

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch-

**Partielle 16S rDNA-Sequenzanalyse zur Identifizierung von  
Pseudomonaden und anderen medizinisch relevanten Nonfermentern**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Mareike Siebeneck, geb. Schnier  
aus Herford

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhems-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 04. 2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Helge Karch-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch

### **Zusammenfassung**

#### **Partielle 16S rDNA-Sequenzierung zur Identifizierung von Pseudomonaden und anderen medizinisch relevanten Nonfermentern**

Siebeneck, geb. Schnier, Mareike

Pseudomonaden und andere Nonfermenter (NF) sind vor allem bei immunsupprimierten Patienten häufige Erreger nosokomialer Infektionen. Aufgrund ihrer geringen biochemischen Reaktivität und variierender Morphologie bereiten diese Erreger häufig Schwierigkeiten in der konventionellen phänotypischen Diagnostik.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb für die NF-Identifizierung die kulturunabhängige partielle 16S rDNA-Gensequenzierung untersucht.

Es wurde die 5'-Region der 16S ribosomalen DNA (*E. coli* Position 54 bis 510) sequenziert und eine Referenzsequenzdatenbank basierend auf insgesamt 76 *Pseudomonas*-Spezies und 48 humanmedizinisch relevanten NