

Isolaten sprechen für einen klonalen Ausbruch.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass in einem großen deutschen Universitätskrankenhaus trotz intensiver Suche mit allen Blutkulturisolaten über fünf Jahre nur zwei sichere und ein fraglicher Ausbruch mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes gefunden wurde. In einer repräsentativen Stichprobe über drei Monate fanden sich bei allen anderen klinischen Materialien keine klonalen Isolate.

Da trotzdem eine steigende Zahl an Infektionen mit dem *E. cloacae* Komplex zu verzeichnen ist, muss angenommen werden, dass weniger mangelnde Hygiene als vielmehr erhöhter Selektionsdruck, unter anderem infolge vermehrten Einsatzes von Antibiotika, Infektionen mit diesen Bakterien begünstigen.

4.3 Subtraktive Hybridisierung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, ist der *E. cloacae* Komplex sehr heterogen, und die verschiedenen Genotypen sind mit unterschiedlicher Prävalenz als Krankheitserreger vertreten. Um Aufschluss über die entscheidenden Unterschiede zwischen den pathogenen und apathogenen Vertretern des Komplexes zu bekommen, wurde eine suppressive subtraktive Hybridisierung durchgeführt. Die Theorie dahinter ist einfach: Das Genom eines apathogenen Stamms (*Driver*) wird mit dem Genom eines virulenten Stamms (*Tester*) hybridisiert, und die hybridisierten Sequenzen werden entfernt. Übrig bleiben die Virulenz-assoziierten Gene des *Testers*. Um dabei gute Ergebnisse zu erzielen, sollten die untersuchten Stämme möglichst nah verwandt sein. Als Studienstämme wurden drei Vertreter des Clusters um *E. asburiae* gewählt. Als pathogener Stamm diente EN-373, ein Stamm, der auf einer Intensivstation bei drei Neugeborenen eine Sepsis verursacht hatte ⁵² (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Alberti, Palma de Mallorca). Als apathogene Stämme dienten die Isolate 501R3 und E6, die auch zum Cluster um *E. asburiae* gehörten und beide von Pflanzen isoliert worden waren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. P. Roberts, New Brunswick, USA). 501R3 und E6 werden zum Schutz von Gurken vor Wasserschnitzpilzen eingesetzt und gelten als apathogen.

4.3.1 Subtraktive Hybridisierung der Stämme EN-373 und 501R3 (=163)

Die bei der subtraktiven Hybridisierung gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels TopoCloning unter Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* kloniert. Die Subtraktion der Stämme EN-373 und 501R3 ergab 178 weiße Kolonien auf dem mit X-Gal angereicherten Agar. 50 wurden zufällig zur weiteren Analyse ausgewählt. Die klonierten Genabschnitte variierten in ihrer Länge von 10 bis 650 bp.

21 der 50 untersuchten Klone enthielten kein DNA Fragment. Vier enthielten unverwertbare Sequenzen.

Tabelle 20A gibt die Ergebnisse der subtraktiven Hybridisierung mit 501R3 wieder.

Tabelle 20: BLAST GenBank Suche mit Sequenzen der DNA-Fragmente aus 28 Klonen nach subtraktiver Hybridisierung des Ausbruchstammes EN-373 und Pflanzenisolat 501R3 (Teil A) bzw. E6 (TeilB)

Klon			Datenbankinformationen über homologe Gene						
Bezeichnung ¹	% C+G ²	bp mit Homologie ³	Accession No.	homologes Gen	Spezies, Serovar, Plasmid ⁴	Homologe Region ⁶	% ID ⁵	Score ⁷	Funktion des Proteins
A, Subtraktive Hybridisierung der Stämme EN-373 und 501R3									
A-114	56	1-288	BX664015	hypothetical	SEMA pR478	71129-70840	97	511	putative ATP/GTP-binding protein integrated in tellurium resistance operon
A-073	56	1-275	BX664015	hypothetical	SEMA pR478	71123-70848	96	468	putative ATP/GTP-binding protein integrated in tellurium resistance operon
B-036	56	21-214	BX664015	hypothetical	SEMA pR478	71169-70976	99	377	putative ATP/GTP-binding protein integrated in tellurium resistance operon
B-007	48	87-321	AY492000 AY030282	nirA & nirB, nreA & nreB homologues	KLOX LEPN	1318-1553	92	325	nickel/cobalt resistance determinant CCUG15788 integral membrane protein
A-104	55	19-447	AF067954 BX664015	silS	SATM pMG101 SEMA pR478	2624-2196 127176-126824	82 83	242 226	Sil-operon = plasmidal silver resistance genes
A-007	49	87-267	AY492000 AY030282 AF322866	nirAB, nreAB, ncrABC homologues	KLOX LEPN HAAL pNRS148	1318-1499 1690-1875	91	226 226 143	nickel/cobalt resistance determinant CCUG15788 integral membrane protein
A-051	52	245-415	AE008877	ibpB & ibpA	SATM LT2	12266-12437	88	174	small heat shock protein
D-007	63	32-170	AE016840	Hcr	SATY Ty2	255337-255475	89	165	NADH oxido-reductase
C-005	58	54-212	AE016762	dacD	ESCO CFT073	261785-261943	84	117	putative enzyme D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
B-031	57	26-188	AE005674	ycfW	SHFL 2a	1166030-1166192	82	101	putative kinase
A-000	55	23-165	AE008886	trkH	SATM LT2	6464-6322	83	101	Trk family potassium transport protein
A-053	59	174-244	AE008803	yfbE	SATM LT2	4172-4242	88	78	putative DegT/DnrJ/EryC1/StrS family regulatory system
C-007	48	13-48	AE008706	yafB	SATM LT2	15741-15706	94	56	2,5-diketo-D-gluconate reductase B
A-088	61	139-225	BA000007	hypothetical	ESCO O157:H7	3370219-3370306	82	48	Ecs3386, unknown function
C-006	60	1-24	KPN293850	EVGA	KLPN	56-79	95	40	putative positive transcription regulator EVGA

Tabelle 20 (Fortsetzung)

Klon			Datenbankinformationen über homologe Gene						
Bezeichnung ¹	% C+G ²	bp mit Homologie ³	homologes Gen	Accession No.	Spezies, Serovar, Plasmid ⁴	Homologe Region ⁶	% ID ⁵	Score ⁷	Funktion des Proteins
B, Subtraktive Hybridisierung der Stämme EN-373 und E6									
E-013	48	1-624	orf18	AF550679	ESCO p1658/97	54236-54860	99	1199	unknown
E-001 & E-007	47	1-571 19-125, 491-510	tragI	SMU60283 AF250878	SEMA pR478 SATY pR27	386-958 47386-47468	99 86	1098 101	putative restriction methylase
E-022	42	1-451	PR478 – intergenic region between RepH1A and tra2	SMU62007	SEMA pR478	2288-2738	99	886	None. RepH1A: putative Rep-protein Tra2: putative pilin precursor; similar to trhA from SATY plasmid pHCM1
E-010	42	1-386 22-204	like traE of F-plasmid	SMU62007 AF250878.1	SEMA pR478 SATY pR27	4201-4586 36704-36522	95 80	632 100	plasmid transfer protein
E-009	42	153-457	putative tnpB	STYFIMCLUS	SHFL 2a	1356-1052	97	541	putative Transposase B
E-011	44	1-275	insA_2	AE000134	ESCO	4764-5038	96	472	IS-element 30
E-034	44	8-188	IS4321R	EAU67194	ENAE pR751	14134-13954	100	359	putative transposase binding site
E-037	31	1-169	htdV	SMU62007	SEMA IncHI2 plasmid R478	7640-7472	84	183	putative transfer associated protein
E-002	42	531-612	tnpA	AF550679 AF342826	ESCO p1658/97	68019-68100 7419-7338	92 92	115 115	transposase
E-023	43	83-330 83-330	R0009, putative gene	AF250878 STYPPHCM1	SATY pR27 SATY CT18 pHCM1	12627-12380 69452-69699	80 80	103 103	hypothetical cell surface glycoprotein (s- layer prot)
E-029	48	1-247 1-247	R0135, putative gene	AF250878 STYPPHCM1	SATY pR27 SATY CT18 pHCM1	121746-121500 187835-188081	79 79	86 86	cell envelope: putative outer membrane constituents
E-033	50	51-139, 216-268, 330-450	R0156 putative gene	AF250878 STYPPHCM1	SATY pR27 SATY pHCM1	142955-143354 137009-137129	83 83	68 68	unknown

¹ Klone A-117, A-008, A-018, A-056, A-085, A-087, B-008, B-018, C-001, C-011, E-004, E-005, E-008, E-014, E-015, E-017, E-019, E-020, E-021, E-024, E-025, E-030, E-031, E-032, E-035: neue Sequenzen

² % C+G: C+G-Gehalt

³ Nukleotidbereich des klonierten Sequenz-Abschnitts mit Homologie

⁴ ENAE *Enterobacter aerogenes*, ENCL *Enterobacter cloacae*, ESCO *Escherichia coli*, HAAL *Hafnia alvei*, LEPN *Legionella pneumophila*, KLPN *Klebsiella pneumoniae*, SAEN *Salmonella enterica* Serotyp Enteritidis, SATY *Salmonella enterica* Serotyp Typhi, SATM *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium, SHFL *Shigella flexneri*,

⁵ % Nukleotid Identität

⁶ Sequenz Abschnitt der Accession Nummer mit Homologie zum Insert des entsprechenden Klons

⁷ BLASTN score (bits)

In der EMBL/GenBank Datenbank wurde nach Homologien zu den gefundenen Sequenzen gesucht. Zehn Klone enthielten neue Sequenzen ohne Homologie zu einem Gen der GenBank Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). 15 Inserts ergaben Homologien zu bekannten Sequenzen. Ihre GenBank Sequenz Accession Numbers sind in Tabelle 20A aufgelistet. Sechs Sequenzen (A-051, D-007, C-005, C-007, C-006, A-000) zeigten Homologien zu House-keeping Genen verschiedener Enterobakterien, einer (A-053) zu einem Zwei-Komponenten-Regulationssystem, einer (A-088) zu einem hypothetischen Protein und einer (B-031) zu einer mutmaßlichen Kinase; alle drei ohne bekannte Funktion. Zwei Sequenzen (A-007 und B-007) waren homolog zu Genen (*nirAB*, *nreAB*-like, *ncrABC*) der Nickel-/ Kobaltresistenz-Determinanten, die auf den Chromosomen von *Klebsiella oxytoca*, *Legionella pneumophila* bzw. dem Plasmid pNRS148 von *Hafnia alvei* kodiert sind.

Vier (A-114, A-073, B-036, A-104) der fünf Klone mit den besten BLAST Scores enthielten DNA Fragmente mit hoher Identität zu Genen, die auf dem Plasmid pR478 von *Serratia marcescens* kodiert sind. pR478 ist ein 274.762 bp großes Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe HI (IncHI). Es beherbergt Resistenz-Determinanten gegen mehrere Schwermetalle (*ter*-Operon für Tellurium-Resistenz, *mer*-Operon für Mercurium-Resistenz, *sil*-Operon für Silber-Resistenz, *cop*-Operon für Kupfer-Resistenz, *ars*-Operon für Arsen-Resistenz) und Antibiotika (*tetA* Gen für Tetrazyklin-Resistenz, *aphA* Gen für Kanamycin-Resistenz). Während drei der Sequenzen (A-114, A-073, B-036) homolog zu Genen mit unbekannter Funktion waren, wies eine Sequenz (A-104) Homologie zum *silS* Gen der *sil*-Determinante auf. *SilS* ist eins von neun Genen einer erst kürzlich charakterisierten Silberresistenz-Determinante⁷³. *SilS* kodiert für einen Membran Sensor, der einen Teil des Regulationssystems der Resistenz-Determinante darstellt. Die *silESRCBAP*-Determinante wurde auf mehreren Plasmiden der Inkompatibilitäts-Gruppe H identifiziert⁷⁵, z.B. pMG101, pMIP233, pWR23, pMIP235 von *Salmonella enterica* Serovaren, sowie pR476b und pR478 von *Serratia marcescens*. Zwei der Accession Nummern mit Homologien sind in Tabelle 20A aufgelistet, AF067954 von pMG101 und BX664015 von pR478. Plasmid pMG101 und pR478 gehören beide zur Untergruppe 2 der Inkompatibilitätsgruppe HI (IncHI-2).

4.3.2 Subtraktive Hybridisierung der Stämmen EN-373 und E6 (=164)

Bei einer subtraktiven Hybridisierung der Stämme EN-373 und E6, die mit demselben *Tester*-Stamm (373), aber einem anderen *Driver*, dem Pflanzenisolat E6 (=164) durchgeführt wurde, konnten 220 weiße Klone isoliert werden. 40 wurden zufällig zur weiteren Analyse

ausgewählt. Acht Plasmide enthielten keine Insertion, vier ergaben unverwertbare Sequenzen. 15 Plasmide enthielten unbekannte Sequenzen. Die restlichen 13 Sequenzen waren homolog zu übertragbarer DNA (siehe Tabelle 20B), z.B. Transposons (E-002, E-009), IS-Elementen (E-011) oder Plasmid-DNA. Wieder waren fünf der Sequenzen (E-001, E-007, E-022, E-010, E-037) mit den höchsten Scores in der BLAST-Suche homolog zu IncHI-2 Plasmid pR478 von *Serratia marcescens*. Drei Sequenzen (E-023, E-029, E-033) wiesen Homologie zu Bereichen von IncHI-1 Plasmiden von *Salmonella enterica* Serovar Typhi auf. Zwei weitere Sequenzen waren homolog zu Plasmiden von *Escherichia coli* (E-013) bzw. *Enterobacter aerogenes* (E-034). Alle Ergebnisse der zweiten subtraktiven Hybridisierung sind Tabelle 20B zu entnehmen.

4.3.3 IncHI-Plasmide

IncHI Plasmide tragen zahlreiche Resistenzgene gegen Antibiotika und Schwermetalle, z.B. auch die Silberresistenz-Determinante *sil*, deren Membran Sensor *silS* homolog zur Insertionssequenz von Klon A-104 war. Um zu verifizieren, ob Stamm 373 tatsächlich ein IncHI Plasmid besitzt, wurde eine PCR über die autoreplikative Region RepHIA durchgeführt, die auf beiden Subgruppen des Plasmids (IncHI-1 und -2) kodiert ist^{144,163}. Der „Ausbruchsstamm“ 373 war positiv, während die beiden Pflanzenisolate 501R3 (=163) und E6 (=164) negativ waren (siehe Abbildung 20). Dies lässt die Vermutung zu, dass 373 ein IncHI Plasmid enthält, die Pflanzenisolate hingegen nicht. Als Positivkontrolle diente das IncHI Plasmid pMG101 von *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (freundlicherweise zur Verfügung gestellt in *E. coli* von S. Silver, Chicago, USA).

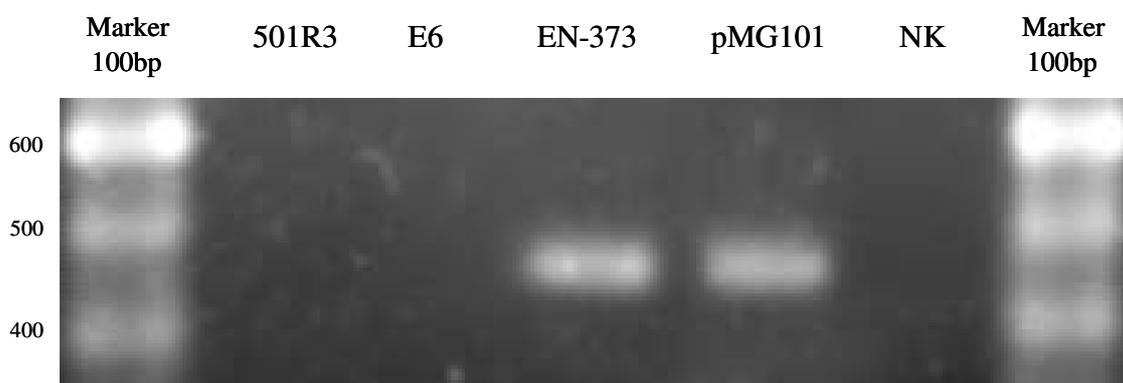


Abbildung 20: RepHIA-PCR der Teststämme 373, 501R3 und E6, Positivkontrolle pMG101 und Negativkontrolle (NK)

Aufschluss über die Subgruppe des IncHI Plasmids könnte die Sequenz E-022 der subtraktiven Hybridisierung der Isolate EN-373 und E6 geben. Sie enthielt ein 451 bp großes DNA-Fragment mit 99%iger Identität zur intergenetischen Region RepHI1A von pR478 und zu *tra2*. Dabei handelt es sich um einen Teil der Transferregion, die in dieser Form speziell bei Subgruppe IncHI-2 vorkommt.

4.3.4 *Sil*-Determinante

IncHI-Plasmide tragen häufig Resistenz-Determinanten gegen Schwermetalle, u.a. auch gegen Silberionen. Silber wird im klinischen Alltag aufgrund seiner bakteriziden Wirkung¹⁵⁷ in unterschiedlichen Verbindungen verwendet. Insbesondere bei Verbrennungswunden wird es als Prophylaxe und zur Behandlung von Wundinfektionen eingesetzt. Da Silberresistenz somit einen bakteriellen Überlebensfaktor oder „fitness factor“ darstellt, könnte die Anwesenheit einer *sil*-Determinante eine Erklärung für die Häufigkeit von nosokomialen Infektionen mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes insbesondere auf Verbrennungsstationen sein und hätte eine nicht zu unterschätzende klinische Bedeutung. Das richtete unsere Aufmerksamkeit auf Klon A-104 der subtraktiven Hybridisierung der Isolate EN-373 und 501R3, der eine Homologie zu *silS*, einem Silberresistenz-Regulatorgen, aufwies.

Aufgrund mehrerer Promotoren handelt es sich eigentlich um eine Silberresistenz-Determinante, in der internationalen Literatur wird jedoch auch oft vom *sil*-Operon gesprochen. Die *sil*-Determinante besteht insgesamt aus neun Genen. Dabei handelt es sich um zwei Transkriptionsregulatoren (die Sensorkinase *silS* und den DNA-bindenden Aktivator *silR*), ein periplasmatisches Silberionen-bindendes Protein (*silE*), sowie zwei voneinander unabhängige Effluxpumpen (*silP* und *silCBA*). *SilCBA* besteht aus dem 1048 Aminosäuren großen Protonen/Kationen-Antiporter der inneren Membran *silA*, dem Äußeremembran-Protein *silC* und dem Verbindungsstück *silB*. *SilS* kodiert für eine Sensorkinase, die zusammen mit *silR* die Transkription von *silE*, *silP* und *silCBA* reguliert⁷³. Außer diesen sieben gibt es noch zwei weniger untersuchte *open reading frames* (ORF96 und ORF105), die bislang ohne Namen sind. Die Anordnung der Gene ist Abbildung 21 zu entnehmen.

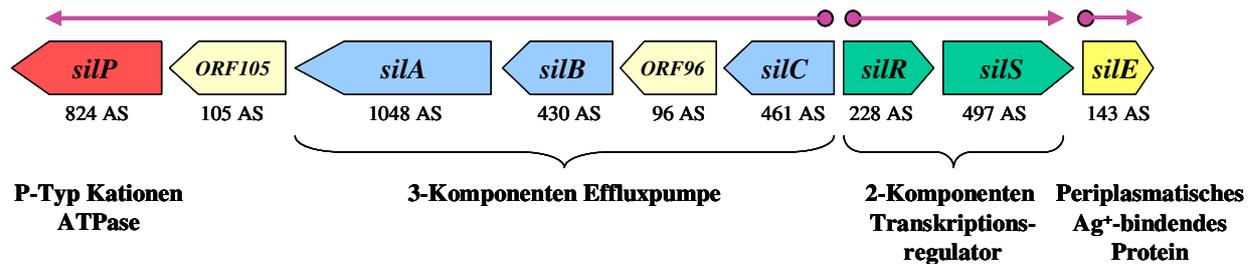


Abbildung 21: *sil*-Determinante mit den Genen *silP*, *ORF105*, *silA*, *ORF96*, *silC*, *silR*, *silS*, *silE*; AS = Aminosäuren. Die oberen Linien zeigen die mRNAs.

Die Anwesenheit der gesamten Determinante wurde bei Nachweis von vier der Gene aus verschiedenen Einheiten angenommen. Dies wurde für Stamm 373 mit folgenden PCRs überprüft: *sil_S* (741 bp des Gens für die Sensor Kinase *SilS*), *sil_R* (329 bp des Gens für das Responder-Protein *SilR*), *sil_P* (524 bp des Gens für die P-Typ Kationen-ATPase *SilP*) und *sil_C* (381 bp des Gens für das zentrale Protein *SilC* des Spannungs-abhängigen Kationen/Protonen-Antiporters *SilCBA*). Als Positivkontrolle diente *E. coli* DH5 α pMG101. Dabei handelt es sich um das Plasmid von *S. enterica* Serotyp Typhimurium auf dem erstmals von Gupta et al.⁷³ die *sil*-Determinante identifiziert und beschrieben wurde. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* DH5 α verwendet.

Alle *sil*-PCRs mit Stamm EN-373 zeigten positive Ergebnisse. Beim *Driver*-Stamm 501R3 (=163) konnten die entsprechenden DNA-Abschnitte nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 22). Als Positivkontrolle für die DNA-Proben der beiden Studienstämme wurde eine *hsp60*-PCR mitgeführt. Sie war für beide Teststämme positiv.

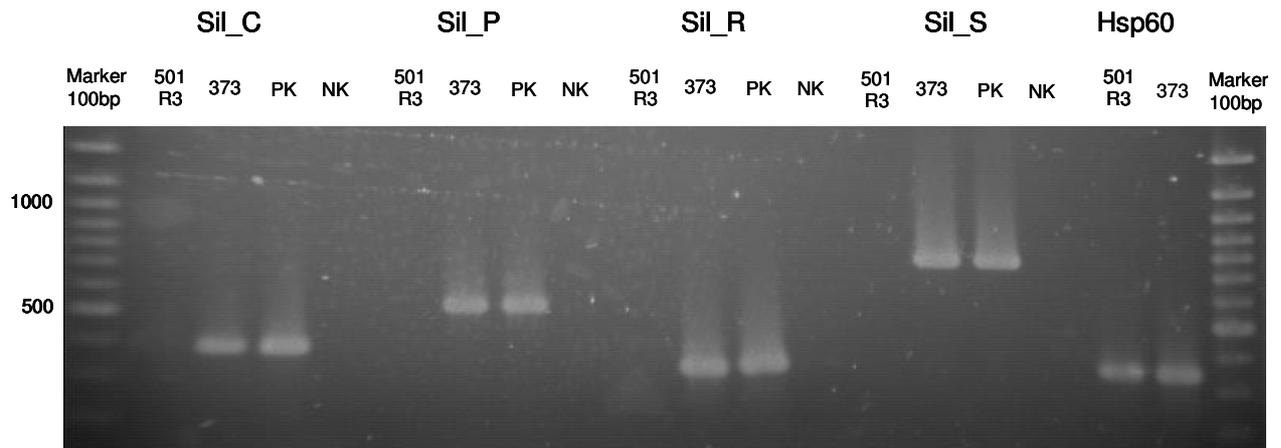


Abbildung 22: PCR über *silC*, *silP*, *silR* und *silS* bei *Driver* (501R3), *Tester* (373), Negativkontrolle (NK) und Positivkontrolle pMG101 (PK); *Hsp60*-PCR der beiden Teststämme (501R3 und 373) zum positiven DNA-Nachweis

Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die einzelnen Komponenten der *sil*-Determinante auf dem pathogenen Studienstamm 373 vorhanden sind, auf dem apathogenen Stamm 501R3 hingegen nicht.

4.3.4.1 Aufbau der Silberresistenz-Determinante im *E. cloacae* Komplex

Um zu überprüfen, ob die *sil*-Gene beim *E. cloacae* Komplex in der gleichen Reihenfolge angeordnet sind wie auf dem Plasmid pMG101 (siehe Abbildung 21), wurden PCRs von einem Gen zum nächsten über die gesamte Determinante durchgeführt. Es wurden PCRs von *silE* nach *silS*, innerhalb von *silS*, von *silS* bis *silR*, innerhalb von *silR*, von *silS* über *silR* bis nach *silC*, innerhalb von *silC*, von *silC* bis *silB*, von *silB* bis *silA*, von *silA* bis *silP* und innerhalb von *silP* durchgeführt. Alle PCRs ergaben dasselbe Ergebnis wie die Kontrolle *E. coli* DH5 α pMG101 (siehe Abbildung 23). Es ist also davon auszugehen, dass die Anordnung der *sil*-Gene beim Studienstamm EN-373 der auf Plasmid pMG101 entspricht.

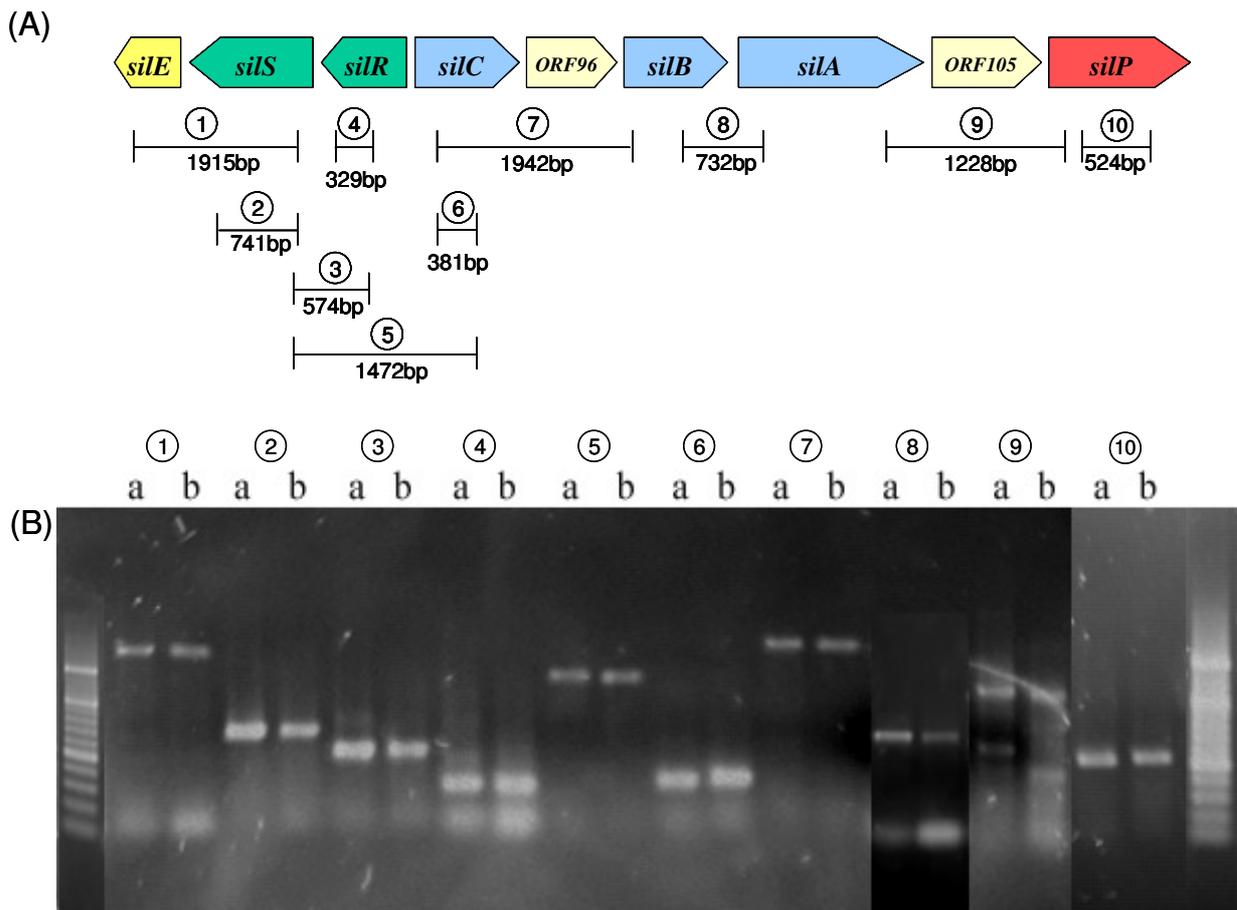


Abbildung 23: (A) Graphische Darstellung der *sil*-Determinante mit Darstellung der mittels PCR nachgewiesenen DNA-Abschnitte. (B) PCRs über *sil*-Determinante; a) Positivkontrolle DH5a pMG101, b) Teststamm 373; 1 *silE* bis *silS*; 2 *silS*; 3 *silS* bis *silR*; 4 *silR*; 5 *silS* bis *silC*; 6 *silC*; 7 *silC* bis *silB*; 8 *silB* bis *silA*; 9 *silA* bis *silP*; 10 *silP*

4.3.4.2 Ähnlichkeit der Nukleinsäuresequenzen der *sil*-Sequenzen bei *E. asburiae* zu den Sequenzen von Plasmid pMG101

Gupta et al. ⁷⁵ untersuchten kürzlich die Unterschiede der *sil*-Gene auf verschiedenen IncHI Plasmiden von vier *Salmonella* Serovaren (pMG101, pMIP233, pMIP235, pWR23) und *Serratia marcescens* (pR476b, pR478). Sie fanden, dass *silP* und *silE* hoch konserviert waren (Mittlere Nukleotid Identität mit pMG101 (MNI) 98.7% bzw. 99.0%), wohingegen *silS* signifikant schlechter konserviert war (MNI 96.2%).

Um die Nähe der Verwandtschaft der im *E. cloacae* Komplexes gefundenen *sil*-Determinante mit der bekannten Determinante von *S. enterica* Serotyp Typhimurium zu untersuchen, wurde der Identitätsgrad der Sequenzen der *sil*-Gene im *E. cloacae* Komplex mit den Sequenzen der

sil-Determinante auf pMG101 verglichen. Dabei zeigte sich eine MNI von 99% für *silS* und *silC*, für *silR* von 98%, für *silB* von 97%, für *silP* von 95%, für *silA* von 94% und für *ORF105* von 88% (Tabelle 21 und Abbildung 30 bis Abbildung 36, im Anhang 8.2). Bei der Homologiesuche in der GenBank Datenbank fanden sich bei allen Sequenzen die selben fünf Plasmide: pMG101 von *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium, pR478 von *Serratia marcescens*, pLVPK und pK2044 von *Klebsiella pneumoniae* und pAPEC-O2-R von *Escherichia coli*. Bei *silS* und *silP* fanden sich noch jeweils 5 weitere Plasmide (siehe Tabelle 23 im Anhang 8.1).

Tabelle 21: % Identität der *sil*-Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen von ENAS 373 mit pMG101;

% Identität mit der <i>sil</i>-Determinante von pMG101							
	<i>SilS</i>	<i>SilR</i>	<i>SilC</i>	<i>SilB</i>	<i>SilA</i>	ORF105	<i>SilP</i>
Nukleotide	99%	98%	99%	97%	94%	88%	95%
AS							
„Identities“	100%	97%	99%	94%	97%	96%	97%
„Positives“	100%	98%	100%	96%	98%	98%	98%

AS = Aminosäure; „Identities“ = identische Aminosäure, „Positives“ = Aminosäure mit gleichen Eigenschaften

4.3.4.3 Ähnlichkeit der abgeleiteten Proteinsequenzen der *sil*-Gene beim *E. cloacae* Komplex zu den Sequenzen von Plasmid pMG101

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) mit pMG101 von *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium (Accession Number: AF067954) ergab Identitäten von 100% für *SilS*, 97% für *SilR*, 99% für *SilC*, 94% für *SilB*, 97% für *SilA*, 96% für ORF105 und 97% für *SilP* (siehe Tabelle 21 und Abbildung 37 bis Abbildung 43 im Anhang 8.3).

Bei einer über 90%igen Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *sil*-Determinante von ENAS 373 mit der von *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium pMG101 und übereinstimmender Reihenfolge der Gene, kann von der Anwesenheit der gesamten Determinante bei *E. cloacae* ausgegangen werden. Im Weiteren wurde untersucht, wie weit die *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex verbreitet ist.

4.3.4.4 Verteilung der *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex

Wie im ersten Abschnitt dargestellt, unterscheiden sich die einzelnen Genotypen unter anderem durch signifikant divergierende Prävalenz in der Klinik. Eine der Fragen in der vorliegenden Arbeit war, ob es bestimmte Fitness- oder Pathogenitätsfaktoren gibt, die das bedingen können. Ein hygienischer Fitnessfaktor wie die Silberresistenz könnte durch eine ungleiche Verteilung in den einzelnen Genotypen einen Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen Prävalenz als nosokomiale Erreger darstellen.

Deshalb wurden 164 Vertreter aus allen Genogruppen mittels derselben PCRs wie unter 4.3.4 beschrieben untersucht. Mit den PCRs wurden Genabschnitte von *silC*, *silP*, *silR* und *silS* amplifiziert (siehe 4.3.4). Alle Isolate waren im Klinikum Großhadern isoliert worden. Es handelt sich dabei um dieselben Isolate, die auch bisher in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Lediglich bei den großen Clustern III und VIII wurde die Anzahl der Isolate randomisiert auf $\frac{2}{3}$ der Isolate beschränkt. Um eine aussagekräftiger Fallzahl zu erlangen, wurden neben den zwei Isolaten (426, 573) von Cluster IX noch vier Isolate (EN363, EN364, EN520 und EN524) des Clusters IX aus der internationalen Stammsammlung⁸⁸ hinzugenommen.

63% der Stämme waren in allen vier PCRs positiv (siehe Tabelle 22), weshalb davon ausgegangen werden dürfte, dass etwa zwei Drittel der klinischen Isolate des *E. cloacae* Komplexes die gesamte Silberresistenz-Determinante besitzen. Die am häufigsten in der Klinik vertretenen Cluster (III, VI und VIII) waren überwiegend ($\geq 80\%$) positiv in allen vier PCRs. In den Clustern IX und xiii, die am seltensten als klinische Isolate gefunden wurden, gab es kein Isolat, das in allen vier PCRs positiv war, allerdings waren die meisten Vertreter der Gruppe xiii zumindest in ein oder zwei PCRs positiv.

In Cluster V (= *E. ludwigii*) waren die meisten der 18 Isolate positiv in der *sil_S* PCR und die Hälfte in den *sil_C* oder *sil_P* PCRs, aber nur zwei Isolate in allen PCRs. Das ließ vermuten, dass die Isolate entweder nur Teile der *sil*-Determinante besitzen oder *sil*-Gene, die so niedrige Ähnlichkeit hatten, dass sie von der PCR nicht erfasst wurden. Cluster V repräsentierte 9,2% der Stämme in dieser Studie und 6% in der internationalen Populationsgenetik⁸⁸.

Tabelle 22: *sil*-PCRs der verschiedenen Genogruppen der klinischen Isolate

Cluster (Spezies) ¹	N	Positiv in PCR				Alle vier positiv ²
		Sil_C	Sil_P	Sil_R	Sil_S	
I	9	9 100%	6 67%	6 67%	9 100%	6 67%
II	11	11 100%	9 82%	11 100%	10 91%	8 73%
III	33	27 82%	27 82%	27 82%	27 82%	27 82%
IV	15	15 100%	9 60%	14 93%	15 100%	9 60%
V	18	9 50%	11 61%	5 28%	17 94%	2 11%
VI + VII	19	17 89%	16 84%	17 89%	16 84%	16 84%
VIII	40	32 80%	32 80%	32 80%	32 80%	32 80%
IX	6	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
XI + XII ³	7	6 86%	5 71%	6 86%	4 57%	4 57%
xiii	6	5 83%	3 50%	3 50%	3 50%	0 0%
sum	164	131 80%	118 71%	121 74%	133 81%	104 63%

¹ Genetische Cluster gemäß Hoffmann und Roggenkamp⁸⁸, 2003.

² Verteilung der in allen vier PCRs positiven Isolate auf die genetischen Cluster

³ Inklusive *E. cloacae* Typstamm ATCC 13047^T

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Silberresistenz Determinante signifikant häufiger in den Genogruppen vertreten war, die in der Klinik oft vorkamen (III, VI und VIII), als in denen, die selten vertreten waren (V, IX und xiii) (χ^2 -Test, $p < 0.0001$).

4.3.4.5 Phänotypie der Silberresistenz

Die Präsenz einer Silberresistenz-Determinante erklärt nur dann die höhere Fitness im Krankenhausmilieu, wenn sie auch mit einer phänotypischen Resistenz gegen Silberionen einhergeht. Deshalb wurde die Resistenz gegen Silberionen von fünf Vertretern des *Enterobacter cloacae* Komplexes in LB Medium getestet. Die Wachstumskurve in LB-

Flüssigmedium in Abhängigkeit von der AgNO_3 Konzentration ist in Abbildung 24 dargestellt. Wiederum diente *E. coli* DH5 α als Negativkontrolle, *E. coli* DH5 α pMG101 als Positivkontrolle. Die Isolate 114, 163 (=501R3), 164 (=E6), die in allen PCRs negativ waren, und die Negativkontrolle DH5 α wuchsen nicht in AgNO_3 Konzentrationen über $100\mu\text{M}$. Die Isolate 244, 373, die in allen PCRs positiv waren, und Positivkontrolle DH5 α pMG101 wuchsen bei Konzentrationen bis $800\mu\text{M}$.

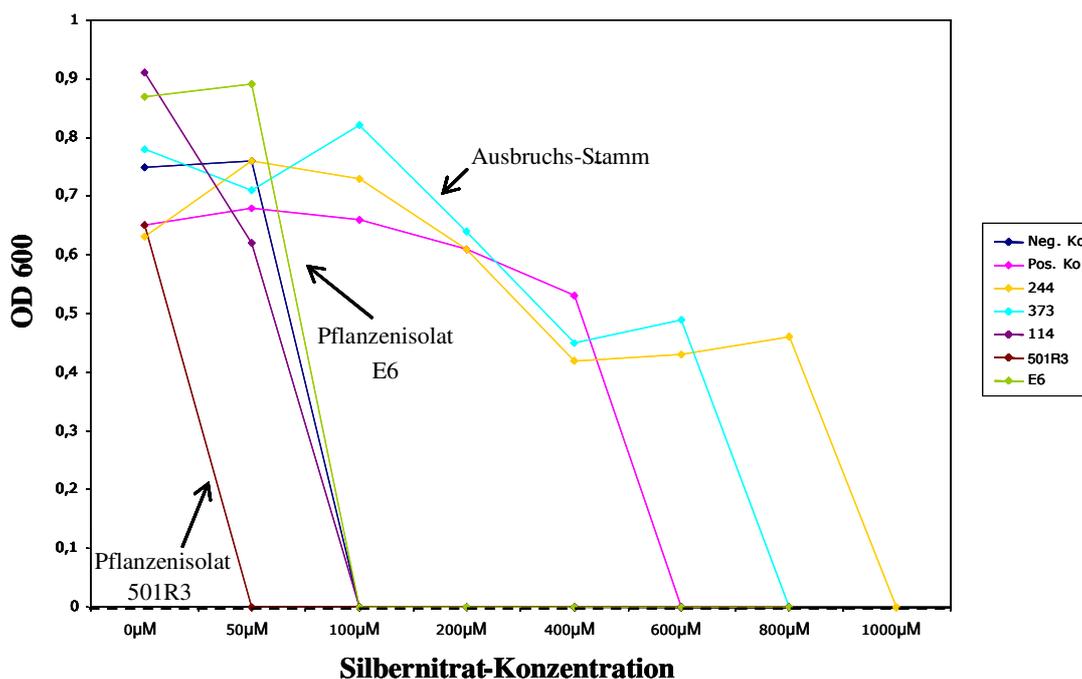


Abbildung 24: Wachstumskurven der Teststämme in LB-Flüssigmedium in Abhängigkeit von der AgNO_3 Konzentration

Diese Ergebnisse konnten auf LB Agar mit verschiedenen Konzentrationen AgNO_3 bestätigt werden. Wie in Abbildung 25 dargestellt wuchsen auch hier Isolate ohne *sil*-Determinante nicht bei AgNO_3 Konzentrationen über $100\mu\text{M}$, Isolate, bei denen in der PCR die *sil*-Determinante nachgewiesen wurde, hingegen bis $800\mu\text{M}$. Dies entsprach den Ergebnissen von Gupta et al.⁷⁴ und ließ annehmen, dass die *sil*-Determinante im *Enterobacter cloacae* Komplex tatsächlich zu einer Resistenz gegen Silberionen führt.

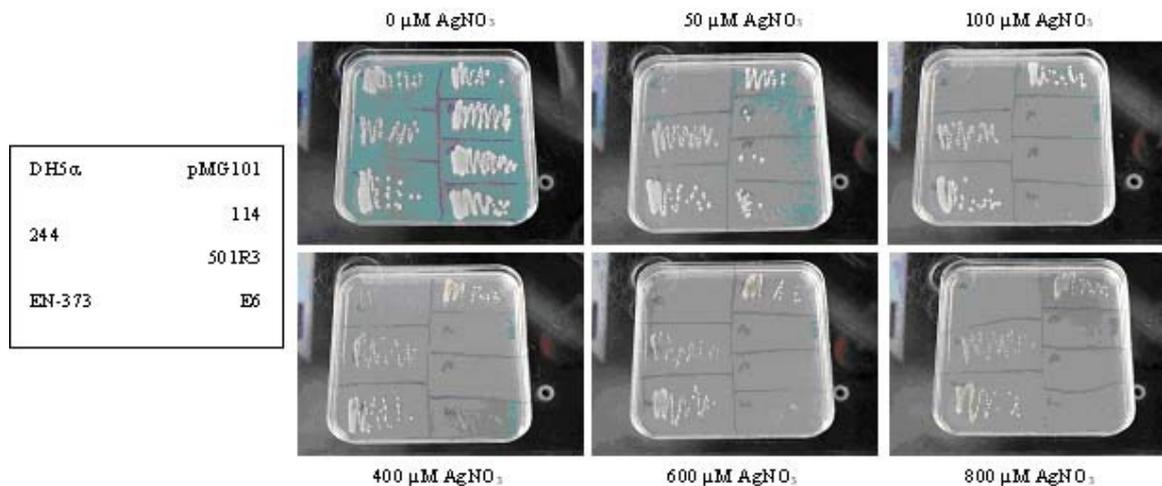


Abbildung 25: Wachstum der Teststämme auf LB-Agar in Abhängigkeit von der Silbernitrat-Konzentration

4.3.5 Kontrolle mittels Suche nach „High Pathogenicity Island“

Mit der *sil*-Determinante fand sich ein wichtiger Fitnessfaktor des *E. cloacae* Komplexes für das Überleben im Krankenhaus. Pathogenitätsfaktoren im engeren Sinne fanden sich aber nicht. Deshalb wurde gezielt nach einer bekannten Pathogenitätsinsel, der „High Pathogenicity Island“ von *Yersinia pestis*, gesucht. Hierfür wurden die zwei am besten konservierten Gene (*fyuA* und *irp1*) der Insel verwendet. Von den 196 Stämmen waren drei Stämme (1,5%) in beiden PCRs positiv. Der Restriktionsverdau mit der Endonuklease *HaeIII* des *fyuA*-PCR-Produktes von Isolat 456 und der Positivkontrolle (*Citrobacter koseri*, Stamm 53) bestätigte die Identität des DNA-Fragmentes (siehe Abbildung 27). Die restlichen Stämme zeigten in keinem der gesuchten Gene ein positives PCR-Ergebnis. Zwei der drei positiven Stämme waren Isolate des Respirationstrakts und gehörten zum Cluster VIII (= *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*) (221 und 301), das dritte Isolat (456) stammte aus einer Blutkultur und gehörte zum genetischen Cluster III.

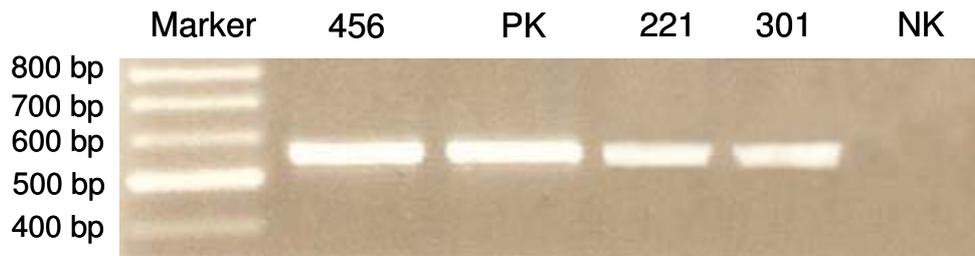


Abbildung 26: PCR *fyuA* der High Pathogenicity Island; PK:Positivkontrolle (*Citrobacter koseri* Nr. 53); NK: Negativkontrolle

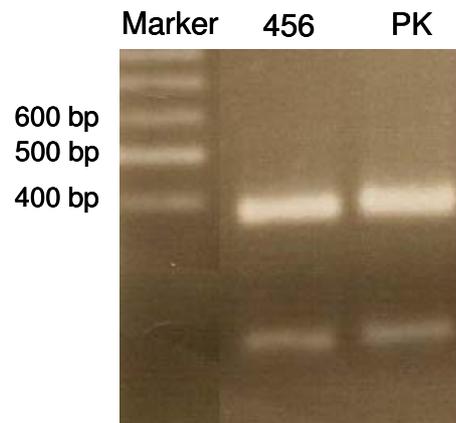


Abbildung 27: Verdau *fyuA*



Abbildung 28: PCR *irp1* der Teststämme 456, 221 und 301

Aus den Ergebnissen dieser Stichprobe war zu erkennen, dass die „High pathogenicity island“ in diesem Kollektiv des *E. cloacae* Komplexes im Gegensatz zu anderen Studien¹⁶¹ nur sehr selten vorkommt.

4.4 Die wichtigsten Ergebnisse im Überblick

Folgende wichtige Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit gefunden:

- Es gibt eine signifikant unterschiedliche Verteilung der einzelnen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes in der Klinik. Zwei Drittel der Isolate wurden durch die drei Genotypen III, VI (= *E. hormaechei* subsp. *oharae*) und VIII (= *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*) repräsentiert. Die eigentliche Spezies *E. cloacae* nahm nur eine untergeordnete Rolle ein. Die einzelnen Genotypen hatten Prädilektionen zu verschiedenen klinischen Materialien, von denen sie isoliert worden waren. Bei Blutkultur Isolaten war Genotyp I signifikant unterrepräsentiert, bei Respirationstrakt Isolaten hingegen überrepräsentiert. Bei abdominellen Isolaten war das genetische Cluster IV signifikant überrepräsentiert, bei Isolaten aus dem Gastrointestinaltrakt Cluster V (*E. ludwigii*). Bei Wund-/Abstrich-Isolaten waren die Subspezies von *E. hormaechei* (Cluster VI-VIII) signifikant häufiger vertreten.
- Mit der ERIC-PCR war eine gute Differenzierung auf Ebene von Genovaren und Spezies möglich. Eine Identifikation von klonalen Isolaten innerhalb der Genotypen war mit der REP-PCR mit einer Spezifität von 90% im Vergleich zum Goldstandard PFGE möglich. Bei den untersuchten Blutkultur-Isolaten aus fünf Jahren und den Varia-Isolaten aus drei Monaten konnten mittels REP-PCR und PFGE nur zwei sichere Ausbrüche identifiziert werden. Beide umfassten jeweils zwei Isolate und alle waren aus Blutkulturen isoliert worden. Ausbrüche mit dem *E. cloacae* Komplex scheinen im Klinikum Großhadern eher selten zu sein.
- Mittels suppressiver subtraktiver Hybridisierung konnte die Silberresistenz vermittelnde *sil*-Determinante als Fitnessfaktor identifiziert werden. Die Analysen zeigten eine hohe Identität der Nukleotid- und abgeleiteten Proteinsequenzen mit der *sil*-Determinante des *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium Plasmids pMG101. Etwa $\frac{2}{3}$ der untersuchten Stämme aus allen Clustern besaßen die Silberresistenz-Determinante. Sie war dabei signifikant häufiger in den Genotypen vertreten, die in der Klinik prävalenter waren (III, VI und VIII). Das Vorhandensein der Silberresistenz-Determinante war mit phänotypischer Resistenz gegen Silberionen assoziiert. Fehlte die Determinante waren die Isolate empfindlich gegen relativ niedrige AgNO₃-Konzentrationen.

5 Diskussion

5.1 Klinische Prävalenz der Genotypen des *E. cloacae* Komplexes

E. cloacae ist ein gram-negatives Bakterium der mukosalen Normalflora von 40-80% der Menschen¹⁰⁸ und gleichzeitig der dritthäufigste Erreger von Pneumonien auf Intensivstationen². Er ist einer der fünf häufigsten Sepsiserreger¹⁵⁹ und verursacht ca. 5% aller Bakteriämien und Harnwegsinfekte auf Intensivstationen². Während sich die Letalität von Bakteriämien durch den *E. cloacae* Komplex in derselben Größenordnung bewegt wie die anderer Enterobakterien^{16,17,45,159}, liegt sie bei Pneumonien deutlich höher^{28,107,121,126,159}. Endokarditiden mit *Enterobacter* Arten sind zwar selten, jedoch starben in den Jahren 1949-1990 von 18 Fällen 8 Patienten (44.4%)¹⁸¹.

Trotz der bekannten und noch immer zunehmenden klinischen Bedeutung und obwohl auch die genetische Heterogenität der Nomenspezies *Enterobacter* schon lange bekannt ist^{71,123,194}, wurde die phylogenetische Verwandtschaft der einzelnen genetischen Gruppen erst kürzlich⁸⁸ eingehend untersucht. Auch diese Studien spiegelten jedoch nicht das Bild eines einzelnen Krankenhauses wider, da sie auf überregionalen bzw. internationalen Stammsammlungen^{71,88} basierten. Lindh et al.¹²³ verwendeten zwar eine lokale Stammsammlung, schlossen aber in ihre Untersuchungen nur wenige Typstämme ein, so dass auch hier nur ein unvollständiges Bild zustande kam.

Deshalb wurde nun erstmals in der vorliegenden Studie ein vollständiges Bild über die Prävalenz der einzelnen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes innerhalb eines großen Universitätskrankenhauses erfasst. Die Zuverlässigkeit und Vollständigkeit der Daten wurde insbesondere durch die prospektive und randomisierte Sammlung der Teststämme sowie die direkte Angliederung an die mikrobiologische Routinediagnostik, in der alle Isolate des Hauses erfasst wurden, gewährleistet. Damit konnte die relative Bedeutung der einzelnen Genotypen in einem deutschen Krankenhaus abgeschätzt werden.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Prävalenzanalyse sind, dass der größte Teil der Isolate nach phylogenetischen Gesichtspunkten *E. hormaechei* mit seinen Subspezies ist. Die Typstamm *E. cloacae*, der Namensgeber des Komplexes, machte hingegen nur einen verschwindend geringen Anteil der klinischen Isolate aus.

Auch in der Studie von Grimont & Grimont ⁷¹ formierte sich das größte Cluster um den Typstamm *E. hormaechei*, bestehend aus sieben Biovaren, von denen nur einer (3a, ein Stamm) mit der Originalbeschreibung des Typstammes *E. hormaechei* übereinstimmte. Dieses Ergebnis stimmt mit der vorliegenden Studie überein, in der auch nur ein Isolat direkt mit dem Typstamm *E. hormaechei* (VII) zusammenfiel. Auch in der Studie von Hoffmann und Roggenkamp ⁸⁸ bildeten nur zwei Stämme eine kleine Gruppe zusammen mit diesem Typstamm. Die Cluster VI und VIII waren nahe mit Cluster VII verwandt. In weiteren DNA-DNA-Hybridisierungsversuchen konnten die drei Cluster als Subspezies *E. hormaechei* zugeordnet werden ⁹⁰. Die drei Cluster VI-VIII zusammen stellten in der vorliegenden Arbeit mit 40,8% die größte Gruppe dar. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit 40,9% bei Hoffmann und Roggenkamp ⁸⁸ und 31% bei Grimont ⁷¹. So scheint *E. hormaechei* die wichtigste Spezies des *E. cloacae* Komplexes zu sein. Auch in einer Ausbruchsuntersuchung aus Paris stellte sich der vermeintliche *E. cloacae* Ausbruchsstamm nach DNA-DNA-Hybridisierung als *E. hormaechei* heraus ³².

In der populationsgenetischen Studie von Hoffmann et al. ⁸⁸ machten die Isolate um die Typstämme *E. cloacae* und *E. dissolvens* nur 3,2% des Gesamtkollektivs aus. Auch in der vorliegenden Arbeit waren nur 3,1% der Isolate aus den genetischen Clustern um *E. cloacae* und *E. dissolvens*. Das stimmt auch mit den Arbeiten von Grimont & Grimont ⁷¹ und Lindt & Ursing ¹²³ überein, die schon Anfang der 90er Jahre herausfanden, dass sich nur 6% bzw. 2% der von ihnen untersuchten Isolate um die Typstämme *E. cloacae* und *E. dissolvens* gruppieren.

Der Namengeber des *E. cloacae* Komplexes, der aus mindestens 13 verschiedenen genetischen Clustern mit mittlerweile 9 anerkannten Spezies bzw. Subspezies besteht (*E. asburiae* (I), *E. cloacae* subsp. *cloacae* (XI), *E. cloacae* subsp. *dissolvens* (XII), *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* (VII), *E. hormaechei* subsp. *oharae* (VI), *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (VIII), *E. kobei* (II), *E. nimipressuralis* (X) und *E. ludwigii* (V)) repräsentiert somit nur einen sehr kleinen Teil des Komplexes im Krankenhaus.

Eine weitere große Gruppe der Isolate machte Cluster III aus. Das Cluster ist bislang keiner bekannten *Enterobacter* Spezies zuzuordnen. Die Prävalenz des Clusters von 25% in der vorliegenden Studie passte zu 26% für dieses Cluster wie bei Hoffmann und Roggenkamp beschrieben ⁸⁸.

Lindh und Ursing ¹²³ beschrieben, dass eine Genogruppe von 80% der untersuchten Isolate keinem Referenzstamm zuzuordnen war. Da die Autoren jedoch den Typstamm *E.*

hormaechei nicht in ihre Untersuchungen eingeschlossen hatten, ist anzunehmen, dass sich hinter dieser großen Gruppe unter anderem die Isolate um *E. hormaechei* oder das genetische Cluster III verbargen.

Die 4,6% der Isolate, die sich in der vorliegenden Arbeit um den Typstamm *E. asburiae* gruppierten, wurden in der Bootstrap-Analyse nur schwach unterstützt (60%). Dieses Ergebnis war hauptsächlich auf den Typstamm selbst zurückzuführen, der mit Isolat 235 etwas abseits des Clusters stand. Schon in früheren Studien repräsentierte der Typstamm von *E. asburiae* nur einen von mindestens drei verschiedenen Biovaren⁷¹. Auch in der Populationsgenetik⁸⁸ war das Cluster I heterogen und nur schwach von der Bootstrap-Analyse unterstützt (63%). Dies steht in Übereinstimmung mit den biochemischen Eigenschaften der Stämme. Während der Typstamm *E. asburiae* und der mit ihm etwas abseits des Clusters stehende Stamm 235 der ursprünglichen Beschreibung gemäß Voges-Proskauer und Melibiose negativ waren, waren alle anderen untersuchten Isolate in beiden Reaktionen positiv. Unter anderem basierend auf den genannten Daten wurde kürzlich die Speziesbeschreibung von *E. asburiae* erweitert⁸⁹.

Bei den fast 200 Isolaten aus dem Klinikum Großhadern zeigten sich dieselben Häufigkeiten der Genotypen wie bei 200 Isolaten aus allen Teilen Europas⁸⁸. Ebenso bestanden große Übereinstimmungen mit Studien von vor über 10 Jahren aus Kliniken in Paris und Kopenhagen^{71,123}. Daher ist anzunehmen, dass es sich nicht um eine zufällige Verteilung handelt, sondern einige der Genotypen, v.a. *E. hormaechei*, entweder pathogener sind als andere oder im Krankenhausmilieu besser überleben können.

Die Übereinstimmungen der Ergebnisse kamen zudem zustande, obwohl die angewandten Methoden differierten. Während frühere Studien^{71,123} die DNA-DNA-Hybridisierung als zugrunde liegende Methodik wählten, wurden bei Hoffmann und Roggenkamp⁸⁸ und in der vorliegenden Studie partielle Sequenzierungen von House-keeping Genen verwendet.

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden viele Labortechniken entwickelt um die Diversität innerhalb und zwischen Spezies zu untersuchen. Zu diesen Methoden gehören Serotypisierung, Protein-Elektrophorese, DNA-DNA-Hybridisierung, Restriktions-Fragment Längen Polymorphismus (RFLP) und Sequenzierung von DNA und Proteinen. Unter den genannten ist der direkte Vergleich von DNA Sequenzen die aussagekräftigste Methode¹¹⁸.

Es wurde das Gen des Hitze-Schock-Proteins Hsp60 gewählt, da es sich für die phylogenetische Einordnung bzw. Klassifizierung von vielen Bakterien als zuverlässig

erwiesen hatte^{66,129} und seine Anwendbarkeit auf den *E. cloacae* Komplex bereits gezeigt worden war⁸⁸. Der Versuch, den *Enterobacter cloacae* Komplex mittels Sequenzierung der ribosomalen 16S DNA zu charakterisieren, war nicht zufrieden stellend gewesen¹⁷⁷, weil die DNA-Sequenz zu konserviert war und die Verwandtschaft im Komplex keine eindeutige Differenzierung zulässt.

5.2 Assoziation der Genotypen mit bestimmten klinischen Materialien bzw. Erkrankungen

Bei der Verteilung der genetischen Cluster des *E. cloacae* Komplexes in der Klinik zeigte sich also ein starkes Ungleichgewicht zugunsten der Cluster III und der Spezies *E. hormaechei*. Das bedeutet auch, dass bei Weitem nicht alle Genotypen des *E. cloacae* Komplexes in gleicher Weise an nosokomialen Infektionen beteiligt sind. Dafür kann es verschiedene Ursachen geben. Bei der bekannten Heterogenität des Komplexes sowie der Vielfalt der von seinen Vertretern verursachten Infektionen^{2,52,128,159}, stellt sich die Frage, ob spezielle Assoziationen zwischen Genotypen und Infektionsherden bestehen und diese bislang nicht aufgefallen waren, weil alle Vertreter des *E. cloacae* Komplexes undifferenziert als „*Enterobacter cloacae*“ bezeichnet wurden. Diese Frage wurde bereits 2003 von Hoffmann und Roggenkamp⁸⁸ aufgeworfen. Als Teil der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine mögliche Assoziation der einzelnen Genotypen mit verschiedenen Infektionsherden analysiert. Hierfür wurden Isolate aus Blutkulturen, des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitaltraktes sowie abdominelle und Katheter-assoziierte Isolate und Wundisolate untersucht. Tatsächlich zeigte sich dabei, dass es signifikante Unterschiede in der Verteilung gab. Bei Wund- und Abstrichisolaten waren die Subspezies von *E. hormaechei* vorherrschend. Bei abdominellen Isolaten war Cluster IV überrepräsentiert. Bei gastrointestinalen Isolaten war hingegen die erst kürzlich beschriebene Spezies *E. ludwigii*⁹¹ signifikant überrepräsentiert, und bei Isolaten des Respirationstraktes Genotyp I um *E. asburiae*. Bei Blutkulturisolaten zeigte sich kein Genotyp signifikant häufiger als in der Gesamtverteilung, die größten Gruppen waren Cluster III und VIII mit 30% bzw. 24%. Genotyp I war signifikant unterrepräsentiert.

Interessant an dieser Verteilung ist unter anderem die Überrepräsentation der Subspezies um *E. hormaechei* bei Wundisolaten. Wie bei der Prävalenzverteilung gezeigt, sind diese Unterarten die am häufigsten in der Klinik vorkommenden Vertreter des *E. cloacae*

Komplexes. Gleichzeitig sind Berichte von Wundinfektion, insbesondere von Verbrennungswunden, mit die häufigsten Infektionen durch Vertreter des *E. cloacae* Komplexes überhaupt ^{62,103,128,130,131}. Das lässt vermuten, dass eventuell der wirkliche Wundinfektionserreger *E. hormaechei* ist. Die Verteilung der abdominellen Isolate steht im Gegensatz zur Studie von Hoffmann und Roggenkamp ⁸⁸, in der Cluster III überhaupt nicht bei abdominellen Isolaten vorkam und Cluster II fast die Hälfte der Isolate ausmachte. Hier ist allerdings auf die niedrige Fallzahl abdomineller Isolate in beiden Studien zu verweisen.

All diese Daten führten zu der Annahme, dass es durchaus wichtige Unterschiede in der Virulenz der verschiedenen Spezies des *E. cloacae* Komplexes geben könnte. So könnte z.B. *E. ludwigii* ein relativ harmloser Keim der gastrointestinalen Normalflora sein und *E. asburiae*, der signifikant häufiger im Respirationstrakt vorkam, ein potenter Pneumonieerreger mit hoher Letalität ^{28,107,121,126,159}. Sollten sich diese Annahmen in weiteren Studien bestätigen, würde das die klinische Relevanz einer Unterscheidung der Spezies in der Routinediagnostik eines Krankenhauslabors unterstreichen und die biochemischen Testsysteme zur Differenzierung müssten um die entsprechend notwendigen Reaktionen erweitert werden.

5.3 Anwendbarkeit hygienischer Testmethoden beim *E. cloacae* Komplex

Bei Ausbrüchen nosokomialer Infektionen muss es das primäre Ziel von Mikrobiologen und Hygienikern sein, den Ausbruchsstamm so schnell wie möglich zu identifizieren, zu isolieren und zu eliminieren. Zuverlässige und schnelle Algorithmen sind nötig, um Ausbruchsstämme so früh wie möglich zu erkennen und einen „echten“ klonalen Ausbruch von einer zufälligen Häufung von Infektionen mit derselben Spezies zu unterscheiden. Neben dem Goldstandard zur klonalen Differenzierung, der PFGE, stehen die schnelleren und preiswerteren Methoden der PCR-basierten Differenzierung, z.B. ERIC- und REP-PCR, zur Verfügung.

Bislang gab es widersprüchliche Daten darüber wie gut bakterielle Isolate mittels ERIC- und REP-PCR voneinander abgegrenzt werden können. Zur Anwendbarkeit beim *E. cloacae* Komplex gab es nur einzelne Studien ^{52,64,105}. Als diese durchgeführt wurden, war die Heterogenität des Komplexes noch nicht hinreichend untersucht.

Um Aufschluss über die Anwendbarkeit der PCR-basierten Methoden innerhalb des *E. cloacae* Komplexes zu bekommen, wurde die Validität von ERIC- und REP-PCR anhand zweier repräsentativer Cluster überprüft ¹⁷⁵. Als Kontrolle wurden zwei PFGE durchgeführt.

Die beiden untersuchten Genotypen gehörten zu den prominentesten Gruppen des Komplexes (III und VI).

5.3.1 Differenzierung mittels ERIC-PCR auf Genotypenebene

Es zeigte sich dabei, dass die ERIC-PCR im *E. cloacae* Komplex eher auf Genotypenebene als auf klonaler Ebene unterscheidet¹⁷⁵.

Einige Autoren beschrieben für die ERIC-PCR eine hohe Differenzierungsfähigkeit bei gram-negativen Bakterien im Allgemeinen^{14,26,176} und für *Enterobacter* Spezies im Besonderen⁵².

Dies konnte jedoch bei einer Anzahl von anderen Studien nicht bestätigt werden^{105,109,151,186}. In Übereinstimmung mit den zuletzt genannten, ergaben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einige Gruppen von Isolaten mit identischen ERIC Bandenmustern, von denen Klonalität nur für 3 Paare mittels PFGE bestätigt werden konnte. Damit konnte im Hinblick auf die Fähigkeit, Ausbruchsstämme aus dem *E. cloacae* Komplex zu identifizieren, für die ERIC-PCR eine Spezifität von gerade mal 14% errechnet werden. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnte die ERIC-PCR jedoch zuverlässig zwischen den analysierten Clustern unterscheiden. Bei der Analyse einer Auswahl von Isolaten aus anderen Clustern bestätigte sich der Befund. Das Ergebnis liefert auch eine vermutliche Erklärung für die differierenden Resultate der zuvor genannten Studien. So könnte es gut sein, dass einige Autoren in Vernachlässigung der Heterogenität des *E. cloacae* Komplexes Isolate verschiedener Genotypen untersucht hatten. Somit erlangten sie eine gute Differenzierbarkeit mittels ERIC-PCR und zogen die vermeintliche Schlussfolgerung, die ERIC-PCR würde beim *E. cloacae* Komplex suffizient auf Stammebene differenzieren. Peters et al.¹⁴⁷ untersuchten z.B. 111 Isolate von 17 Patienten einer Neugeborenenintensivstation mittels ERIC-PCR auf Klonalität. Dabei fanden die Autoren 3 Gruppen von unterschiedlichen Bandenmustern. Die eingeschränkte Anwendbarkeit der ERIC-PCR auf den *E. cloacae* Komplex war damals noch nicht bekannt¹⁷⁵. Dementsprechend kann zwar davon ausgegangen werden, dass die Isolate mit gleichen Mustern demselben Genotyp angehören, ihre Klonalität ist hingegen nicht bewiesen.

Die Gegenüberstellung der über 160 ERIC-PCR Bandenmuster mit den Sequenzclustern aus der *hsp60* Sequenzierung zeigte eine 94%ige Korrelation. Die Cluster II, III, IV und V, die auch in der *hsp60* Sequenzanalyse homogen waren, bildeten stabile Gruppen. Das Cluster I um *E. asburiae* spaltete sich in 3 Subgruppen auf. Betrachtet man jedoch die einzelnen

Subgruppen, so entsprachen sie den Subgruppen des heterogenen Sequenzclusters I. Auch hier standen somit die Ergebnisse der ERIC-PCR in Übereinstimmung mit der beschriebenen genetischen und phänotypischen Heterogenität der Spezies *E. asburiae*^{21,71,88,89}. Die Cluster um *E. cloacae* und *E. dissolvens* trennten sich zwar klar vom Rest des Komplexes ab, vermischten sich aber untereinander. Das passte zu den Daten von Grimont & Grimont⁷¹ und Lindh & Ursing¹²³, die jeweils Cluster beschrieben, die beide Typstämme enthielten. Ebenso bildeten in der Studie von Hoffmann & Roggenkamp⁸⁸ *E. cloacae* und *E. dissolvens* in der *hemB* Analyse ein gemeinsames Cluster. Nach weiteren DNA-DNA-Hybridisierungsversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde *E. dissolvens* schließlich als Subspezies *E. cloacae* zugeordnet⁸⁹. Es ergaben sich die zwei neuen Kombinationen *E. cloacae* subsp. *cloacae* und *E. cloacae* subsp. *dissolvens*.

Der Genotyp VIII, der die Subspezies *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* darstellt⁹⁰, bildete in der *hsp60*-Sequenzanalyse zwei Untergruppen. Exakt diese beiden Untergruppen fanden sich in der Analyse der ERIC-Bandenmuster wieder. Während die Subgruppe VIIIa alleine stand, vermischte sich die Subgruppe VIIIb mit den Isolaten der Subspezies *E. hormaechei* subsp. *oharae* (VI) zu einem Cluster. Hier zeigte sich, dass die ERIC-PCR im *E. cloacae* Komplex zum Teil auf Speziesebene, teils auf Subspeziesebene und teils sogar auf Ebene von Untergruppen der Subspezies differenziert. Diese Variationen könnten eine weitere Erklärung für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Differenzierungsebene mittels ERIC-PCR in anderen Studien sein^{14,26,52,105,109,151,176,186}.

In Anbetracht der Daten gewinnt die ERIC-PCR eine neue Bedeutung, da sie eine rasche Klassifikation der Isolate zu den entsprechenden Genotypen ermöglicht. Zur Identifikation von Ausbruchstämmen kann sie aber wenig beitragen. Zur Untersuchung in einer vermeintlichen Ausbruchssituation mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes bietet sich somit die REP-PCR als schnellere und präzisere Methode an.

5.3.2 Differenzierung mittels REP-PCR auf Stammebene

Im Gegensatz zu ERIC-PCR eignete sich die REP-PCR sehr gut zur Differenzierung auf Stammebene. In Kombination mit einer PFGE war sie genauso zuverlässig wie zwei PFGE¹⁷⁵. Darüberhinaus zeigte sich, dass Bandenübereinstimmung in einer PFGE zwar sehr suggestiv, aber noch nicht beweisend für Klonalität war. So waren die Isolate 116 und 607 zwar in der ersten PFGE identisch, wiesen aber sowohl in der REP-PCR als auch in der zweiten PFGE unterschiedliche Bandenmuster auf. 1995 schrieben Tenover et al.¹⁷⁸, dass für

Isolate mit nicht-unterscheidbaren Bandenmustern in der PFGE Klonalität angenommen werden könne. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen das zum Großteil. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die PFGE keine 100%ige Gültigkeit hat. Dasselbe war auch schon 2003 für *E. coli* gezeigt worden¹⁰⁵. Die REP-PCR wurde bei den Genera *Lactobacillus*, *Aeromonas* und *Salmonella* angewandt^{26,176,186} und zeigte wenig komplexe Bandenmuster, die eine Differenzierung auf Stammebene nicht zuließen. Bei den Spezies *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* oder *Bartonella* species waren die REP-PCR Bandenmuster wesentlich komplexer und erlaubten eine weit bessere Differenzierung^{64,102,151,164}. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der 90% der untersuchten Isolate allein mit der REP-PCR richtig differenziert werden konnten.

5.3.3 Empfohlener Algorithmus in einer vermeintlichen Ausbruchssituation

In einer Situation, in der vermeintlich ein Stamm mehrere Patienten infiziert hat, muss ein sofortiges adäquates Management des Ausbruchs eingeleitet werden. Bereits parallel dazu sollten die folgenden diagnostischen Schritte angestrebt werden: zunächst sollte eine REP-PCR aller vermeintlichen Ausbruchs isolate durchgeführt werden. Dies erlaubt eine gute genetische Differenzierung. Unsere Ergebnisse zeigten, dass sehr wahrscheinlich Klonalität vorliegt, falls die REP-PCR Bandenmuster der verschiedenen Isolate identisch sind. Diese sollte durch eine PFGE mit *XbaI* überprüft werden. Eine bestätigende zweite PFGE ist nicht nötig, wenn REP und PFGE Bandenmuster der Isolate identisch sind¹⁷⁵. ERIC-PCR Analysen können durchgeführt werden, wenn eine Identifikation der Isolate auf Genotypen-Ebene gefordert ist, z.B. zu Forschungszwecken.

5.4 Prävalenz klonaler Ausbrüchen mit dem *E. cloacae* Komplex

Die Häufigkeit von nosokomialen Infektionen mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes ist über die letzten Jahre deutlich angestiegen¹⁵⁹, vor allem auf Neugeborenen-Intensivstationen^{37,52,147,182,183} wird häufig davon berichtet. Bei einer solchen Zunahme der Infektionsrate mit einem Erreger muss differenziert werden zwischen klonalen Ausbrüchen und vermehrten endogenen Infektionen. Von klonalen Ausbrüchen spricht man, wenn Infektionen durch Übertragung der Erreger von Mensch zu Mensch oder durch eine gemeinsame Infektionsquelle zustande kommen. Die Krankheitserreger sind also genetisch einem Klon zuzuordnen. Zu vermehrten endogenen Infektionen kommt es durch zunehmenden

Selektionsdruck, wie er z.B. durch zunehmende antibiotische Therapien aufgebaut wird. Dabei werden besonders überlebensfähige Bakterien selektioniert. Diese führen dann im Verlauf zu einer Zunahme der Infektionen. Da solche Infektionen teils hohe Sterblichkeit aufweisen^{117,183}, ist es hilfreich zu wissen, wie oft klonale Ausbrüche mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes im Krankenhaus vorkommen. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals für den *E. cloacae* Komplex systematisch angegangen. Es wurden alle im Klinikum Großhadern über einen Zeitraum von fünf Jahren aus Blutkulturen isolierten *Enterobacter* species sowie eine repräsentative Stichprobe von 55% aller Isolate aus einem Zeitraum von drei Monaten mittels REP-PCR und PFGE auf Klonalität untersucht.

Dabei fand sich bei den Varia-Isolaten verschiedener Patienten keinerlei Klonalität. Bei den Blutkulturen wurden drei Paare von jeweils zwei klonalen Stämmen identifiziert. Zweimal waren Vertreter des Clusters III beteiligt und einmal ein Stamm des Clusters VI. Bei zwei der „Ausbrüche“ handelte es sich um jeweils zwei Patienten, die zur gleichen Zeit auf der chirurgischen Intensivstation gelegen hatten. Die Infektionen beider Patienten fanden innerhalb derselben Woche statt. Hier ist davon auszugehen, dass es am ehesten durch das Personal zu einer Verschleppung der Bakterien von einem Patienten auf den anderen kam. Bei dem dritten Ausbruch war ein Patient der internistischen Intensivstation und einer der kardiologischen Normalstation betroffen. Die beiden Patienten hatten zu keinem Zeitpunkt auf derselben Station gelegen. Zudem lagen fast zwei Jahre zwischen den Infektionen. Ein Hinweis auf eine gemeinsame Infektionsquelle oder eine Übertragung ist aus den Krankenakten nicht mehr zu entnehmen. Man könnte jedoch spekulieren, dass ein Angestellter mit diesem Erreger kolonisiert war und ihn auf beide Patienten übertragen hat.

Insgesamt sind Ausbrüche mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum Großhadern wesentlich seltener als die zahlreichen Berichte vermuten lassen. Was sind die möglichen Erklärungen für die Diskrepanz zwischen der Vielzahl an Ausbruchsberichten in der Literatur und der sehr geringen Zahl in dieser systematischen Untersuchung?

Einige Autoren^{147,182} verwendeten ausschließlich die ERIC-PCR zum Nachweis klonaler Stämme. Wie bereits oben gezeigt wurde, ist diese Methode in Anbetracht der Heterogenität des *E. cloacae* Komplexes jedoch nicht ausreichend¹⁷⁵. So gibt es einige Ausbruchsberichte, bei denen nicht sicher ist, ob es sich tatsächlich um einen klonalen Ausbruch handelte oder schlicht die Nachweismethode insuffizient war^{147,182}.

Eine weitere Erklärung ist, dass einige der Ausbruchsberichte auf mangelnden hygienischen Verhältnissen basierten^{37,52,147,182,183}. So fielen in einem Krankenhaus in der Provinz Gauteng

in Südafrika¹⁸³ neun Frühgeborene einem Ausbruch zum Opfer, der durch eine kontaminierte Infusionslösung verursacht wurde, die alle betroffenen Patienten intravenös erhalten hatten. Misst man den Hygienestandard an der MRSA-Frequenz, so liegt das Klinikum Großhadern mit 12,2% im Jahr 2005 deutlich unter dem deutschen Mittel von 22,4% (2004) (Frau Dr. B. Grabein, persönliche Mitteilung). So könnte auch dies ein Erklärungsansatz für die niedrige Ausbruchsrates im Klinikum Großhadern sein.

Festzuhalten ist, dass in dieser ersten systematischen Untersuchung der Ausbruchshäufigkeit mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes an einem großen deutschen Universitätsklinikum trotz eines langen Beobachtungszeitraums von fünf Jahren kaum Ausbrüche gefunden wurden. Trotzdem kam es auch im Klinikum Großhadern zu einem Anstieg der Infektionen mit Bakterien des *E. cloacae* Komplexes. Für die Zunahme ist wohl am ehesten ein steigender Selektionsdruck insbesondere durch Verwendung von Antibiotika verantwortlich. Gerade auf den Stationen, auf denen Infektionen mit *Enterobacter* species besonders häufig vorkommen, wie Neugeborenen-Intensivstationen werden Cephalosporine der Gruppe 3 oft verwendet. Bei der Verwendung von Gruppe 3 Cephalosporinen handelt es sich dabei um einen der Hauptrisikofaktoren für eine Infektion mit *E. cloacae*^{54,103,132,135}. Ein weiterer wichtiger Selektionsvorteil ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Silberresistenz. Gerade auf Verbrennungseinheiten, eines der am meisten von *Enterobacter* Infektionen betroffenen Gebiete der Medizin, ist der Einsatz von Silber als Desinfektionsmittel und Antiseptikum an der Tagesordnung. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass ein erhöhter Selektionsdruck für die steigende Prävalenz des *E. cloacae* Komplexes im Krankenhaus stärker verantwortlich ist als klonale Ausbrüche.

5.5 Subtraktive Hybridisierung zur Identifizierung von Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren

Trotz der steigenden Prävalenz als nosokomialer Erreger¹⁵⁹ und der immer wieder gestellten Frage nach ursächlichen Faktoren, ist das Wissen über mögliche Pathogenitäts- oder Fitnessfaktoren des *E. cloacae* Komplexes gering. Die wenigen Studien, die es gibt, suchten nach bekannten weit verbreiteten Faktoren wie z.B. Enterotoxinen^{112,113} oder Hämolyisin¹⁶⁷. Die Virulenzfaktoren wurden teilweise bei *Enterobacter* species wieder gefunden. Keller et al.¹⁰⁸ untersuchten eine Reihe von Isolaten des *E. cloacae* Komplexes und fanden dabei als wichtigste Faktoren die Fähigkeit zur Serumresistenz, zur Aerobactin Produktion und zur

Adhärenz an und Penetration in eukaryotische Zellen. Es wurde wiederholt gezeigt, dass die verschiedenen Genotypen des *E. cloacae* Komplexes nicht gleichermaßen als nosokomiale Erreger Bedeutung haben^{71,88,123}. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es gruppenspezifische Faktoren geben könnte, die ihren Trägern das Überleben in der Klinik erleichtern und die Möglichkeit zur Wirtsinfektion geben. Bislang gab es noch keine Studie, die gezielt nach Unterschieden zwischen pathogenen und apathogenen Vertretern des Komplexes suchte. Für solche Genomvergleiche können bei komplett sequenzierten Chromosomen diese direkt verglichen werden, wie es bei *E. coli* K-12 und O157:H7 gemacht wurde⁸³. Wenn die Genomsequenz wie beim *E. cloacae* Komplex nicht vorliegt, bietet sich als Methode die subtraktive Hybridisierung an. Die dabei verwendeten Stämme sollten möglichst nahe verwandt sein, da sonst zu große Variationen derselben Gene unspezifische Ergebnisse verursachen. Trotzdem sollten die beiden untersuchten Stämme eine möglichst unterschiedliche Virulenz aufweisen. Beispiele über das Einsatzgebiet der subtraktiven Hybridisierung gibt es viele. So haben 2002 Iwobi et al.⁹⁸ die subtraktive Hybridisierung angewandt, um genomische Unterschiede zwischen einem hoch-pathogenen *Yersinia enterocolitica* Stamm und einem nah verwandten apathogenen Vertreter zu identifizieren. Dabei fanden sie ein IS10-like Element, das bei hoch-pathogenen Stämmen in multiplen Kopien vorlag, in niedrig-pathogenen hingegen nur in einer einzigen Kopie. Mindestens eine dieser Kopien grenzt an den chromosomalen Typ III-Sekretionsapparat. 2006 untersuchten Oleastro et al.¹⁴² warum manche *Helicobacter pylori* Infektionen bereits früh zu peptischen Ulcera führen und andere erst nach jahrlanger Infektion. Sie verglichen die Genome eines *H. pylori* von einem Kind mit peptischem Ulcus und einen, der nur eine Gastritis verursacht hatte. Sie fanden zwei Sequenzen, die signifikant mit der Entwicklung eines peptischen Ulcus bei Kindern assoziiert waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Stämme der Spezies *E. asburiae* zum Vergleich herangezogen, zum einen ein Sepsiserreger, der drei Neugeborene infiziert hatte⁵², und zum anderen zwei von Pflanzen isolierte Stämme¹⁵⁰. Die beiden Pflanzenisolate dienen speziell der Aussaat auf Lebensmitteln wie Gurken und Salaten, um diese vor Wasserschimmelarten zu schützen und gelten als avirulent für dem Menschen.

Als größte Unterschiede fanden sich zwischen den getesteten Stämmen Homologien zu Regulatorregionen von IncHI-Plasmiden, zur Silberresistenz-Determinante *sil* und zu verschiedenen Nickelresistenz-Determinanten.

IncH Plasmide sind große Plasmide von über 180.000 bp, die zahlreiche Antibiotika und Schwermetallresistenzen tragen, unter Enterobakterien weit verbreitet sind und typischerweise nur bei niedrigen Temperaturen (30°C) übertragen werden. Die Inkompatibilitätsgruppe H besteht aus zwei kompatiblen Untergruppen, IncHI und IncHII. Die IncHI Gruppe enthält die drei untereinander nicht-kompatiblen Untergruppen, IncHI-1, IncHI-2 und IncHI-3. Neben multiplen Resistenzen tragen die Plasmide auch einige House-keeping Gene. Mittels Amplifikation einer der Replikationsregionen RepHIA konnte gezeigt werden, dass der Teststamm tatsächlich ein IncHI Plasmid trägt und der Referenzstamm nicht. Dieses Ergebnis unterstützte auch die Spezifität der subtraktiven Hybridisierung, die bei Klon E-022 99% Ähnlichkeit zu den intergenetischen Regionen RepHIA und *tra2* von Plasmid pR478 zeigte. *Tra2* ist eins von zwei Clustern mit Transfergenen bei IncHI Plasmiden. Da sich diese Transferregionen zwischen den Subgruppen IncHI-1 und IncHI-2 deutlich unterscheiden und Klon E-022 ausschließlich Homologie zu *tra2* vom IncHI-2 Plasmid pR478 aufwies, lag die Vermutung nahe, dass das Plasmid des Teststammes EN-373 zur Untergruppe IncHI-2 gehört^{8,65,120,144,163}.

Neben Ähnlichkeiten zu diesen Regulatorproteinen wies ein Klon Homologie zu einer Schwermetallresistenz-Determinante auf. Klon A-104 zeigte Ähnlichkeit zu einem Teil der Silberresistenz-Determinante *sil*, die vor kurzem auf IncH Plasmiden beschrieben wurde⁷⁵. Sie vermittelt Resistenz gegen Silberionen, die als hygienischer Fitnessfaktor dient und Bakterien unter anderem das Überleben im Krankenhaus erleichtert.

Eine weitere Homologie zu einem Metallresistenzmechanismus wurde gefunden. Zwei Klone zeigten Ähnlichkeit zu verschiedenen Nickelresistenz-Determinanten. Die längere der beiden Sequenzen (Klon B-007) wies 92% Identität zu den Genen *nirA* und *nirB* der chromosomalen Nickelresistenz-Determinante von *Klebsiella oxytoca* und den Genen *nreB*-like und *nreA*-like von *Legionella pneumophila* auf. 93% Identität, jedoch über einen kürzeren Abschnitt zeigte sich zu den Genen *ncrA* und *ncrB* der Nickelresistenz-Determinante von *Hafnia alvei*. Bei Nickel handelt es sich anders als bei Silber um ein essentielles Spurenelement für lebende Zellen, das von Enzymen wie Urease und CO-Dehydrogenase benötigt wird. Zuviel Nickel wirkt jedoch toxisch⁶⁷. Darum haben einige Bakterien Effluxsysteme, die bei zuviel Nickel das Metall aus der Zelle heraus pumpen und so auch bei höheren Konzentrationen in der Umgebung überleben können.

Durch Mitpräparation der Plasmide des *Tester*-Stamms wurde der Versuch unternommen vor allem chromosomale Unterschiede der untersuchten Isolate zu eruieren. Trotzdem bestanden

bei den Klonsequenzen der subtraktiven Hybridisierung überwiegend Ähnlichkeiten zu Genen extra-chromosomaler Herkunft. Das liegt vor allem an der Größe der Plasmide, die sich bei der Präparation wie chromosomale DNA verhalten und nicht in einer herkömmlichen Plasmid-Präparation isoliert werden. Ob nun tatsächlich der größte Unterschied der Teststämme im Vorhandensein bzw. Fehlen eines IncHI-Plasmids lag oder ob chromosomale Unterschiede nur durch das Plasmid camufliert wurden, ist unklar. Offen bleibt ebenfalls die Frage, ob die von Pflanzen isolierten Teststämme tatsächlich avirulent sind. Pflanzenpathogene Bakterien tragen häufig ähnliche Pathogenitätsfaktoren wie humanpathogene Bakterien, so dass bei den hier verwendeten Teststämmen eventuell Pathogenitätsfaktoren übersehen wurden. Jedoch handelt es sich bei unseren Teststämmen nicht um primär pflanzenpathogene Erreger, sondern um Bakterien, die explizit auf Lebensmittel ausgebracht werden, um diese vor Wasserschimmelarten zu schützen. Nach persönlicher Auskunft von D.P. Roberts gibt es keinerlei Hinweise darauf, dass die in unserer Studie verwendeten Stämme humanpathogen sind. Entscheidend ist, dass der hervorstechende Unterschied der untersuchten Pflanzenisolate zu den humanpathogenen Stämmen ein IncHI-Plasmid ist, das mit seinen zahlreichen Resistenzmechanismen sicherlich als starker Fitnessfaktor anzusehen ist.

5.6 Silberresistenz als hygienischer Fitnessfaktor

Um sich als wichtiger nosokomialer Erreger durchzusetzen, muss eine besondere Überlebensfähigkeit im Klinikmilieu vorhanden sein. Diese wird unter anderem durch Resistenz gegenüber üblichen Antibiotika und Desinfektionsmitteln erlangt.

Eine Resistenz gegenüber Silberionen würde einen solchen Selektionsvorteil darstellen. Silberionen werden in der Medizin als Antiseptikum verwendet¹⁶⁶, und Verbindungen aus Silber werden v.a. zur Infektionsprophylaxe bei Verbrennungswunden benutzt. Der Gebrauch von Silber als Antiseptikum ist jedoch noch um Einiges vielseitiger⁷⁶. Silber- und Kupferbasierte Mittel werden in Wasserversorgungsanlagen von Hotels und Krankenhäusern verwendet, um Infektionserreger, z.B. Legionellen zu kontrollieren⁹⁶. Selbst in den Spaceshuttles der NASA wird Silber verwendet um recyceltes Wasser zu desinfizieren⁷⁶. Der medizinische Gebrauch von Silber ist bis ins Jahr 1000 v. Chr. zurück dokumentiert^{76,96}. Es ist ein traditioneller Bestandteil chinesischer und indischer Medizin. Ebenso lang ist bekannt, dass Wasser trinkbar gehalten werden kann, indem es in Silber- oder Kupfergefäßen

aufbewahrt wird^{96,157}. Früher wurden Silbersalze in die Augen Neugeborener appliziert, um Infektionen mit Gonokokken zu verhindern (Credé Prophylaxe). Nach der Einführung dieser Therapie 1880 fiel die Anzahl der Infektionen von 13.6 auf 0.5% aller Neugeborenen¹¹¹. Schon im 18. und 19. Jahrhundert wurde Silber in den verschiedensten Formen, z.B. in Festform oder als Lösungen in Konzentrationen von 0.2 - 2%, zur Behandlung von Ulzera, Wunden und Verbrennungen verwendet. Während des zweiten Weltkrieges verschwand das Interesse an Silbersalzen in der Behandlung von Verbrennungswunden. Erst 1965 wurde durch eine Studie von Moyer¹³⁶ das Interesse wieder geweckt. Der Beginn des routinemäßigen Einsatzes von Silberverbindungen als Therapeutikum von Verbrennungswunden revolutionierte in den 60er Jahren deren Behandlung. Vor dem Einsatz von Silbernitrat waren Wundseptitiden für zwei Drittel der Sterblichkeit von Verbrennungsoffern verantwortlich. Seit in den späten 60er Jahren Silberverbindungen regelmäßig bei Verbrennungen appliziert wurden (z.B. Silbersulfadiazin in FlammazineTM), verringerte sich die Rate rasch auf ein Viertel^{136,148}. Bis heute wurden viele Versuche gestartet ein besseres topisches Heilmittel für Verbrennungen zu finden - ohne Erfolg¹¹⁰. Eine Mitte der Neunziger Jahre veröffentlichte Studie über die Applikation topischer Mittel in amerikanischen Verbrennungszentren zeigte, dass Silbersulfadiazin noch immer das am weitesten verbreitete Mittel ist⁴⁷. Die Empfindlichkeit von Verbrennungswunden gegenüber Infektionen resultiert aus der Kombination von koagulierten Proteinen und anderen mikrobiellen Nährstoffen in der Wunde und der Avaskularität des Eschars, die den Transport von immunologisch aktiven Zellen, humoralen Faktoren und systemischen Antibiotika verhindert. Auch dies veranschaulicht die Wichtigkeit einer wirksamen topischen Substanz.

Während anfangs die Bedeutung von bakteriellen Silberresistenzen noch für vernachlässigbar gehalten wurde²⁴, häuften sich schon bald Studien über Resistenzen bei Enterobakterien und Nonfermentern^{10,22,85,133}. Hier hat der *E. cloacae* Komplex eine besondere Bedeutung. Als häufiger Infektionserreger bei Verbrennungswunden gab es immer wieder Berichte von phänotypischer Silberresistenz beim *E. cloacae* Komplex^{10,24,57,62,85,128,130,156}. Die genetische Grundlage ebenso wie die Prävalenz und Verteilung einer solchen Resistenz war bislang nicht bekannt.

5.6.1 Die *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex

Ungeachtet der zunehmenden medizinischen Bedeutung von Silberresistenz bei Bakterien wurde die molekulare Grundlage dieser Resistenz erst vor einigen Jahren entdeckt⁷³. Die

Autoren beschrieben eine Silberresistenz-Determinante bestehend aus neun *open reading frames* (ORFs), von denen sieben eine bekannte Funktion haben. Der Reihe nach: *silP*, ORF105, *silAB*, ORF96, *silC*, *silSR*, *silE* (Abbildung 29). Ursprünglich wurde die Determinante bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium beschrieben⁷³. Der Stamm hatte 1975 drei Todesfälle auf einer Verbrennungsstation verursacht und führte zur vorübergehenden Schließung der Station¹³³. Die Silberresistenz-Determinante war auf Plasmid pMG101 kodiert. Dieses Plasmid gehört zur Inkompatibilitätsgruppe H und trägt Resistenzen gegenüber Silber, Quecksilber, Tellur, Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamiden.

Die meisten bakteriellen Schwermetallresistenzmechanismen funktionieren durch aktiven Transport der Metallionen aus der Zelle. Andere seltener beschriebene Mechanismen beinhalten die enzymatische Biotransformation der Metallionen vor dem Export aus der Zelle, z.B. Reduktion von Hg^{2+} zu Hg^0 , oder die Bindung an spezielle Proteine. Die Besonderheit der *sil* Silberresistenz-Determinante ist, dass sie aus drei verschiedenen Resistenzmechanismen besteht: zwei parallelen Membranpumpen - einer P-Typ ATPase (kodiert von *silP*) und einem drei Komponenten Kationen-/Protonen-Antiporter (kodiert von *silABC*) -, sowie einem periplasmatischen Metall-bindenden Protein (kodiert von *silE*). Alle drei Komponenten sind zusammen mit zwei Regulationsproteinen (*silRS*) in einem gemeinsamen Gencluster kodiert (siehe Abbildung 29A). So werden zum einen Silberionen direkt aus dem Inneren der Zelle über die Effluxpumpe *silCBA*, die die innere und äußere Membranen überspannt, hinausgepumpt. Zum anderen pumpt *silP* ATP-abhängig Silberionen aus dem Inneren der Zelle in den periplasmatischen Spalt. Dort werden die Ionen an *silE* gebunden. Ob die gebundenen Silberionen über einen eigenen Kanal direkt aus dem periplasmatischen Spalt über die äußere Membran entfernt werden oder es noch einen Weg über *silB* in das Effluxsystem *silCBA* gibt, ist bislang nicht geklärt (siehe Abbildung 29B).



Abbildung 29 (A): Die genetische Organisation der *sil*-Determinante

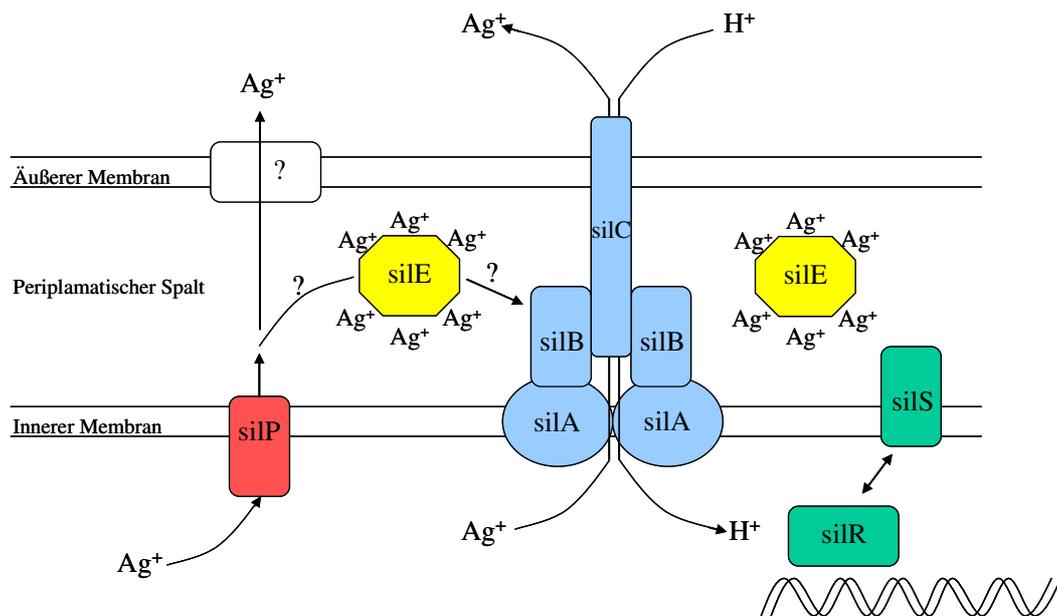


Abbildung 29 (B): Silberresistenz Protein Produkte. Die angenommene Funktion der einzelnen Genprodukte der *sil*-Determinante. Abgeleitet von Homologien zu bekannten Proteinen (nach Silver et al., 2003¹⁶⁶)

Um sicher zu gehen, dass auch bei Vertretern des *E. cloacae* Komplexes die gesamte Resistenz-Determinante vorhanden ist, wurden sowohl der Aufbau der Determinante als auch partiell die Nukleinsäuresequenzen der einzelnen Gene untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Abschnitte der untersuchten Gene sehr hohe Ähnlichkeiten zu den Nukleotidsequenzen der *sil*-Determinante auf pMG101 hatten. Die abgeleiteten Proteinsequenzen waren über 90% identisch mit denen von pMG101. Übergreifende PCRs von allen bekannten Genen zeigten denselben Aufbau der Determinante wie ursprünglich bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium pMG101 beschrieben⁷³.

Gupta et al.⁷⁵ suchten nach *sil*-Genen auf weiteren Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe H, dabei waren zwei IncHI-3 und drei IncHI-2 Plasmide positiv. Diese zeigten in den Nukleotidsequenzen von *silE*, *silP* und *silS* Identitäten mit pMG101 von über 95%. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterschieden sich zu weniger als 8%⁷⁵. Im selben Bereich bewegten sich die Ähnlichkeiten der in den vorliegenden Analysen gefundenen Sequenzen. Neben den plasmidal-kodierten Genen wurden auch chromosomale Gene mit Ähnlichkeit zur *sil*-Determinante beschrieben. Auf den Chromosomen von *E. coli* K-12 und O157:H7 gibt es homologe Bereiche zu *silABC*, ORF96 und *silRS*. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten Identitäten von 45% (ORF96) bis 87% (*silA*). Im Genom von *Klebsiella pneumoniae* wurden Homologien zu allen 7 Genen gefunden, deren abgeleitete

Aminosäuresequenzen über 90%ige Identitäten aufwiesen. Auch im Chromosom von *Salmonella enterica* Serotyp Paratyphi und *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium wurden *sil*-ähnliche Gene nachgewiesen. Die abgeleiteten Proteinsequenzen hatten aber nur 30-40% Identität mit denen von pMG101⁷⁵.

5.6.2 Plasmidale versus chromosomale Herkunft der *sil*-Determinante beim *E. cloacae* Komplex

Allein die hohe Identität mit den Plasmid-kodierten *sil*-Determinanten lässt vermuten, dass diese Resistenz-Determinante auch beim *E. cloacae* Komplex auf einem Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe H kodiert ist. Da jedoch auch chromosomal-kodierte Gene mit hoher Ähnlichkeit bekannt sind⁷⁵, stellte sich die Frage, ob die *sil*-Determinante beim *E. cloacae* Komplex chromosomal oder plasmidal kodiert ist.

Ein deutlicher Hinweis für eine plasmidale Herkunft konnte mittels PCR über die Regulatorgene der IncH Plasmide erbracht werden, die zeigte, dass der *Tester*-Stamm im Gegensatz zum *Driver*-Stamm tatsächlich ein IncH Plasmid trug. Gemäß der Homologie von Klon E-022 zur Transferregion *tra2* müsste es sich dabei um ein Plasmid der Untergruppe IncHI-2 handeln. Die Mehrzahl der bereits bekannten *sil*-Determinanten sind auf Plasmiden der IncHI-2 Subgruppe beschrieben⁷⁵.

1983 berichteten Markowitz et al.¹²⁸ eine enge Korrelation zwischen Silberresistenz und einem typischen Plasmidmuster bei *E. cloacae* Stämmen, die Infektionen bei Patienten auf Verbrennungseinheiten verursacht hatten. Allen silberresistenten Stämmen war ein 55 MDa Plasmid gemeinsam. Dieses Plasmid wurde nicht in Silbersulfadiazin empfindlichen Stämmen gefunden. 55MDa entspricht einer Größe von ca. 83 kbp und liegt damit deutlich unterhalb der Größe von pMG101 (180 kbp).

In einigen Studien, in denen silberresistente Stämme des *E. cloacae* Komplexes beschrieben wurden, konnte die Silberresistenz nicht mittels Konjugation auf andere Stämme übertragen werden^{10,70,130,133}. Mayer et al.¹³⁰ beschrieben bei einigen Isolaten einen Verlust der Transferregion. Die Tendenz von Plasmiden ihre Transferierbarkeit zu verlieren war zuvor bekannt¹⁴⁹. Trotz fehlender Übertragbarkeit gehen die meisten Autoren^{10,128,133} von einer extrachromosomalen Resistenz-Determinante aus. In den meisten Studien wurde die Konjugation bei 37°C versucht. Für Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe H ist allerdings die Transfer-Rate bei 22-30°C optimal, bei 37°C hingegen inhibiert.

Viele Ionen-Effluxsysteme sind phylogenetisch verwandt, so dass ein eventueller gemeinsamer Ursprung aller Effluxsysteme diskutiert wird. Es ist also nicht verwunderlich, dass die im *E. cloacae* Komplex gefundenen Sequenzen auch Homologie mit anderen, teils chromosomalen Effluxsystemen aufwiesen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silR* und *silS* zeigten Homologien zu *copR/ copS* (59%/ 20% abgeleitete Aminosäureidentität) und *pcoR/ pcoS* (57%/ 23% abgeleitete Aminosäureidentität) (nicht im Ergebnisteil dargestellt). Dabei handelt es sich um Regulatorproteine von Kupfereffluxsystemen bei *E. coli*. Noch höhere Ähnlichkeiten waren zu *ylcA* und *ybcZ* (83% bzw. 37% abgeleitete Aminosäureidentität) vorhanden (nicht im Ergebnisteil dargestellt). Die Nomenklatur dieses chromosomalen Effluxsystems von *E. coli* ist nicht einheitlich und die Substratspezifität noch nicht endgültig geklärt. Die ursprünglich hypothetischen Gene wurden als *ybdE*, *ylcD*, *ylcC*, *ylcB*, *ylcA* und *ybcZ* benannt. Nach dem Befund, dass es sich um nahe Verwandte der *sil*-Gene handelte, wurde eine Umbenennung in *agrA* (*ybdE*), *agrB* (*ylcD*), ORF110 (*ylcC*), *agrC* (*ylcB*), *agrR* (*ylcA*) und *agrS* (*ybcZ*) vorgeschlagen^{56,75}. Gleichzeitig wurde die Substratspezifität der Determinante für Silber aufgrund des niedrigen Resistenzniveaus in Frage gestellt⁵⁶. Das Effluxsystem konnte mit Kupfer induziert werden. Daraufhin wurde ein Resistenzmechanismus gegenüber Kupferionen vermutet und eine Umbenennung in *cusA* (*ybdE*), *cusB* (*ylcD*), *cusF* (*ylcC*), *cusC* (*ylcB*), *cusR* (*ylcA*) und *cusS* (*ybcZ*) vorgeschlagen^{68,138}. Die Frage nach der Substratspezifität des chromosomalen Effluxsystems von *E. coli* wurde bislang noch nicht endgültig geklärt.

Die Sequenzen der untersuchten *sil*-Gene des *E. cloacae* Komplexes (*silS*, *silR*, *silC*, *silB*, *silA*, *silP* und ORF105) hatten Identitäten von 88% (ORF105) bis 99% (*silC* und *silS*) mit den *sil*-Genen des IncHI-2-Plasmids pMG101. Auch die abgeleiteten Proteinsequenzen waren zu über 90% identisch mit pMG101. Es konnte gezeigt werden, dass der *Tester*-Stamm tatsächlich ein IncH Plasmid trug und der *Driver*-Stamm nicht. Das alles spricht dafür, dass die Silberresistenz-Determinante des untersuchten Stamms des *E. cloacae* Komplexes auf einem Plasmid kodiert ist.

5.6.3 Funktionalität der Silberresistenz

Die *sil*-Determinante auf Plasmid pMG101 vermittelte bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium eine Silberresistenz bis zu 600µM Silbernitrat⁷⁵.

Ob die Silberresistenz-Determinante auch in Isolaten des *E. cloacae* Komplexes derartig hohe Silberresistenz vermittelt, wurde an einigen Stämmen phänotypisch geprüft. Dabei wiesen die

sil positiven Stämme eine Silberresistenz auf, die sich mit 800µM AgNO₃ im selben Bereich befand wie die Positivkontrolle *E. coli* (pMG101). Die *sil* negativen Stämme hingegen wuchsen nur bis zu einer Konzentration von 100µM Silbernitrat.

Gupta et al.⁷⁴ konnten durch Übertragung von pMG101 die Silbertoleranz von *E. coli* um 600% steigern. Dies entspricht in etwa dem Unterschied zwischen *sil* positiven und *sil* negativen Isolaten von *E. cloacae* in der vorliegenden Arbeit. Dennoch müsste in weiteren Studien untersucht werden, ob beim *E. cloacae* Komplex tatsächlich die *sil*-Determinante allein für die Silberresistenz verantwortlich ist oder ob andere Faktoren die Resistenz mitbedingen.

5.6.4 Prävalenz und Verteilung der *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex

Bei der Untersuchung der Prävalenz der Genotypen des *E. cloacae* Komplexes in der Klinik war aufgefallen, dass die Subspezies von *E. hormaechei* und der Genotyp III die vorherrschenden Vertreter waren. *E. hormaechei* schien zudem signifikant häufiger als andere Vertreter Wundinfektionen zu verursachen.

Da insbesondere Verbrennungswunden oft mit Silberverbindungen zur Infektionsprophylaxe behandelt werden und damit eine Silberresistenz bei diesen Bakterien besonders kritisch wäre, galt es zu klären, wie die *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex verteilt war. Zudem stellte sich die Frage nach der generellen Häufigkeit der Resistenz-Determinante bei Vertretern des *E. cloacae* Komplexes. Mittels PCR auf vier der *sil*-Gene wurden 164 Isolate aus allen Genotypen des Komplexes auf die *sil*-Determinante untersucht.

Dabei zeigte sich, dass 63% aller untersuchten Stämme die Determinante besaßen. Die *sil*-Determinante war Gruppen-spezifisch verteilt. Die häufig in der Klinik vorkommenden Genotypen III, VI und VIII waren überwiegend Träger der Resistenz-Determinante, hingegen war in den selten vertretenen Clustern IX und xiii kein Isolat *sil* positiv.

Die vorliegende Studie ist bislang die erste, in der die Prävalenz der *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex untersucht wurde. Mit 63% erscheint sie erstaunlich hoch. Die Studienstämme wurden jedoch ohne spezielle Auswahlkriterien und ohne Wissen über die Sensitivität oder Resistenz gegenüber Silber gesammelt. Die Isolate waren alle in einem einzigen Krankenhaus isoliert worden, die Prävalenz könnte also in anderen Kliniken variieren. Multi-Center Analysen wären nötig, um die Prävalenz von Silberresistenz bei klinischen Isolaten des *E. cloacae* Komplexes korrekt beurteilen zu können. Die hier

gewonnenen Resultate können jedoch als Grundlage und Vergleichswert in weiteren Studien dienen.

Besonders in Zusammenhang mit den klinisch-hygienischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist die Verteilung der *sil*-Determinante im *E. cloacae* Komplex interessant. Die Subspezies von *E. hormaechei*, deren Affinität zu Wundinfektionen gezeigt wurde, sind tatsächlich mit über 80% Träger der Silberresistenz-Determinante. Das stellt eine nicht zu unterschätzende Gefahr in der Behandlung von Infektionen bei Verbrennungswunden dar. Einerseits würde sich die topische Behandlung mit Silberverbindungen als nutzlos erweisen und andererseits auch noch - wenn die *sil*-Determinante bei *E. cloacae* ebenfalls zusammen mit den gleichen Antibiotika-Resistenzmechanismen wie bei pMG101 kodiert ist - Bakterien selektionieren, die gegen zwei der effektivsten Antibiotika in der systemischen Therapie von Wundseptitiden (Ampicillin, Tetracyclin) resistent sind¹³³. 5 der 8 (62,5%) untersuchten Isolate von venösen Kathetern trugen die Silberresistenz. Ob diese Katheter tatsächlich Silber-beschichtet waren, war nicht mehr nachzuvollziehen. Kürzlich wurden silberresistente *E. cloacae* auf Zähnen von Patienten mit Amalgamfüllungen isoliert³⁴. *E. cloacae* kolonisiert normalerweise nicht gesunde Mundhöhlen. Der Selektionsdruck der im Amalgam enthaltenen Silberionen könnte zu Kolonisation durch silberresistente Bakterien führen und diesen damit die Möglichkeit geben, Infektionen, z.B. des Respirationstraktes, zu verursachen. *E. asburiae*, der in der vorliegenden Studie signifikant häufiger als andere Arten des *E. cloacae* Komplex für Infektionen der Atemwege verantwortlich war, war zu 67% - und damit häufiger als andere Arten - Träger der *sil*-Determinante.

Autoren einer früheren Studie über phänotypische Silberresistenz beim *E. cloacae* Komplex¹⁰ beschrieben eine direkte Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Laktose-Fermentation und Silberresistenz bei *E. cloacae*. Vor kurzem wurden in unserem Labor die phänotypischen Eigenschaften der Genotypen des *E. cloacae* Komplexes untersucht. In Übereinstimmung mit der Beobachtung von Annear et al.¹⁰ wuchs die Mehrheit der Stämme des *sil* negativen genetischen Clusters IX (60%) langsam auf Laktose, d.h. nicht vor dem fünften bis siebten Tag (H. Hoffmann, persönliche Mitteilung).

Unklar bleibt dabei, ob es spezielle gruppenspezifische Faktoren gibt, die es den Stämmen erlaubt die Silberresistenz-tragenden Plasmide aufzunehmen und zu behalten, und ihnen damit das Überleben im Krankenhausmilieu erleichtert. Da jedoch in vielen sowohl zeitlich als auch örtlich getrennten Studien^{71,88,123} immer wieder ähnliche Verteilungen der Genotypen auffielen, ist es wahrscheinlich, dass solche Faktoren existieren.

5.7 Bedeutung der Silberresistenz und Ausblick

Das bekannteste Anwendungsgebiet von Silberverbindungen ist die Behandlung von Verbrennungswunden⁵⁷. Silber-beschichtete Katheter werden verwendet um die Entstehung bakterieller Biofilme zu verhindern¹¹⁵. Zudem werden Silber-haltige Produkte als Desinfektionsmittel¹⁸ und zur Wassersterilisation¹⁶⁶ eingesetzt.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Existenz einer Silberresistenz-Determinante als Fitnessfaktor eine Erklärung für die steigende Prävalenz nosokomialer Infektionen mit Arten des *E. cloacae* Komplexes darstellen könnte. Darüber hinaus würde die ungleiche Verteilung der Determinante zum Teil das unterschiedliche Vorkommen der einzelnen Genotypen als nosokomiale Krankheitserreger erklären. Hierzu muss einschränkend gesagt werden, dass diese Ergebnisse zwar zum Teil die Prävalenz bei Verbrennungswunden erklären könnte, das häufige Vorkommen bei Neugeborenen wird allerdings nicht hinreichend erklärt.

Offen bleibt zudem die Frage, ob Silberresistenz allein ein Fitnessfaktor für besseres Überleben im „ungastlichen“ Umfeld einer Intensivstation darstellt, oder ob die *sil*-Determinante direkt Pathogenitäts-assoziierte Funktionen trägt. 1999 wurde ein Gen (*ibeB*) bei *E. coli* beschrieben, das für die Penetration von mikrovaskulären Endothelien im Gehirn benötigt wird und 97% identisch mit *ylcB* (= *agrC* = *cusC*) ist⁹⁵. Das *silC* vom *E. cloacae* Komplex zeigte 70% abgeleitete Aminosäureidentität mit *ibeB*. Andere Studien haben gezeigt, dass Mutationen in der Kupfertransport ATPase die Virulenz von *Listeria monocytogenes* reduzierten⁵⁵. So wäre es also möglich, dass eine Silberresistenz nicht nur das Überleben sichert, sondern gleichzeitig die Pathogenität erhöht. Dadurch würde die therapeutische Anwendung von Silber und Silbersalzen nicht nur ineffektiv, sondern gefährlich, weil besonders pathogene Bakterien selektiert würden. Ob es einen derartigen Zusammenhang tatsächlich gibt, bleibt momentan noch ungeklärt und sollte in weiteren Studien verfolgt werden.

Weitere Untersuchungen müssen klären, wo die *sil*-Determinante beim *Enterobacter cloacae* Komplex lokalisiert ist. Dabei stellt sich die Frage, ob die Silberresistenz auch beim *E. cloacae* Komplex mit diversen Antibiotikaresistenzen zusammen übertragen wird. Durch Konjugationsversuche mit verschiedenen Genotypen könnte geprüft werden, ob es Unterschiede in der Transferierbarkeit gibt. In Multi-Center Analysen sollte untersucht werden, ob die in dieser Arbeit gezeigte Prävalenz der *sil*-Determinante von 63% im *E.*

cloacae Komplex dem Durchschnitt deutscher Krankenhäuser entspricht. Trotz der großen Bedeutung der Silberresistenz als Fitnessfaktor sollte nicht vergessen werden, dass in der subtraktiven Hybridisierung noch einige Sequenzen ohne bekannte Homologien gefunden wurden, deren Funktion es auf den Grund zu gehen gilt.

6 Zusammenfassung

Vertreter des *Enterobacter cloacae* Komplexes sind gram-negative Bakterien der intestinalen Normalflora vieler Menschen und gleichzeitig häufige Erreger von Pneumonien, Septikämien und Harnwegsinfektionen auf Intensivstationen. Einen Unterschied zu anderen Krankheitserregern stellt die große Heterogenität des *E. cloacae* Komplexes dar. Er besteht aus 13 genetischen Clustern, von denen neun mittlerweile als Spezies bzw. Subspezies beschrieben sind.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Prävalenz der einzelnen Genotypen des Komplexes bei Patienten im Krankenhaus zu untersuchen und die Genotypen eventuell bestimmten Infektionsherden zuzuordnen. Deshalb wurden 196 prospektiv und randomisiert gesammelte klinische Isolate des *E. cloacae* Komplexes mittels *hsp60* Sequenzierung ihren Genotypen zugeordnet und die Prävalenz sowie die Verteilung der Genotypen auf unterschiedliche klinische Materialien verglichen. Die wesentlichen Ergebnisse dabei waren:

1. Zwei Drittel der klinischen Isolate des *E. cloacae* Komplexes im Klinikum Großhadern konnten den Subspezies von *E. hormaechei* (genetische Cluster VI-VIII) und dem Cluster III zugeordnet werden.
2. *E. cloacae* Stämme, die dem Typstamm zugeordnet werden konnten, kamen selten vor und spielten offensichtlich eine sehr untergeordnete Rolle.
3. Einige der Genotypen zeigten Präferenzen zu bestimmten klinischen Materialien, z.B. waren die Subspezies von *E. hormaechei* bei Wundinfektionen signifikant überrepräsentiert.

Ein Großteil der Berichte über Infektionen mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes sind Berichte über klonale Ausbrüche. Zur Identifikation von klonalen Ausbrüchen sind schnelle und zuverlässige Methoden unverzichtbar. Die Validierung der dafür zur Verfügung stehenden PCR-basierten Methoden war für den *E. cloacae* Komplex aufgrund seiner Heterogenität bislang noch völlig unzureichend. Ebenso wenig war bekannt, wie oft klonale Ausbrüche tatsächlich in einem durchschnittlichen Krankenhaus vorkommen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zwei PCR-basierte Methoden des genetischen „finger printings“ bei Bakterien, die ERIC- und REP-PCR, anhand zweier Genotypen des *E. cloacae* Komplexes auf ihr Potential hin untersucht, Isolate genetisch zu trennen. Aufbauend auf

diesen Ergebnissen wurde die Häufigkeit klonaler Ausbrüche im Klinikum Großhadern in einem Zeitraum von fünf Jahren ermittelt. Dabei zeigte sich Folgendes:

1. Die ERIC-PCR ist zur Differenzierung auf Stammebene im *E. cloacae* Komplex nicht geeignet, sie unterscheidet hingegen auf Genotypenebene.
2. Klonale Isolate können mittels REP-PCR mit einer Spezifität von 90% identifiziert werden.
3. Obwohl über fünf Jahre alle Blutkulturisolate untersucht wurden, wurden nur zwei klonale Übertragungen mit jeweils zwei betroffenen Patienten gefunden.

Die Genotypen des *E. cloacae* Komplexes waren ungleich in der Klinik vertreten. Einige Genotypen hatten signifikante Assoziationen zu bestimmten klinischen Materialien. Außerdem schienen nicht klonale Ausbrüche, sondern viele Infektionen mit individuellen Keimen für die zunehmende Bedeutung der Vertreter des *E. cloacae* Komplexes als nosokomiale Erreger verantwortlich zu sein. Dieser Befund spricht für endogene Infektionen mit Stämmen des *E. cloacae* Komplexes.

Mittels subtraktiver Hybridisierung wurde nach möglichen Faktoren gesucht, die eine verbesserte Überlebensfähigkeit im Krankenhausmilieu vermitteln könnten. Es wurde das Genom eines Sepsiserregers von dem eines Pflanzenisolates „genetisch subtrahiert“. Als Faktor, der möglicherweise die zunehmende Prävalenz von Infektionen mit Vertretern des *E. cloacae* Komplexes erklären könnte, fand sich eine Resistenz-Determinante gegen Silberionen. Da Silber als Desinfektionsmittel und Antiseptikum eingesetzt wird, würde eine Resistenz einen Überlebens- und Selektionsvorteil im Krankenhausmilieu darstellen. Eine genauere genetische Analyse der Silberresistenz-Determinante brachte die folgenden Ergebnisse:

1. Die Nukleotidsequenzen sowie die abgeleiteten Proteinsequenzen waren im hohen Maße übereinstimmend mit denen der ursprünglich beschriebenen *sil*-Determinante auf Plasmid pMG101 von *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium.
2. Der Aufbau der Determinante entsprach dem der Originalbeschreibung bei *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium.
3. 63% der untersuchten Isolate des *E. cloacae* Komplexes besaßen diese Resistenz-Determinante. Die *sil*-Determinante war Genotypen-spezifisch verteilt, wobei die

häufig in der Klinik vertretenen Genotypen signifikant öfter Träger der Silberresistenz waren.

4. Die *sil* positiven Isolate wuchsen bei 8x höheren Konzentrationen Silbernitrat als die *sil* negativen Isolate.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die unterschiedliche Relevanz der Genotypen des *E. cloacae* Komplexes bei verschiedenen Infektionen gezeigt. Außerdem wurde durch Identifizierung genetischer Differenz zwischen einem pathogenen und einem als apathogen geltenden Isolats eine Teilerklärung für die unterschiedliche klinische Prävalenz gefunden. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen sollte die Virulenz-assoziierte Bedeutung der Silberresistenz-Determinante analysiert werden. Multizentrische Studien könnten die molekular-epidemiologische und Hygiene-Bedeutung des Fitnessfaktors beleuchten.

In molekularbiologischen Projekten sollten die nicht näher analysierten Genabschnitte der subtraktiven Hybridisierung auf ihre Bedeutung als Virulenzfaktoren analysiert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. **CLONTECH PCR-Select Bacterial Genome Subtraction-** New products. 1997. <http://www.clontech.com>.
2. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report**, data summary from January 1990 - May 1999. *Am.J.Infect.Control* **27**[6], 520-532. 1999.
3. **Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) sytem report**, data summary from January 1996 - December 1997: A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am.J.Infect.Control* **27**[3], 297-284. 1999.
4. **Acolet, D., Z. Ahmet, E. Houang, R. Hurley, and M. E. Kaufmann.** 1994. *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit: account of an outbreak and its relationship to use of third generation cephalosporins. *J. Hosp. Infect.* **28**:273-286.
5. **Adegbola, R. A. and D. C. Old.** 1983. Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter species*. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2175-2180.
6. **Akopyants, N. S., A. Fradkov, L. Diatchenko, J. E. Hill, P. D. Siebert, S. A. Lukyanov, E. D. Sverdlov, and D. E. Berg.** 1998. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:13108-13113.
7. **Al Ansari N., E. B. McNamara, R. J. Cunney, M. A. Flynn, and E. G. Smyth.** 1994. Experience with *Enterobacter* bacteraemia in a Dublin teaching hospital. *J. Hosp. Infect.* **27**:69-72.
8. **Alonso, G., K. Baptista, T. Ngo, and D. E. Taylor.** 2005. Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHII plasmid R27. *Microbiology* **151**:3563-3573.
9. **Andersen, B. M., D. Sorlie, R. Hotvedt, S. M. Almdahl, K. Olafsen, R. George, and A. Gilfillian.** 1989. Multiply beta-lactam resistant *Enterobacter cloacae* infections linked to the environmental flora in a unit for cardiothoracic and vascular surgery. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**:181-191.
10. **Annear, D. I., B. J. Mee, and M. Bailey.** 1976. Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation, and colony structure in *Enterobacter cloacae* from burn wounds. *J. Clin. Pathol.* **29**:441-443.
11. **Araujo, W. L., J. Marcon, W. Maccheroni, Jr., J. D. Van Elsas, J. W. Van Vuurde, and J. L. Azevedo.** 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4906-4914.

12. **Archibald, L. K., M. Ramos, M. J. Arduino, S. M. Agüero, C. Deseda, S. Banerjee, and W. R. Jarvis.** 1998. *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial bloodstream infections traced to extrinsic contamination of a dextrose multidose vial. *J. Pediatr.* **133**:640-644.
13. **Barnes, A. I., C. Ortiz, M. G. Paraje, L. E. Balanzino, and I. Albesa.** 1997. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Microbiol.* **43**:729-733.
14. **Ben-Hamouda, T., T. Foulon, A. Ben-Cheikh-Masmoudi, C. Fendri, O. Belhadj, and K. Ben-Mahrez.** 2003. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J. Med. Microbiol.* **52**:427-433.
15. **Bingen, E., E. Denamur, N. Lambert-Zechovsky, N. Brahimi, L. M. el, and J. Elion.** 1992. Rapid genotyping shows the absence of cross-contamination in *Enterobacter cloacae* nosocomial infections. *J. Hosp. Infect.* **21**:95-101.
16. **Bodey, G. P., L. S. Elting, and S. Rodriguez.** 1991. Bacteremia caused by *Enterobacter*: 15 years of experience in a cancer hospital. *Rev. Infect. Dis.* **13**:550-558.
17. **Bone, R. C.** 1993. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:57-68.
18. **Brady, M. J., C. M. Lisay, A. V. Yurkovetskiy, and S. P. Sawan.** 2003. Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *Am. J. Infect. Control* **31**:208-214.
19. **Braun, V., K. Hantke, and W. Koster.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions. Biol. Syst.* **35**:67-145.
20. **Brenner, D. J., C. Richard, A. G. Steigerwalt, M. A. Asbury, and M. Mandel.** 1980. *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: a new species of Enterobacteriaceae found in clinical specimens and the environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**:1-6.
21. **Brenner, D. J., A. C. McWhorter, A. Kai, A. G. Steigerwalt, and J. J. Farmer, III.** 1986. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* **23**:1114-1120.
22. **Bridges, K., A. Kidson, E. J. Lowbury, and M. D. Wilkins.** 1979. Gentamicin- and silver-resistant pseudomonas in a burns unit. *Br. Med. J.* **1**:446-449.
23. **Burchard, K. W., D. T. Barrall, M. Reed, and G. J. Slotman.** 1986. *Enterobacter* bacteremia in surgical patients. *Surgery* **100**:857-862.
24. **Carr, H. S., T. J. Wlodkowski, and H. S. Rosenkranz.** 1973. Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:585-587.

25. **Chenchik, A., L. Diachenko, F. Moqadam, V. Tarabykin, S. Lukyanov, and P. D. Siebert.** 1996. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* **21**:526-534.
26. **Chmielewski, R., A. Wieliczko, M. Kuczkowski, M. Mazurkiewicz, and M. Ugorski.** 2002. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **49**:163-168.
27. **Chow, J. W., M. J. Fine, D. M. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. P. Johnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu.** 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann. Intern. Med.* **115**:585-590.
28. **Chung, K. I., T. H. Lim, Y. S. Koh, J. H. Song, W. S. Kim, J. M. Choi, and Y. H. Auh.** 1992. Nosocomial pneumonia in medico-surgical intensive care unit. *J. Korean Med. Sci.* **7**:241-251.
29. **Chung, Y. R., Brenner, D. J, Steigerwalt, A. G., Kim, B. S., Kim, H. T, and Cho, K. Y.** *Enterobacter pyrinus* sp. nov. an organism associated with brown leaf spot disease of pear trees. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43**, 157-161. 1993.
30. **Clementino, M. M., F. de, I, C. R. Nascimento, R. Branquinho, C. L. Rocha, and O. B. Martins.** 2001. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3865-3870.
31. **Crosa, L. M., M. K. Wolf, L. A. Actis, J. Sanders-Loehr, and J. H. Crosa.** 1988. New aerobactin-mediated iron uptake system in a septicemia-causing strain of *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* **170**:5539-5544.
32. **Davin-Regli, A., C. Bosi, R. Charrel, E. Ageron, L. Papazian, P. A. Grimont, A. Cremieux, and C. Bollet.** 1997. A nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* strains with the *E. hormaechei* genotype in patients treated with fluoroquinolones. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1008-1010.
33. **Davis, B., H. A. Lilly, and E. J. Lowbury.** 1969. Gram-negative bacilli in burns. *J. Clin. Pathol.* **22**:634-641.
34. **Davis, I. J., H. Richards, and P. Mullany.** 2005. Isolation of silver- and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**:191-194.
35. **Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert.** 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:6025-6030.
36. **Dickey, R. S. and Zumoff, C. H.** Emended description of *Enterobacter cancerogenus* comb. nov. (Formerly *Erwinia cancerogenus*). *Int.J.Syst.Bacteriol.* **38**, 371-374. 1988.

37. **Dijk, Y., E. M. Bik, S. Hochstenbach-Vernooij, G. J. Vlist, P. H. Savelkoul, J. A. Kaan, and R. J. Diepersloot.** 2002. Management of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit using simple preventive measures. *J. Hosp. Infect.* **51**:21-26.
38. **Dominguez-Bello, M. G., M. Lovera, C. Sevcik, and J. C. Brito.** 1993. Characterization of ruminal bacteria producing a toxin associated with a bovine paraplegic syndrome. *Toxicon* **31**:1595-1600.
39. **Dorsey, G., H. T. Borneo, S. J. Sun, J. Wells, L. Steele, K. Howland, F. Perdreau-Remington, and D. R. Bangsberg.** 2000. A heterogeneous outbreak of *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* infections in a surgical intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**:465-469.
40. **Dushay, M. S., B. Asling, and D. Hultmark.** 1996. Origins of immunity: Relish, a compound *Rel*-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:10343-10347.
41. **Earhart, C. F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum, p. 1075-1090. *In* F. C. e. al. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
42. **Efron, B.** Bootstrapping methods: Another look at the jackknife. *Ann.Stat.* **7**, 1-26. 1979.
43. **Efron, B.** The jackknife, the bootstrap, and the other resampling plans. *Conf.Board Math.Sci.Soc.Ind.Appl.Math.* **38**, 1-92. 1982.
44. **Efron, B.** Better bootstrap confidence intervals. *J.Am.Stat.Assoc.* **82**, 171-185. 1987.
45. **Ehni, W. F., L. B. Reller, and R. T. Ellison, III.** 1991. Bacteremia in granulocytopenic patients in a tertiary-care general hospital. *Rev. Infect. Dis.* **13**:613-619.
46. **Elwell, L. P., J. M. Inamine, and B. H. Minshew.** 1978. Common plasmid specifying tobramycin resistance found in two enteric bacteria isolated from burn patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**:312-317.
47. **Fakhry, S. M., J. Alexander, D. Smith, A. A. Meyer, and H. D. Peterson.** 1995. Regional and institutional variation in burn care. *J. Burn Care Rehabil.* **16**:86-90.
48. **Falkiner, F. R.** 1992. *Enterobacter* in hospital. *J. Hosp. Infect.* **20**:137-140.
49. **Farmer, J. J., III, Asbury, M. A., Hickman-Brenner, F. W., Brenner, D. J, and Group, T. E S.** *Enterobacter sakazakii*: a new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **30**, 569-584. 1980.
50. **Farmer, J. J., III, G. R. Fanning, B. R. Davis, C. M. O'Hara, C. Riddle, F. W. Hickman-Brenner, M. A. Asbury, V. A. Lowery, III, and D. J. Brenner.** 1985. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**:77-81.

51. **Felsenstein, J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791. 1985.
52. **Fernandez-Baca, V., F. Ballesteros, J. A. Hervas, P. Villalon, M. A. Dominguez, V. J. Benedi, and S. Alberti.** 2001. Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. *J. Hosp. Infect.* **49**:173-182.
53. **Finnstrom, O., B. Isaksson, S. Haeggman, and L. G. Burman.** 1998. Control of an outbreak of a highly beta-lactam-resistant *Enterobacter cloacae* strain in a neonatal special care unit. *Acta Paediatr.* **87**:1070-1074.
54. **Flynn, D. M., R. A. Weinstein, C. Nathan, M. A. Gaston, and S. A. Kabins.** 1987. Patients' endogenous flora as the source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. *J. Infect. Dis.* **156**:363-368.
55. **Francis, M. S. and C. J. Thomas.** 1997. Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* **22**:67-78.
56. **Franke, S., G. Grass, and D. H. Nies.** 2001. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* **147**:965-972.
57. **Fraser, J. F., J. Bodman, R. Sturgess, J. Faoagali, and R. M. Kimble.** 2004. An in vitro study of the anti-microbial efficacy of a 1% silver sulphadiazine and 0.2% chlorhexidine digluconate cream, 1% silver sulphadiazine cream and a silver coated dressing. *Burns* **30**:35-41.
58. **Fryklund, B., K. Tullus, and L. G. Burman.** 1991. Epidemiology of enteric bacteria in neonatal units--influence of procedures and patient variables. *J. Hosp. Infect.* **18**:15-21.
59. **Fung, C. P., L. S. Wang, Y. C. Juang, C. Y. Liu, and D. L. Cheng.** 1988. *Enterobacter cloacae* bacteremia: clinical analysis of 41 cases. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. (Taipei)* **42**:297-304.
60. **Gaston, M. A.** 1988. *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. *J. Hosp. Infect.* **11**:197-208.
61. **Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and De Ley, J.** Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **39**, 337-345. 1989.
62. **Gayle, W. E., C. G. Mayhall, V. A. Lamb, E. Apollo, and B. W. Haynes, Jr.** 1978. Resistant *Enterobacter cloacae* in a burn center: the ineffectiveness of silver sulfadiazine. *J. Trauma* **18**:317-323.
63. **Genco, C. A. and D. W. Dixon.** 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* **39**:1-11.

64. **Georghiou, P. R., R. J. Hamill, C. E. Wright, J. Versalovic, T. Koeuth, D. A. Watson, and J. R. Lupski.** 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clin. Infect. Dis.* **20**:84-94.
65. **Gilmour, M. W., N. R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill, and D. E. Taylor.** 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* **52**:182-202.
66. **Goh, S. H., S. Potter, J. O. Wood, S. M. Hemmingsen, R. P. Reynolds, and A. W. Chow.** 1996. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**:818-823.
67. **Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, K. Lemke, H. G. Schlegel, and C. Rensing.** 2001. *NreB* from *Achromobacter xylosoxidans* 31A Is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J. Bacteriol.* **183**:2803-2807.
68. **Grass, G. and C. Rensing.** 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145-2147.
69. **Grattard, F., B. Pozzetto, P. Berthelot, I. Rayet, A. Ros, B. Lauras, and O. G. Gaudin.** 1994. Arbitrarily primed PCR, ribotyping, and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **32**:596-602.
70. **Gravens, D. L., H. W. Margraf, C. K. Gravens, J. E. Thomerson, and H. R. Butcher, Jr.** 1969. Silver and intestinal flora: Roles in bacterial colonization of burn wounds. *Arch. Surg.* **99**:454-458.
71. **Grimont, F. and P. A. Grimont.** 1992. The genus *Enterobacter*, p. 2797-2815. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The procaryotes*. Springer Verlag, New York, N.Y..
72. **Grimont, P. A. and E. Ageron.** 1989. *Enterobacter cancerogenus* (Urosevic, 1966) Dickey and Zumoff 1988, a senior subjective synonym of *Enterobacter taylorae* Farmer et al. (1985). *Res. Microbiol.* **140**:459-465.
73. **Gupta, A., K. Matsui, J. F. Lo, and S. Silver.** 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* **5**:183-188.
74. **Gupta, A., M. Maynes, and S. Silver.** 1998. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:5042-5045.
75. **Gupta, A., L. T. Phung, D. E. Taylor, and S. Silver.** 2001. Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiology* **147**:3393-3402.
76. **Gupta, A. and S. Silver.** 1998. Silver as a biocide: will resistance become a problem? *Nat. Biotechnol.* **16**:888.

77. **Gurskaya, N. G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P. D. Siebert, G. L. Khaspekov, K. A. Lukyanov, L. L. Vagner, O. D. Ermolaeva, S. A. Lukyanov, and E. D. Sverdlov.** 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* **240**:90-97.
78. **Haertl, R. and G. Bandlow.** 1993. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. *J. Clin. Microbiol.* **31**:128-133.
79. **Haertl, R. and G. Bandlow.** 1993. Molecular typing of *Enterobacter cloacae* by pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. *J. Hosp. Infect.* **25**:109-116.
80. **Halda-Alija, L., S. P. Hendricks, and T. C. Johnston.** 2001. Spatial and Temporal Variation of Enterobacter Genotypes in Sediments and the Underlying Hyporheic Zone of an Agricultural Stream. *Microb. Ecol.* **42**:286-294.
81. **Hara, E., T. Kato, S. Nakada, S. Sekiya, and K. Oda.** 1991. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* **19**:7097-7104.
82. **Harbarth, S., P. Sudre, S. Dharan, M. Cadenas, and D. Pittet.** 1999. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**:598-603.
83. **Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa.** 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **8**:11-22.
84. **Hedrick, S. M., D. I. Cohen, E. A. Nielsen, and M. M. Davis.** 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* **308**:149-153.
85. **Hendry, A. T. and I. O. Stewart.** 1979. Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients. *Can. J. Microbiol.* **25**:915-921.
86. **Hervas, J. A., F. Ballesteros, A. Alomar, J. Gil, V. J. Benedi, and S. Alberti.** 2001. Increase of *Enterobacter* in neonatal sepsis: a twenty-two-year study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**:134-140.
87. **Hillis, D. M. and Bull, J. J.** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst.Biol.* **42**[2], 182-192. 1993.
88. **Hoffmann, H. and A. Roggenkamp.** 2003. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5306-5318.

89. **Hoffmann, H., S. Stindl, W. Ludwig, A. Stumpf, A. Mehlen, J. Heesemann, D. Monget, K. H. Schleifer, and A. Roggenkamp.** 2005. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. Syst. Appl. Microbiol. **28**:196-205.
90. **Hoffmann, H., S. Stindl, W. Ludwig, A. Stumpf, A. Mehlen, D. Monget, D. Pierard, S. Ziesing, J. Heesemann, A. Roggenkamp, and K. H. Schleifer.** 2005. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. J. Clin. Microbiol. **43**:3297-3303.
91. **Hoffmann, H., S. Stindl, A. Stumpf, A. Mehlen, D. Monget, J. Heesemann, K. H. Schleifer, and A. Roggenkamp.** 2005. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst. Appl. Microbiol. **28**:206-212.
92. **Hoffmann, H., E. Sturenburg, J. Heesemann, and A. Roggenkamp.** 2006. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. Clin. Microbiol. Infect. **12**:322-330.
93. **Honderlick, P., F. Saheb, and P. Cahen.** 1999. Emergence of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*: nosocomial outbreak or change of microbial ecology? Pathol. Biol. (Paris) **47**:437-439.
94. **Hormaeche, E and Edwards, P. R.** A proposed genus *Enterobacter*. Int.Bull.Bacteriol.Nomencl.Taxon. **10**, 71-74. 1960.
95. **Huang, S. H., Y. H. Chen, Q. Fu, M. Stins, Y. Wang, C. Wass, and K. S. Kim.** 1999. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun. **67**:2103-2109.
96. **Hugo, W. B.** 1992. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization (Russell, A.D., Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J., eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
97. **Inoue, K., K. Sugiyama, Y. Kosako, R. Sakazaki, and S. Yamai.** 2000. *Enterobacter cowanii* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae. Curr. Microbiol. **41**:417-420.
98. **Iwobi, A., A. Rakin, E. Garcia, and J. Heesemann.** 2002. Representational difference analysis uncovers a novel IS10-like insertion element unique to pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. FEMS Microbiol. Lett. **210**:251-255.
99. **Izard, D., Gavini, F., and Leclerc, H.** Polynucleotide sequence relatedness and genome size among *Enterobacter intermedium* sp. nov. and the species *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. Zentralbl.Bakteriol.Parasitenkd.Infektionskr. Hyg.Abt.1: Orig.Reihe C **1**, 51-60. 1980.
100. **Izard, D., Gavini, F., Trinel, P. A., and Leclerc, H.** Deoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol. **31**, 35-42. 1981.

101. **Izard, D., A. Husson, C. Richard, F. Gavini, and H. Leclerc.** 1982. [Study of the species "*Enterobacter gergoviae*" by DNA/DNA hybridization (author's transl)]. *Ann. Microbiol. (Paris)* **133**:371-376.
102. **Jersek, B., P. Gilot, M. Gubina, N. Klun, J. Mehle, E. Tcherneva, N. Rijpens, and L. Herman.** 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**:103-109.
103. **John, J. F., Jr., R. J. Sharbaugh, and E. R. Bannister.** 1982. *Enterobacter cloacae*: bacteremia, epidemiology, and antibiotic resistance. *Rev. Infect. Dis.* **4**:13-28.
104. **Johnson, M. P. and R. Ramphal.** 1990. Beta-lactam-resistant *Enterobacter* bacteremia in febrile neutropenic patients receiving monotherapy. *J. Infect. Dis.* **162**:981-983.
105. **Jonas, D., B. Spitzmuller, K. Weist, H. Ruden, and F. D. Daschner.** 2003. Comparison of PCR-based methods for typing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:823-831.
106. **Kaminska, W., J. Patzer, and D. Dzierzanowska.** 2002. Urinary tract infections caused by endemic multi-resistant *Enterobacter cloacae* in a dialysis and transplantation unit. *J. Hosp. Infect.* **51**:215-220.
107. **Karnad, A., S. Alvarez, and S. L. Berk.** 1987. *Enterobacter* pneumonia. *South. Med. J.* **80**:601-604.
108. **Keller, R., M. Z. Pedroso, R. Ritchmann, and R. M. Silva.** 1998. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect. Immun.* **66**:645-649.
109. **Kerouanton, A., A. Brisabois, J. Grout, and B. Picard.** 1996. Molecular epidemiological tools for *Salmonella* Dublin typing. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**:25-29.
110. **Klasen, H. J.** 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* **26**:131-138.
111. **Klasen, H. J.** 2000. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* **26**:117-130.
112. **Klipstein, F. A. and R. F. Engert.** 1977. Immunological interrelationships between cholera toxin and the heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria. *Infect. Immun.* **18**:110-117.
113. **Klipstein, F. A. and R. F. Engert.** 1976. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* **13**:1307-1314.
114. **Klipstein, F. A., R. F. Engert, and H. B. Short.** 1977. Relative enterotoxigenicity of coliform bacteria. *J. Infect. Dis.* **136**:205-215.
115. **Klueh, U., V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, and J. D. Bryers.** 2000. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **53**:621-631.

116. **Kosako, Y., K. Tamura, R. Sakazaki, and K. Miki.** 1996. *Enterobacter kobei* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae resembling *Enterobacter cloacae*. *Curr. Microbiol.* **33**:261-265.
117. **Kuboyama, R. H., H. B. de Oliveira, and Moretti-Branch.** 2003. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**:490-494.
118. **Kumar, S., S. R. Gadagkar, A. Filipski, and X. Gu.** 2001. Determination of the number of conserved chromosomal segments between species. *Genetics* **157**:1387-1395.
119. **Lambert-Zechovsky, N., E. Bingen, E. Denamur, N. Brahimi, P. Brun, H. Mathieu, and J. Elion.** 1992. Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. *Clin. Infect. Dis.* **15**:30-32.
120. **Lawley, T. D., M. W. Gilmour, J. E. Gunton, L. J. Standeven, and D. E. Taylor.** 2002. Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 1 (*TraI*) from the IncHI1 plasmid R27. *J. Bacteriol.* **184**:2173-2180.
121. **Lerner, A. M.** 1980. The gram-negative bacillary pneumonias. *Dis. Mon.* **27**:1-56.
122. **Li, Y., A. Shi, and L. Liu.** 1995. [An investigation into antibiotic resistance and plasmid pattern of *Enterobacter cloacae* in burn infection]. *Zhonghua Zheng. Xing. Shao Shang Wai Ke. Za Zhi.* **11**:327-329.
123. **Lindh, E. and J. Ursing.** 1991. Genomic groups and biochemical profiles of clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *APMIS* **99**:507-514.
124. **Liu, S. C., H. S. Leu, M. Y. Yen, P. I. Lee, and M. C. Chou.** 2002. Study of an outbreak of *Enterobacter cloacae* sepsis in a neonatal intensive care unit: the application of epidemiologic chromosome profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *Am. J. Infect. Control* **30**:381-385.
125. **Livrelli, V., C. C. De, M. P. Di, A. rfeuille-Michaud, C. Forestier, and B. Joly.** 1996. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1963-1969.
126. **Low, D. E., L. R. Kaiser, D. A. Haydock, E. Trulock, and J. D. Cooper.** 1993. The donor lung: infectious and pathologic factors affecting outcome in lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **106**:614-621.
127. **Lukyanov, K. A., G. A. Launer, V. S. Tarabykin, A. G. Zaraisky, and S. A. Lukyanov.** 1995. Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **229**:198-202.
128. **Markowitz, S. M., S. M. Smith, and D. S. Williams.** 1983. Retrospective analysis of plasmid patterns in a study of burn unit outbreaks of infection due to *Enterobacter cloacae*. *J. Infect. Dis.* **148**:18-23.

129. **Marston, E. L., J. W. Sumner, and R. L. Regnery.** 1999. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (*groEL*) of *Bartonella species*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 3**:1015-1023.
130. **Mayer, K. H., J. D. Hopkins, E. S. Gilleece, L. Chao, and T. F. O'Brien.** 1986. Molecular evolution, species distribution, and clinical consequences of an endemic aminoglycoside resistance plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:628-633.
131. **Mayhall, C. G., V. A. Lamb, W. E. Gayle, Jr., and B. W. Haynes, Jr.** 1979. *Enterobacter cloacae* septicemia in a burn center: epidemiology and control of an outbreak. *J. Infect. Dis.* **139**:166-171.
132. **McConkey, S. J., D. C. Coleman, F. R. Falkiner, S. R. McCann, and P. A. Daly.** 1989. *Enterobacter cloacae* in a haematology/oncology ward--first impressions. *J. Hosp. Infect.* **14**:277-284.
133. **McHugh, G. L., R. C. Moellering, C. C. Hopkins, and M. N. Swartz.** 1975. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet* **1**:235-240.
134. **Minshew, B. H., R. K. Holmes, J. P. Sanford, and C. R. Baxter.** 1974. Transferrable resistance to tobramycin in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* associated with enzymatic acetylation of tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**:492-497.
135. **Modi, N., V. Damjanovic, and R. W. Cooke.** 1987. Outbreak of cephalosporin resistant *Enterobacter cloacae* infection in a neonatal intensive care unit. *Arch. Dis. Child* **62**:148-151.
136. **Moyer, C. A., L. Brentano, D. L. Gravens, H. W. Margraf, and W. W. Monaf, Jr.** 1965. Treatment of large human burns with 0.5 per cent silver nitrate solution. *Arch. Surg.* **90**:812-867.
137. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**:263-273.
138. **Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten, and T. V. O'Halloran.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**:5864-5871.
139. **Murray, M. G. and W. F. Thompson.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**:4321-4325.
140. **Neu, H. C. and E. B. Winshell.** 1972. Relation of beta-lactamase activity and cellular location to resistance of *Enterobacter* to penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**:107-111.
141. **O'Hara, C. M., A. G. Steigerwalt, B. C. Hill, J. J. Farmer, III, G. R. Fanning, and D. J. Brenner.** 1989. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2046-2049.

142. **Oleastro, M., L. Monteiro, P. Lehours, F. Megraud, and A. Menard.** 2006. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. *Infect. Immun.* **74**:4064-4074.
143. **Olive, D. M. and P. Bean.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1661-1669.
144. **Page, D. T., K. F. Whelan, and E. Collieran.** 2001. Characterization of two autoreplicative regions of the IncHI2 plasmid R478: RepHI2A and RepHI1A((R478)). *Microbiology* **147**:1591-1598.
145. **Parsons, Y. N., S. Panagea, C. H. Smart, M. J. Walshaw, C. A. Hart, and C. Winstanley.** 2002. Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4607-4611.
146. **Pena, C., M. Pujol, R. Pallares, M. Císnal, J. Ariza, and F. Gudiol.** 1993. [Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter* spp.: epidemiology and prognostic factors]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **11**:424-428.
147. **Peters, S. M., J. Bryan, and M. F. Cole.** 2000. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction typing of isolates of *Enterobacter cloacae* from an outbreak of infection in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Infect. Control* **28**:123-129.
148. **Pruitt, B. A., Jr., J. A. O'Neill, Jr., J. A. Moncrief, and R. B. Lindberg.** 1968. Successful control of burn-wound sepsis. *JAMA* **203**:1054-1056.
149. **Rennie, R. P. and I. B. Duncan.** 1977. Emergence of gentamicin-resistant *Klebsiella* in a general hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**:179-184.
150. **Roberts, D. P., P. D. Dery, I. Yucel, J. Buyer, M. A. Holtman, and D. Y. Kobayashi.** 1999. Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2513-2519.
151. **Rodriguez-Barradas, M. C., R. J. Hamill, E. D. Houston, P. R. Georghiou, J. E. Clarridge, R. L. Regnery, and J. E. Koehler.** 1995. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1089-1093.
152. **Roehrborn, A., L. Thomas, O. Potreck, C. Ebener, C. Ohmann, P. E. Goretzki, and H. D. Roher.** 2001. The microbiology of postoperative peritonitis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1513-1519.
153. **Roggkamp, A., H. Hoffmann, and M. W. Hornef.** 2004. Growth control of small-colony variants by genetic regulation of the hemin uptake system. *Infect. Immun.* **72**:2254-2262.
154. **Rose, H. D. and M. L. Koch.** 1966. Hospital-acquired *Aerobacter cloacae* infections. Results of two concomitant studies. *Arch. Intern. Med.* **117**:92-98.

155. **Rose, H. D. and J. Schreier.** 1968. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. *Am. J. Med. Sci.* **255**:228-236.
156. **Rosenkranz, H. S., J. E. Coward, T. J. Wlodkowski, and H. S. Carr.** 1974. Properties of silver sulfadiazine-resistant *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**:199-201.
157. **Russell, A. D. and W. B. Hugo.** 1994. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* **31**:351-370.
158. **Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
159. **Sanders, W. E., Jr. and C. C. Sanders.** 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:220-241.
160. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
161. **Schubert, S., S. Cuenca, D. Fischer, and J. Heesemann.** 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J. Infect. Dis.* **182**:1268-1271.
162. **Sevcik, C., J. Noriega, and G. D'Suze.** 2003. Identification of *Enterobacter* bacteria as saxitoxin producers in cattle's rumen and surface water from Venezuelan Savannahs. *Toxicon* **42**:359-366.
163. **Sherburne, C. K., T. D. Lawley, M. W. Gilmour, F. R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D. J. Rose, and D. E. Taylor.** 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* **28**:2177-2186.
164. **Shi, Z. Y., P. Y. Liu, Y. J. Lau, Y. H. Lin, and B. S. Hu.** 1996. Epidemiological typing of isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2784-2790.
165. **Siebert, P. D., A. Chenchik, D. E. Kellogg, K. A. Lukyanov, and S. A. Lukyanov.** 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:1087-1088.
166. **Silver, S.** 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:341-353.
167. **Simi, S., G. V. Carbonell, R. M. Falcon, M. S. Gatti, P. P. Joazeiro, A. L. Darini, and T. Yano.** 2003. A low molecular weight enterotoxic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Microbiol.* **49**:479-482.
168. **Sinave, C. P.** *Enterobacter* infections. 2003. <http://master.emedicine.com/med/topic678.htm>.
169. **Sokal, R. R. and Michener, C. D.** *Univ. Kan. Sci. Bull.* **28**, 1409-1438. 1958.

170. **Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann, and S. Schubert.** 2003. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect. Immun.* **71**:3285-3293.
171. **Srinivasan, U., B. Foxman, and C. F. Marrs.** 2003. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **41**:285-289.
172. **Steinhauer, B. W., T. C. Eickhoff, J. W. Kislak, and M. Finland.** 1966. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* division. Clinical and epidemiologic characteristics. *Ann. Intern. Med.* **65**:1180-1194.
173. **Straus, D. and F. M. Ausubel.** 1990. Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:1889-1893.
174. **Studier, J. A. and K. J. Keppler.** 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol. Biol. Evol.* **5**:729-731.
175. **Stumpf, A. N., A. Roggenkamp, and H. Hoffmann.** 2005. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the *Enterobacter cloacae* complex. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**:9-16.
176. **Szczuka, E. and A. Kaznowski.** 2004. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**:220-228.
177. **Tang, Y. W., N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge, and D. H. Persing.** 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3674-3679.
178. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.
179. **Thomas, A., M. K. Lalitha, M. V. Jesudason, and S. John.** 1993. Transducer related *Enterobacter cloacae* sepsis in post-operative cardiothoracic patients. *J. Hosp. Infect.* **25**:211-214.
180. **Tresoldi, A. T., M. C. Padoveze, P. Trabasso, J. F. Veiga, S. T. Marba, N. A. von, and M. L. Branchini.** 2000. *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *Am. J. Infect. Control* **28**:258-261.
181. **Tunkel, A. R., M. J. Fisch, A. Schlein, and W. M. Scheld.** 1992. *Enterobacter* endocarditis. *Scand. J. Infect. Dis.* **24**:233-240.

182. **van den Berg, R. W., H. L. Claahsen, M. Niessen, H. L. Muytjens, K. Liem, and A. Voss.** 2000. *Enterobacter cloacae* outbreak in the NICU related to disinfected thermometers. *J. Hosp. Infect.* **45**:29-34.
183. **van Nierop, W. H., A. G. Duse, R. G. Stewart, Y. R. Bilgeri, and H. J. Koornhof.** 1998. Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3085-3087.
184. **van Tiel-Menkveld, G. J., J. M. Mentjox-Vervuurt, B. Oudega, and F. K. de Graaf.** 1982. Siderophore production by *Enterobacter cloacae* and a common receptor protein for the uptake of aerobactin and cloacin DF13. *J. Bacteriol.* **150**:490-497.
185. **van Tiel-Menkveld, G. J., E. Veltkamp, and F. K. de Graaf.** 1981. Mitomycin C-induced synthesis of cloacin DF13 and lethality in cloacinogenic *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **146**:41-48.
186. **Ventura, M. and R. Zink.** 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**:141-154.
187. **Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.
188. **Verweij, P. E., B. A. Van, W. J. Melchers, A. Voss, J. A. Hoogkamp-Korstanje, and J. F. Meis.** 1995. Interrepeat fingerprinting of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae* isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **16**:25-29.
189. **von Graevenitz A.** 1990. Revised nomenclature of *Campylobacter laridis*, *Enterobacter intermedium*, and "*Flavobacterium branchiophila*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:211.
190. **Wagener, M. M. and V. L. Yu.** 1992. Bacteremia in transplant recipients: a prospective study of demographics, etiologic agents, risk factors, and outcomes. *Am. J. Infect. Control* **20**:239-247.
191. **Wang, C. C., M. L. Chu, L. J. Ho, and R. C. Hwang.** 1991. Analysis of plasmid pattern in paediatric intensive care unit outbreaks of nosocomial infection due to *Enterobacter cloacae*. *J. Hosp. Infect.* **19**:33-40.
192. **Weischer, M. and H. J. Kolmos.** 1993. Ribotyping of selected isolates of *Enterobacter cloacae* and clinical data related to biotype, phage type, O-serotype, and ribotype. *APMIS* **101**:879-886.
193. **Weischer, M. and H. J. Kolmos.** 1992. Retrospective 6-year study of *Enterobacter* bacteraemia in a Danish university hospital. *J. Hosp. Infect.* **20**:15-24.

194. **Weischer, M., H. J. Kolmos, M. E. Kaufmann, and V. T. Rosdahl.** 1993. Biotyping, phage typing, and O-serotyping of clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. APMIS **101**:838-844.
195. **Wenger, P. N., J. I. Tokars, P. Brennan, C. Samel, L. Bland, M. Miller, L. Carson, M. Arduino, P. Edelstein, S. Agüero, C. Riddle, C. O'Hara, and W. Jarvis.** 1997. An outbreak of *Enterobacter hormaechei* infection and colonization in an intensive care nursery. Clin. Infect. Dis. **24**:1243-1244.
196. **Winstanley, C.** 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. J. Med. Microbiol. **51**:459-467.

8 Anhang

8.1 Homologien der *sil*-Sequenzen

Tabelle 23: Homologien der *sil*-Sequenzen von EN373. Die Bezeichnung der Sequenzen orientiert sich an pMG101. ID: Identität

Bezeichnung	Länge	Acc.No.	Homologie mit	Homol.Region	Score	ID (%)	Gaps (%)	
<i>silS</i>	1590-1693	104	AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	67973-68076	174	96	0
			AY378100	KLPN pLVPK	176542-176439	174	96	0
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	106214-106111	174	96	0
			BX664015	SEMA pR478, silver resistance	126230-126333	159	94	0
			AY009394	SAEN MIP235 SiS	384-281	159	94	0
			AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	1590-1693	159	94	0
			AY009384	SAEN plasmid SiS	384-281	159	94	0
			AY009379	SEMA pR478 SiS	384-281	159	94	0
			AY009374	SEMA pR476b SiS	384-281	159	94	0
	AY009389	SAEN pWR23 SiS	384-281	135	91	0		
<i>silS</i>	2292-3005	714	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	2292-3005	1281	99	0
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	68663-69376	1035	94	0
			AY378100	KLPN pLVPK	175852-175139	1035	94	0
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	105524-104811	1035	94	0
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	126920-127633	1011	94	0
			AY009388	SAEN pWR23 SiS	607-71	731	94	0
			AY009393	SAEN MIP235 SiS	607-71	731	94	0
			AY009378	SEMA pR478 SiS	607-71	731	94	0
			AY009383	SAEN plasmid SiS	607-71	700	93	0
			AY009373	SEMA pR476b SiS	607-71	668	92	0
<i>silR</i>	3048-3572	525	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	3048-3572	977	98	0
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	69425-69937	698	92	1
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	127682-128194	690	92	1
			AY378100	KLPN pLVPK	175090-174578	658	91	1
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	104762-194250	658	91	1
<i>silC</i>	4090-4470	381	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	4090-4470	698	99	0
			AY378100	KLPN pLVPK	174060-173680	650	97	0
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	103732-103352	650	97	0
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	128712-129092	571	95	0
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	70455-70835	563	94	0
<i>silB</i>	6600-6757	158	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	6600-6757	281	97	0
			AY378100	KLPN pLVPK	171541-171384	242	94	0
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	131221-131378	242	94	0
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	101213-101056	242	94	0
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	72964-73121	234	93	0
			7026-7110	85	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	7026-7110	137
	AY378100	KLPN pLVPK	171115-171031	121	92	0		
	BX664015	SEMA pR478 silver resistance	131647-131731	121	92	0		
	AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	100787-100703	121	92	0		
	AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	73390-73474	113	91	0		

<i>silA</i>	7110-7237	128	AY378100	KLPN pLVPK	171031-170904	230	97	0		
			AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	7110-7237	230	97	0		
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	100703-100576	230	97	0		
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	131731-131850	206	96	0		
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	73474-73593	198	95	0		
			10111-10259	149	AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	76475-76623	200	91	0
		AY378100	KLPN pLVPK	168030-167882	200	91	0			
		BX664015	SEMA pR478 silver resistance	134732-134880	200	91	0			
		AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	97702-97554	200	91	0			
		AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	10111-10259	184	90	0			
ORF 105	10474-10790	317	AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	10474-10790	351	88	0		
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	135094-135410	327	88	0		
			AY378100	KLPN pLVPK	187668-167352	311	87	0		
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	97340-97024	311	87	0		
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	76837-77153	303	87	0		
<i>silP</i>	10889-11112	224	AY009375	SEMA pR476b SilP	36-248	329	93	0		
			AY009390	SAEN pWR23 SilP	25-248	303	91	0		
			AY009395	SAEN MIP235 SilP	25-248	303	91	0		
			AY009385	SAEN plasmid SilP	25-248	303	91	0		
			AY009380	SEMA pR478 SilP	25-248	303	91	0		
			BX664015	SEMA pR478 silver resistance	135519-135728	297	93	1		
			AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	10889-11112	295	91	0		
			AY378100	KLPN pLVPK	167243-167034	289	92	1		
			AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	96915-96706	289	92	1		
			AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	77252-77472	287	91	1		
			11888-12403	516	AY378100	KLPN pLVPK	166252-165737	952	98	0
					AP006726	KLPN NTUH-K2044 pK2044	95924-95409	952	98	0
					AF067954	SATM pMG101 <i>sil</i> Operon	11888-12403	912	97	0
					BX664015	SEMA pR478 silver resistance	136510-137025	888	96	0
		AY214164	ESCO pAPEC-O2-R	78254-78769	880	96	0			

8.2 Nukleinsäuresequenzen der *sil*-Gene

silS (818 bp sequenziert von 1494 bp)

[gi|4206623|gb|AF067954.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/4206623) *Salmonella typhimurium* plasmid pMG101 silver binding protein precursor Sile (sile), silRS operon, silC(ORF96)BA(ORF105)P operon, complete sequence; and ORF191 gene, partial cds
Length = 14211

Score = 159 bits (80), Expect = 2e-36

Identities = 98/104 (94%)

```
Query: 20   tccgggatcattttctccagctctgggcacggataagataaaaacgcgtgagcgtactcc 79
          |||||
Sbjct: 1590 tccggaatcattttctccagctctgggcacggataagataaaaacgcgttgagtgtacgtcc 1649
```

```
Query: 80   gattccaccgctctcttccgtgatgtgcttccacgattgactt 123
          |||||
Sbjct: 1650 gattccacctgcactcttccgtgatgtgcttccacgattgactt 1693
```

Score = 1281 bits (646), Expect = 0.0

Identities = 709/714 (99%)

```
Query: 1    tctcaatctttccaatcatatgattgaacgagataaccagctgctccagctcaatggga 60
          |||||
Sbjct: 2292 tctcaatctttccaatcatatgattgaacgagataaccagctgctccagctcaatggga 2351
```

```
Query: 61   acgctgtcgggtccagccgcgcacaaagattctcggaggtgatgttttaatggcattg 120
          |||||
Sbjct: 2352 acgctgtcgggtccagccgcgcacaaagattctcggaggtgatgttttaatggcattg 2411
```

```
Query: 121  ctgacattacgaagggcaggtgccctgacggacagcagatgcaatgatcagaacaatc 180
          |||||
Sbjct: 2412 ctgacattacgaagggcaggtgccctgacggacagcaatgcaatgatcagaacaatc 2471
```

```
Query: 181  agcaggcttatcacgacggcagatcgcaatcagatttttttcagcgcacagaggtaatgg 240
          |||||
Sbjct: 2472 agcaggcttatcacgacggcagatcgcaatcagatttttttcagcgcacagaggtaatgg 2531
```

```
Query: 241  agatggaattaatggagaggccagtcagcatgacataattctgctgtttgccctgaaat 300
          |||||
Sbjct: 2532 agatggaattaatggagaggccagtcagcatgacatagttctgctgtttgccctgaaat 2591
```

```

Query: 301  gtcgcctggccagaggagggcgataatccggtacgtttccatcttcattccggaccggta 360
           |||
Sbjct: 2592  gtcgcctggccagaggagggcgataatccggtacgtttccatcttcattccggaccggta 2651

Query: 361  tccatcgctctcgcagtatcctccaccgtccagagaaagacatcccgtagcgcgggctgtgc 420
           |||
Sbjct: 2652  tccatcgctctcgcagtatcctccaccgtccagagaaagacgtagcgcgggctgtgc 2711

Query: 421  tcgctaaaatcggtgaattcacggccgggtagtgctgccccctgcgcagagctgtac 480
           |||
Sbjct: 2712  tcgctaaaatcggtgaattcacggccgggtagtgctgccccctgcgcagagctgtac 2771

Query: 481  agcacctcaccggggattgaggagcaaaagggcaacgtagcgcggtagctggcgatcgat 540
           |||
Sbjct: 2772  agcacctcaccggggattgaggagcaaaagggcaacgtagcgcggtagctggcgatcgat 2831

Query: 541  tcctttatgcttactttttttcatccggatctgccggggactggagtatacggtc 600
           |||
Sbjct: 2832  tcctttatgcttactttttttcatccggatctgccggggactggagtatacggtc 2891

Query: 601  agtgtggtgctgattggtgcagatcgctgacatcctgctcggcaaaatgcttttcaaca 660
           |||
Sbjct: 2892  agtgtggtgctgattggtgcagatcgctgacatcctgctcggcaaaatgcttttcaaca 2951

Query: 661  gaatgcagcataaaccagggtgaaggcgataaacgccagtattgtggacaggctg 714
           |||
Sbjct: 2952  gaatgcagcataaaccagggtgaaggcgataaacgccagtattgtggacaggctg 3005

```

Abbildung 30: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silS* von ENAS 373 und pMG101

***silR* (525 bp sequenziert von 687 bp)**

Score = 977 bits (493), Expect = 0.0
Identities = 517/525 (98%)

```

Query: 1      gacggcttgctatgcatccgggatctccagcatgtagcccacgccccgcactgtctggat 60
          |||
Sbjct: 3048  gacggcttgctatgcatccgggatctccagcatgtagcccacgccccgcactgtctggat 3107

Query: 61     cagttttgtcccgtaaatcgttgtctattttagcgcggagtcgctttactgcgacatcaat 120
          |||
Sbjct: 3108  cagttttgtcccgtaaatcgttgtctattttagcgcggagtcgctttactgcgacatcaat 3167

Query: 121    cgcgtagtgctgctgtcaaaaattcatgtcccagaccctgaagaaggcaatcagggga 180
          |||
Sbjct: 3168  cgcgtagtgctcagctgtcaaaaattcatgtaccagaccatgaagaaggcaatcagggga 3227

Query: 181    gcggggaagaacttctccctgatggcgaagaagaattccagcaagctgaactctttact 240
          |||
Sbjct: 3228  gcggggaagaacttctccctgatggcgaatgaagaattccagcaagctgaactctttact 3287

Query: 241    ggtgagcacaatgcggttcccggcgcggctgacttttctggatacgagatcaaccgagag 300
          |||
Sbjct: 3288  ggtgagcacaatgcggttcccggcgcggctgacttttctggatacgagatcaaccgagag 3347

Query: 301    gtcagccactttaagctggctttccgtgatcatcgtgtttccccgcctgaggagggttct 360
          |||
Sbjct: 3348  gtcagccactttaagctggctttccgtgatcatcgtgtttccccgcctgaggagggttct 3407

Query: 361    taccggggcgagcagttcagcaaacgcaaagggttcaccagataatcgtccgcaccag 420
          |||
Sbjct: 3408  taccggggcgagcagttcagcaaacgcaaagggttcaccagataatcgtccgcaccag 3467

Query: 421    ctcaagtcctttgaccctgtgttcaatcgtgccaagggccgtcagcagtaataccggcat 480
          |||
Sbjct: 3468  ctcaagtcctttgaccctgtgttcaatcgtgccaagggccgtcagcagtaataccggcat 3527

Query: 481    cccctttccggcactgcgcagcatacggatgatatcccagccggt 525
          |||
Sbjct: 3528  cccctttccggcactgcgcagcatacggatgatatcccagccggt 3572

```

Abbildung 31: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silR* von ENAS 373 und pMG101

***silC* (381 bp sequenziert von 1386 bp)**

Score = 698 bits (352), Expect = 0.0
Identities = 379/381 (99%)

```

Query: 1      cgggctggcgaaactttttgtcgatccccaggtcagcaggctgatcggggaagccctga 60
           |||
Sbjct: 4090   cgggctggcgaaactttttgtcgatccccaggtcagcaggctgatcggggaagccctga 4149

Query: 61     ataataaccgtgatttgagaatggctgccctgaaggtgaagaggcccgggccagtca 120
           |||
Sbjct: 4150   ataataaccgtgatttgagaatggctgccctgaaggtgaagaggcccgggccagtca 4209

Query: 121    acgtcacggatgcagatcgttatccccaactgaatgcctcatccgggatcacatacaacg 180
           |||
Sbjct: 4210   acgtcacggatgcagatcgttatccccaactgaatgcctcatccgggatcacatacaacg 4269

Query: 181    gtggtctgaaaggtgacaagccgaccacacaggagtacgacgcggtctggagctcagct 240
           |||
Sbjct: 4270   gtggtctgaaaggtgacaagccgaccacacaggagtacgacgcggtctggagctcagct 4329

Query: 241    atgagctcgattttttggcaaacttaagaacatgagtgaggctgatcgccagaactact 300
           |||
Sbjct: 4330   atgagctcgattttttggcaaacttaagaacatgagtgaggctgatcgccagaactact 4389

Query: 301    ttgccagcgaagaagcccgtcgagccgtacacatcctgctggtctccaacgtttcacaga 360
           |||
Sbjct: 4390   ttgccagcgaagaagcccgtcgagccgtacacatcctgctggtctccaacgtttcacaga 4449

Query: 361    gctatttcaaccagcaactgg 381
           |||
Sbjct: 4450   gctatttcagccagcaactgg 4470

```

Abbildung 32: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silC* von ENAS 373 und pMG101

***silB* (243 bp sequenziert von 1297 bp)**

Score = 281 bits (142), Expect = 2e-73
Identities = 154/158 (97%)

```

Query: 1      gcctatctgctgaaagatacctcgcagtttgcaatttcggtaccggttatccggataaa 60
                |||
Sbjct: 6600   gcctatctgctgaaagatacgtcgcagtttgaaatttcggtaccggttatccggataaa 6659

Query: 61     acattccatgtcgaaaaatggaacattcttcccagcgtggatcagacaaccgcacgctt 120
                |||
Sbjct: 6660   acattccatgtcgaaaaatggaacattcttcccagcgtggatcagacaaccgcacgctt 6719

Query: 121    caggtcgcctccaggttactaacaaggatgatttct 158
                |||
Sbjct: 6720   caggtcgcctccaggttactaacaaggatgagtttct 6757

```

Score = 137 bits (69), Expect = 4e-30
Identities = 81/85 (95%)

```

Query: 1      cgtatgcgccaccctgaaaaacagaaaacagtatccagcaatgtctgagcagcctgta 60
                |||
Sbjct: 7026   cgtatgcgccaccctgaaaaacagaaaacagtatccagcaatgtctgagcagcctgta 7085

Query: 61     aatatgcattcagggcactgaggag 85
                |||
Sbjct: 7086   aatatgcattcagggcactgaggag 7110

```

Abbildung 33: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silB* von ENAS 373 und pMG101

***silA* (277 bp sequenziert von 3147 bp)**

Score = 230 bits (116), Expect = 6e-58

Identities = 125/128 (97%)

```

Query: 1      gacgacgatgattgaatggattatccggcgctcgtcgcgaaccgtttcctggatgat 60
             |||
Sbjct: 7110  gacgacgatgattgaatggattatccggcgctcgtcgcgaaccgtttcctggatgat 7169

Query: 61     ggggcactgtttctcagcatctggggcacatggacgataattaacacgccggtcgatgc 120
             |||
Sbjct: 7170  ggggcactgtttctcagcatctggggcacatggacgataattaacacgccggtcgatgc 7229

Query: 121    ggtgcctg 128
             |||
Sbjct: 7230  gctgcctg 7237

```

Score = 184 bits (93), Expect = 4e-44

Identities = 135/149 (90%)

```

Query: 1      ctctggggaaccggcgcatgatcagaacacatgagccgatatggcggcccatgattggc 60
             |||
Sbjct: 10111  ctctggggaaccggcgcgagggttcagaagtcagccgattgctgcccgaatgattggt 10170

Query: 61     gggatgatcacgctccgctgctgtccctgttcattattcctgccgcctataaaatc 120
             |||
Sbjct: 10171  gggatgatcacggctccgctgctgtccctgttcattattcctgccgcctataaaatc 10230

Query: 121    tggctgcgagacataaaaaagcgtgtc 149
             |||
Sbjct: 10231  tggctgcgagacataaaaaagcgtgtc 10259

```

Abbildung 34: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silA* von ENAS 373 und pMG101

ORF105 (317 bp sequenziert von 318 bp)

Score = 351 bits (177), Expect = 7e-94
Identities = 282/317 (88%)

```

Query: 1      atggaagacgacgggttgaggtgacccacgtcatgaatgatcaggccctgtcagcc 60
            |||
Sbjct: 10474 atggaagacgacgggttcgaagtgcgaactcacgtcatgaatgatcaggcgctgtcagcc 10533

Query: 61      ctgaaagaaaatgatgctgttctgctgagctgagaagctgtcataaccgcagttactgggt 120
            |||
Sbjct: 10534 ctgaaagaaaagcatgctgttctgctggactacgaagttgtcataaccgcgggtttaggt 10593

Query: 121     aatttgatcattgaaggccatgtgcctgcagccacgatacataaggccatgcagctctggt 180
            |||
Sbjct: 10594 aatttgatcattgaaggccatgtgcctgcggcaacgatacataaggccatgcagctctggt 10653

Query: 181     tcagggatcttaggtcttgccaccccgccatgctggcgggagccgggaatggagatg 240
            |||
Sbjct: 10654 tcgggtatatacgggtctcgccaccccggtatgccagcaggaagtccgggaatggagatg 10713

Query: 241     ggggccgtaaaagaggcttacgatgttatctcattctcccgagggcagtaaaaaagtc 300
            |||
Sbjct: 10714 ggggccgaaaagaggcttacgatgttatcgcatctccacggagggcagtaaaaaagtc 10773

Query: 301     ttccagcgaatcgaata 317
            |||
Sbjct: 10774 ttccagcgaatcgaata 10790

```

Abbildung 35: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von ORF105 von ENAS 373 und pMG101

silP (720 bp sequenziert von 2475 bp)

Score = 295 bits (148), Expect = 3e-77
Identities = 204/224 (91%)

```

Query: 1      atgcttcagatgcataaggagagttactgtgaaaaatgacaatgagtgcaacaaac 60
            |||
Sbjct: 10889 atgcttcagatgcataaggagagttactgtgaaaaatgacaatgcagtggaacataac 10948

Query: 61      aaccaggactgcttcttgacagaacatctatccgggacgagagccagcattgcataag 120
            |||
Sbjct: 10949 aaccaggactgcttcttgagcagaacatcatccgggacgagagtcacgcattgcataag 11008

Query: 121     gtgagagatccgtgtgsgggatggcatctctgcccagacaaggcgacacagcagcattga 180
            |||
Sbjct: 11009 gtgagagaaatccgtgtgsgggatggcatctctgcccagacaaggcgacacagcagcattcga 11068

Query: 181     taccaggaccatcagctttatctgctctaccagctgtgagag 224
            |||
Sbjct: 11069 taccaggaccatcagctttatctgctccgcccagctgtgagag 11112

```

```

Score = 912 bits (460), Expect = 0.0
Identities = 502/516 (97%)

Query: 6      aagctccgcatcagacctggagagagtattccggtcgacgggatcgtggtcgaaggcaaa 65
            |||
Sbjct: 11888  aagctccgcatcagacctggagagagtattccggtcgacgggatcgtggtcgaaggcaaa 11947

Query: 66     acaacggtgatgaatcgatggtgaccggggagctctatgccggttaccaaaaagagggt 125
            |||
Sbjct: 11948  acaaccggtggatgaatcgatggtgaccggggagctctatgccggttaccaaaaacggagggt 12007

Query: 126    gaacctggtcattggggggacgattaatcagacaggtagcttaccatccgagcagagaaa 185
            |||
Sbjct: 12008  gaaccggtcattggggggacgattaatcagacaggtagcttaccatccggtgcagagaaa 12067

Query: 186    gtcggtgatgaaacgatgctctcacgaattggtcagatggtcgctgatgcacagcgttcg 245
            |||
Sbjct: 12068  gtcggtgatgaaacgatgctctcacgaattggtcagatggtcgctgatgcacagcgttcg 12127

Query: 246    cgggcccccatccagagaatggcgacagcgtttcaggctggtttgttctctggtgata 305
            |||
Sbjct: 12128  cgggcccccatccagagaatggctgacagcgtttcaggctggtttgttctctggtgata 12187

Query: 306    cttatcgcggttgttgctttcgtgatctggtctgtctgggggcccagcccaggatggcg 365
            |||
Sbjct: 12188  cttatcgcggttgttgctttcatgatctggtctgtctgggggcccagcccaggatggcg 12247

Query: 366    cacggtctcattgcggtgtgtcggtcctgattattgcctgtccctgcgcgctgggactg 425
            |||
Sbjct: 12248  cacggtctcattgcggtgtgtcggtcctgattattgcctgtccctgcgcgctggggctg 12307

Query: 426    gccacgccgatgtcgataatggtgggggtgggcaaaggcggccaggccgggggtgtaattc 485
            |||
Sbjct: 12308  gccacgccgatgtcgataatggtgggggtgggcaaaggagccaggccgggggtgtaatt 12367

Query: 486    agaatgccgaagcccttgagcgtcttgaaaaagtg 521
            |||
Sbjct: 12368  aagaatgccgaagcccttgagcgtcttgaaaaagtg 12403

```

Abbildung 36: Vergleich der partiellen Nukleinsäuresequenzen von *silP* von ENAS 373 und pMG101

8.3 Abgeleitete Aminosäuresequenzen der *sil*-Gene

SilS

sp|Q9ZHD4|**SILS**_SATM Probable sensor kinase sils
Length = 497

Score = 417 bits (1073), Expect = e-116
Identities = 237/237 (100%), Positives = 237/237 (100%)

Query: 1 SLSTILAFIAFTWFMLHSVEKHFAEQDVSDLQQISTTLSRILQSPADPDEKKVSKIKESI 60
SLSTILAFIAFTWFMLHSVEKHFAEQDVSDLQQISTTLSRILQSPADPDEKKVSKIKESI

Sbjct: 21 SLSTILAFIAFTWFMLHSVEKHFAEQDVSDLQQISTTLSRILQSPADPDEKKVSKIKESI 80

Query: 61 ASYRNVALLLLNPGEVLYSSAQGAALRPVNSADFSEHSRARDVFLWTVEDTARAMDTG 120
ASYRNVALLLLNPGEVLYSSAQGAALRPVNSADFSEHSRARDVFLWTVEDTARAMDTG

Sbjct: 81 ASYRNVALLLLNPGEVLYSSAQGAALRPVNSADFSEHSRARDVFLWTVEDTARAMDTG 140

Query: 121 SGMKMETYRIIASSGQATFQGGKQNYVMLTGLSINFHLHYLDALKKNLIAIAVVISLLIV 180
SGMKMETYRIIASSGQATFQGGKQNYVMLTGLSINFHLHYLDALKKNLIAIAVVISLLIV

Sbjct: 141 SGMKMETYRIIASSGQATFQGGKQNYVMLTGLSINFHLHYLDALKKNLIAIAVVISLLIV 200

Query: 181 LIIRIAVRQGHLP L RNVSNAIKNITSENLDARLEPTRVPIELEQLVISFNHMIGKIE 237
LIIRIAVRQGHLP L RNVSNAIKNITSENLDARLEPTRVPIELEQLVISFNHMIGKIE

Sbjct: 201 LIIRIAVRQGHLP L RNVSNAIKNITSENLDARLEPTRVPIELEQLVISFNHMIGKIE 257

Abbildung 37: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silS* von ENAS 373 mit pMG101

SilR

sp|Q9ZHD3|**SILR**_SATM Probable transcriptional regulatory protein silR
Length = 228

Score = 323 bits (829), Expect = 1e-88
Identities = 166/171 (97%), Positives = 168/171 (98%)

Query: 1 NGWDI **V**RMLRSAGKMPVLLLTALGTIEHRVKGLELGADDYLVKPF~~F~~AFAELLARVRTLLR 60
NGWDI+RMLRSAGKMPVLLLTALGTIEHRVKGLELGADDYLVKPF~~F~~AFAELLARVRTLLR

Sbjct: 58 NGWDIIRMLRSAGKMPVLLLTALGTIEHRVKGLELGADDYLVKPF~~F~~AFAELLARVRTLLR 117

Query: 61 RGNTMITESQLKVADLSVDLVS~~R~~KVSRAGNRIVLTSKEFS~~L~~LEFF **L**RHQGEVLPRSLIAF 120
RGNTMITESQLKVADLSVDLVS~~R~~KVSRAGNRIVLTSKEFS~~L~~LEFF+RHQGEVLPRSLIAF

Sbjct: 118 RGNTMITESQLKVADLSVDLVS~~R~~KVSRAGNRIVLTSKEFS~~L~~LEFFIRHQGEVLPRSLIAF 177

Query: 121 F **R** **V** **W** **H** EFLTADTNAIDVAVKRLRAKIDNDYGTKL **R** QTVRGVGYMLEIPDA 171
F ~~R~~ ~~V~~ ~~W~~ ~~H~~ EFLTADTNAIDVAVKRLRAKIDNDYGTKL ~~R~~ QTVRGVGYMLEIPDA

Sbjct: 178 FMVWVHEFLTADTNAIDVAVKRLRAKIDNDYGTKLNQTVRGVGYMLEIPDA 228

Abbildung 38: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silR* von ENAS 373 mit pMG101

SilC

sp|Q9ZHD2|**SILC**_SATM Probable outer membrane lipoprotein silC precursor
Length = 461

Score = 243 bits (621), Expect = 8e-64

Identities = 125/126 (99%), Positives = 126/126 (100%)

Query: 1 GWRNFFVDPQVSR LIGEALNNNRDLRMAALKVEEARAQFNVT DADRYPQLNASSGITYNG 60
GWRNFFVDPQVSR LIGEALNNNRDLRMAALKVEEARAQFNVT DADRYPQLNASSGITYNG
Sbjct: 54 GWRNFFVDPQVSR LIGEALNNNRDLRMAALKVEEARAQFNVT DADRYPQLNASSGITYNG 113

Query: 61 GLKGDKPTTQEYDAGLELSYELDFFGK LKNMSEADRQNYFASEEARRAVHILLVSNVSQS 120
GLKGDKPTTQEYDAGLELSYELDFFGK LKNMSEADRQNYFASEEARRAVHILLVSNVSQS
Sbjct: 114 GLKGDKPTTQEYDAGLELSYELDFFGK LKNMSEADRQNYFASEEARRAVHILLVSNVSQS 173

Query: 121 YFNQQL 126
YF+QQL
Sbjct: 174 YFSQQL 179

Abbildung 39: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silC* von ENAS 373 mit pMG101

SilB

sp|Q9ZHD0|**SILB**_SATM Putative membrane fusion protein silB precursor
Length = 430

Score = 106 bits (265), Expect = 1e-23

Identities = 51/52 (98%), Positives = 51/52 (98%)

Query: 1 AYLLKDT SQF **A** ISVPAYPDKTFHVEKWNILPSVDQTTRTLQVRLQVTNKDEF 52
AYLLKDT SQF ISVPAYPDKTFHVEKWNILPSVDQTTRTLQVRLQVTNKDEF
Sbjct: 263 AYLLKDT SQF EISVPAYPDKTFHVEKWNILPSVDQTTRTLQVRLQVTNKDEF 314

sp|Q9ZHD0|**SILB**_SALTY Putative membrane fusion protein silB precursor
Length = 430

Score = 56.6 bits (135), Expect = 2e-07

Identities = 23/26 (88%), Positives = 24/26 (92%)

Query: 1 RMRH **E** **K** **E** NS **I** PAMSEQPVMHSGH 26
RMRH **E** **K** **E** NS+PAMSEQPVMHSGH
Sbjct: 405 RMRHPEKTENSMPAMSEQPVMHSGH 430

Abbildung 40: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silB* von ENAS 373 mit pMG101

SilA

sp|Q9ZHC9|**SIL**A_SATM Putative cation efflux system protein silA
Length = 1048

Score = 84.7 bits (208), Expect = 5e-17
Identities = 39/40 (97%), Positives = 40/40 (99%)

Query: 3 MIEWIIRRSVANRFLVMMGALFLSIWGTWTIINTPVDA**V**P 42
MIEWIIRRSVANRFLVMMGALFLSIWGTWTIINTPVDA+P
Sbjct: 1 MIEWIIRRSVANRFLVMMGALFLSIWGTWTIINTPVDALP 40

sp|Q9ZHC9|**SIL**A_SATM Putative cation efflux system protein silA
Length = 1048

Score = 82.0 bits (201), Expect = 3e-16
Identities = 41/42 (97%), Positives = 41/42 (97%)

Query: 1 SE**M**SRIAAPMIGGMITAPLLSLFIIPAAAYKLIWLRRHKKS**V** 42
SE MSRIAAPMIGGMITAPLLSLFIIPAAAYKLIWLRRHKKS**V**
Sbjct: 1006 SEVMSRIAAPMIGGMITAPLLSLFIIPAAAYKLIWLRRHKKS**V** 1047

Abbildung 41: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silA* von ENAS 373 mit pMG101

ORF105

gb|AAD11752.1| unknown [Salmonella typhimurium]
Length=105

Score = 204 bits (520), Expect = 5e-52
Identities = 101/105 (96%), Positives = 103/105 (98%)

Query 1 MEKDGFEVRTHVMNDQALSALKEK**V**AVPA**E**LRSCHTAV**T**GNLIEGHVPAATIHKAMQSG 60
MEKDGFEVRTHVMNDQALSALKEK+AVPA LRSCHTAV GNLIEGHVPAATIHKAMQSG
Sbjct 1 MEKDGFEVRTHVMNDQALSALKEKHAVPAGLRSCHTAVVGNLIEGHVPAATIHKAMQSG 60

Query 61 SGIYGLATPGMPAGSPGMEGARKEAYDVI**S**FSPGSKKVFQRIE 105
SGIYGLATPGMPAGSPGMEGARKEAYDVI+FSPEGSKKVFQRIE
Sbjct 61 SGIYGLATPGMPAGSPGMEGARKEAYDVIAFSPEGSKKVFQRIE 105

Abbildung 42: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von ORF105 von ENAS 373 mit pMG101

SilP

sp|Q9ZHC7|**SIL**P_SATM Putative cation transporting P-type ATPase
Length = 824

Score = 318 bits (814), Expect = 5e-86
Identities = 168/172 (97%), Positives = 170/172 (98%)

Query: 2 KLRIRPGESIPVDGIVVEGKTTVDESMVTGESMPVTK**E**EGEPVIGGTINQTGSL**I**IRA**E**K 61
KLRIRPGESIPVDGIVVEGKTTVDESMVTGESMPVTK EGEPVIGGTINQTGSL IRA**E**K
Sbjct: 334 KLRIRPGESIPVDGIVVEGKTTVDESMVTGESMPVTKTEGEPVIGGTINQTGSLIIRA**E**K 393

Query: 62 VGDETMLSRIVQMVADAQRSRAPIQRMADSVSGWFVPLVILIAVVA**F**IWSVWGPEPRMA 121
VGDETMLSRIVQMVADAQRSRAPIQRMADSVSGWFVPLVILIAVVA**F**+IWSVWGPEPRMA
Sbjct: 394 VGDETMLSRIVQMVADAQRSRAPIQRMADSVSGWFVPLVILIAVVA**F**MIWSVWGPEPRMA 453

Query: 122 HGLIAAVSVLIIACPCALGLATPMSIMVGVGKGAQAGVLI**R**NAEALERLEKV 173
HGLIAAVSVLIIACPCALGLATPMSIMVGVGKGAQAGVLI+NAEALERLEKV
Sbjct: 454 HGLIAAVSVLIIACPCALGLATPMSIMVGVGKGAQAGVLIKNAEALERLEKV 505

Abbildung 43: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *silP* von ENAS 373 mit pMG101

8.4 Klinische Studienstämme

Tabelle 24: Alle verwendeten klinischen Isolate

Stamm-nr.	Material	Station	Genogruppe
1	Respirationstrakt	G21	VIII
5	Respirationstrakt	G9B	VI
6	Respirationstrakt	G5	VIII
8	Abdomen	H7	VIII
18¹	Gastrointestinaltrakt	F7	VI
19	Urogenitaltrakt	FrauenPoli	IV
24	Abdomen	H5	ENKO (II)
30	Respirationstrakt	G9B	VIII
32	Plastik	G7	VIII
40	Respirationstrakt	H8	VIII
89	Plastik	F10	ENCL (XI)
90	Respirationstrakt	H7	ENCL (XI)
114	Respirationstrakt	F0	III
116	Gastrointestinaltrakt	Chir.Poli A	III
117	Gastrointestinaltrakt	F6A	IV
118	Respirationstrakt	F9	III
119	Urogenitaltrakt	G10	V
124	Urogenitaltrakt	G21	V
128	Gastrointestinaltrakt	M21	V
130	Respirationstrakt	G3	III
131	Wunde/Abstrich	Strahlentherapie	VIII
157	Plastik	H21	VIII
158	Respirationstrakt	F8	III
165	Pleura	G5	III
167	Plastik	K22A	III
169	Plastik	H6	VIII
171	Respirationstrakt	H3A	ENKO (II)
173	Respirationstrakt	I22A	ENAS (I)
174	Wunde/Abstrich	G22B	VIII
176	Respirationstrakt	H2	ENKO (II)
179	Respirationstrakt	F0	ENAS (I)
180	Respirationstrakt	H11	III
181	Gastrointestinaltrakt	F6A	ENKO (II)
186	Respirationstrakt	F4	VIII
187	Respirationstrakt	HCI	V
189	Respirationstrakt	H3A	IV
190	Respirationstrakt	I2	VI
191	Respirationstrakt	I2	III
192	Respirationstrakt	G10	VIII
193	Wunde/Abstrich	I2	VIII
194	Respirationstrakt	G9B	VIII
195	Respirationstrakt	F11	ENAS (I)
196	Respirationstrakt	HCI	IV
197	Respirationstrakt	K21	xiii
198	Respirationstrakt	H22A	III
199	Respirationstrakt	F3	VIII
200	Urogenitaltrakt	FRSA	III
202	Respirationstrakt	HCI	IV
203	Wunde/Abstrich	Chir. Poli	VIII
204	Respirationstrakt	F4	III
205	Wunde/Abstrich	G6	VIII
208	Respirationstrakt	K21	ENAS (I)
210	Respirationstrakt	G10	VI
211	Urogenitaltrakt	FrauenPoli	III

212	Respirationstrakt	M21	ENKO (II)
213	Respirationstrakt	H3A	III
216	Urogenitaltrakt	I10B	III
217	Urogenitaltrakt	F7	III
218	Wunde/Abstrich	I6	VI
219	Wunde/Abstrich	I11B	VIII
220	Wunde/Abstrich	I9A	ENKO (II)
221	Respirationstrakt	H22A	VIII
223	Plastik	I10B	VIII
224	Respirationstrakt	H2	VIII
225	Respirationstrakt	G9A	VIII
226	Respirationstrakt	G9B	VIII
228	Urogenitaltrakt	G4	VIII
229	Urogenitaltrakt	I21A	VIII
230	Gastrointestinaltrakt	M21	VIII
231	Respirationstrakt	H5A	VIII
232	Respirationstrakt	G9A	VI
233	Respirationstrakt	H3B	VIII
235	Respirationstrakt	G10	ENAS (I)
236	Blutkultur	I3	IV
237	Pleura	G5	III
239	Respirationstrakt	F2A	ENKO (II)
240	Respirationstrakt	F4	xiii
241	Respirationstrakt	I10B	ENKO (II)
242	Wunde/Abstrich	G0	III
243	Plastik	F2B	V
244	Abdomen	K21	III
245	Gastrointestinaltrakt	M21	V
246	Urogenitaltrakt	K21	VIII
247	Wunde/Abstrich	H10	VIII
248	Respirationstrakt	F10	VI
250	Respirationstrakt	F7	V
251	Respirationstrakt	H3A	VIII
252	Urogenitaltrakt	H4	VIII
253	Wunde/Abstrich	G7	III
254	Respirationstrakt	G10	III
255	Urogenitaltrakt	Nothilfe	III
256²	Respirationstrakt	K21	ENKO (II)
260	Respirationstrakt	I7	VI
261	Respirationstrakt	K22B	III
265	Wunde/Abstrich	I7	VIII
266	Abdomen	G5	III
267	Blutkultur	F21	VIII
268	Blutkultur	G10	III
269	Blutkultur	G10	III
277	Blutkultur	H3A	VI
282	Urogenitaltrakt	F10	IV
284	Blutkultur	G3	VIII
294	Wunde/Abstrich	Chir. Poli	VIII
295	Gastrointestinaltrakt	F21	V
296	Respirationstrakt	F2B	VIII
297	Respirationstrakt	F2B	IV
299	Urogenitaltrakt	F3	ENAS (I)
300	Gastrointestinaltrakt	L21	ENAS (I)
301	Respirationstrakt	HCI	VIII
411	Blutkultur	G5	VI
412	Blutkultur	F10	VI
413	Blutkultur	F7	V
414	Blutkultur	G5	VI
415	Blutkultur	G10	ENKO (II)
416	Blutkultur	G21	VIII

418	Blutkultur	F7	III
419	Blutkultur	F2B	III
420	Blutkultur	K22B	IV
421	Blutkultur	G5	VI
422	Blutkultur	F21	III
423	Blutkultur	G5	VI
424	Blutkultur	G5	VIII
425	Blutkultur	G10	III
426	Blutkultur	H2	IX
427	Blutkultur	G4	III
428	Blutkultur	H3A	V
430	Blutkultur	H5	xiii
431	Blutkultur	K21	VIII
432	Blutkultur	K21	VIII
433	Blutkultur	H3A	VIII
434	Blutkultur	F9	III
435	Blutkultur	G5	VIII
436	Blutkultur	H3A	VI
437	Blutkultur	F9	V
438	Blutkultur	G5	VIII
439	Blutkultur	K21	VI
440	Blutkultur	F8	III
441	Blutkultur	L21	V
442	Blutkultur	H6	VI
443	Blutkultur	H3A	IV
444	Blutkultur	F3	III
445	Blutkultur	K21	VIII
446	Blutkultur	G4	VIII
447	Blutkultur	F8	IV
448	Blutkultur	K21	VIII
449	Blutkultur	H21	(ENHO) VII
450	Blutkultur	F7	III
451	Blutkultur	K22A	VIII
452	Blutkultur	M21	III
453	Blutkultur	F8	III
454	Blutkultur	H2	III
455	Blutkultur	G5	xiii
456	Blutkultur	F8	III
457	Blutkultur	F8	VIII
458	Blutkultur	G7	V
459	Blutkultur	F2A	III
460	Blutkultur	G5	VIII
461	Blutkultur	H22A	IV
462	Blutkultur	L21	V
463	Blutkultur	H2	V
464	Blutkultur	K21	III
465	Blutkultur	K21	VI
533	Abdomen	K21	IV
535	Wunde/Abstrich	G8B	III
536	Abdomen	G5	ENKO (II)
537	Wunde/Abstrich	G2	VIII
538	Gastrointestinaltrakt	M21	III
539	Respirationstrakt	H3B	ENAS (I)
542	Blutkultur	H5A	VIII
543	Blutkultur	H5A	III
544	Blutkultur	H5A	ENDI (XII)
567	Urogenitaltrakt	G3	V
569	Wunde/Abstrich	K22B	xiii
570	Blutkultur	G5	III
571	Blutkultur	G5	III
572	Urogenitaltrakt	H5	VIII

573	Blutkultur	KM-Transplantation	IX
575	Respirationstrakt	H3B	ENAS (I)
576	Respirationstrakt	I10B	III
584	Plastik	H3A	VIII
585	Gastrointestinaltrakt	I10A	V
587	Urogenitaltrakt	H8A	VIII
589	Urogenitaltrakt	G9A	VIII
591	Abdomen	H5A	IV
594	Wunde/Abstrich	I11A	III
595	Wunde/Abstrich	ChirPoli B	VIII
598	Gastrointestinaltrakt	G10A	V
600	Urogenitaltrakt	H4	ENCL (XI)
601	Blutkultur	F10A	ENCL (XI)
602	Respirationstrakt	I10B	VIII
603	Respirationstrakt	H3A	VIII
604	Urogenitaltrakt	M21	xiii
605	Blutkultur	F2A	ENCL (XI)
606	Urogenitaltrakt	F2A	VIII
607	Gastrointestinaltrakt	G10A	III
650	Abdomen	G5	IV
EN18	Gastrointestinaltrakt	München, Deutschland	VI
EN25	Blutkultur	München, Deutschland	IX
EN28	Blutkultur	München, Deutschland	xiii
EN30	Respirationstrakt	München, Deutschland	VIII
EN114	Respirationstrakt	München, Deutschland	III
EN117	Gastrointestinaltrakt	München, Deutschland	IV
EN119	Urogenitaltrakt	München, Deutschland	V
EN363	Wunde/Abstrich	Lausanne, Schweiz	IX
EN364	Wunde/Abstrich	Lausanne, Schweiz	IX
EN520	Respirationstrakt	Freiburg, Deutschland	IX
EN524	Blutkultur	Heidelberg, Deutschland	IX

¹ **Kontrollstamm der ERIC-PCR**

² **Kontrollstamm der REP-PCR**

9 Danksagung

Sie vorliegende Arbeit wurde von September 2002 bis Februar 2006 am Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dipl. Chem. J. Heesemann) erstellt.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die freundliche Aufnahme am Max-von-Pettenkofer-Institut, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Gelegenheit meine Arbeit im Rahmen der Arbeitsgruppenvorstellung zu präsentieren sowie seine Anregungen und Ratschläge.

Herrn PD Dr. Andreas Roggenkamp, der als Leiter der Außenstelle Großhadern mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und oft einfache Lösungen zu großen Problemen lieferte.

Herrn Dr. Harald Hoffmann, dem ich die wesentlichen Grundlagen wissenschaftlichen Denkens, die ich in Zusammenarbeit mit ihm in einzigartiger Atmosphäre erlernen durfte, verdanke. Seine Begeisterungsfähigkeit und sein persönliches Engagement verhalfen nicht selten in ausweglosen Situationen zu neuer Motivation und Freude am experimentellen Arbeiten. Für seine fortwährende Unterstützung und seine Geduld möchte ich ihm ganz besonders danken.

Frau Dipl. Biol. Johanna Sorsa für ihre Unterstützung bei der Subtraktiven Hybridisierung und ihre hilfreichen Tipps.

Herrn Peter Pfaller für seine immer nette, prompte und zuverlässige Hilfe bei allen EDV-Problemen.

Den äußerst hilfsbereiten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer-Instituts, insbesondere Frau Dr. Beatrix Grabein, Frau Gisela Anding, Frau Gudrun Maindok, für die Hilfe und Unterstützung während der Laborarbeit.

Meiner langjährigen Freundin Beate Kinzel für das geduldige Korrekturlesen und ihre wertvollen Ratschläge.

Meinem Laborkollegen Max Tiller für die immer fröhliche Stimmung und das nette Arbeitsklima.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester für den Rückhalt in der Familie und die fortwährende Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Durchführung der Promotion.

10 Lebenslauf

- Name: Anita N. Stumpf
- Geburtsdatum: 28. August 1980
- Geburtsort: München
- Schulausbildung: 1986 - 1990: Montessori Grundschule, München
1990 - 1999: Theresien - Gymnasium, München
- Schulabschluss: Abitur Juni 1999
- Studium: 1999 - 2006: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- praktisches Jahr:*
- I. Tertial - Viszeral- und Thoraxchirurgie
Klinikum Großhadern
Ludwig - Maximilians Universität München
- II. Tertial - Innere Medizin
Massachusetts General Hospital und
Brigham's and Women Hospital
Harvard Medical School, Boston, USA
- III. Tertial - Neurologie
Kantonsspital Aarau
Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz
- Berufliche Tätigkeit: 06/2006 - 08/2007: Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik 3 (Hämato-Onkologie), Klinikum Großhadern, LMU München
Seit September 2007: Forschungsaufenthalt am Department of Experimental Hematology, LUMC, University of Leiden, Niederlande
- Auszeichnungen: Stipendiatin des PJ-Programms 2005 der Munich-Harvard Alliance
Stipendiatin der Hans-Rudolf Stiftung (10/03 - 09/06)

Publikationen:

- Kongresspräsentationen:

Anita Stumpf, Harald Hoffmann, Andreas Roggenkamp

„Clinical relevance of the different genogroups within the *Enterobacter cloacae*-complex“ beim jährlichen Treffen der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie) 2003, in Dresden

Anita Stumpf, Harald Hoffmann, Andreas Roggenkamp

„*Salmonella*-like sil-operon renders high level silver resistance to certain phylogenetic lineages of the *Enterobacter cloacae* complex“ beim jährlichen Treffen der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie) 2004, in Münster

- Originalarbeiten:

Harald Hoffmann, Sibylle Stindl, Anita Stumpf, Andre Mehlen, Daniel Monget, Jürgen Heesemann, Karl H. Schleifer, Andreas Roggenkamp

“Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance” Syst Appl Microbiol. 28 (2005) 206-212

Harald Hoffmann, Sibylle Stindl, Wolfgang Ludwig, Anita Stumpf, Andre Mehlen, Jürgen Heesemann, Daniel Monget, Karl H. Schleifer, Andreas Roggenkamp

“Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*.” Syst Appl Microbiol. 28 (2005) 196-205

Harald Hoffmann, Sibylle Stindl, Wolfgang Ludwig, Anita Stumpf, Andre Mehlen, Daniel Monget, Denis Pierard, Stefan Ziesing, Jürgen Heesemann, Andreas Roggenkamp, Karl H. Schleifer

“*Enterobacter hormaechei* subspecies *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subspecies *hormaechei* subsp. nov. and *E. hormaechei* subspecies *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance.“ J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3297-303

Anita Stumpf, Andreas Roggenkamp, Harald Hoffmann

“Specificity of ERIC- and REP-PCR for the detection of clonality within the *Enterobacter cloacae* complex” Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Sep;53 (1):9-16

Harald Hoffmann, Sabine Schmoldt, Konrad Trülzsch, Anita Stumpf, Stefan Bengsch, Thomas Blankenstein, Jürgen Heesemann, Andreas Roggenkamp

“Nosocomial urosepsis caused by *Enterobacter kobei* with aberrant phenotype.” Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Oct;53(2):143-7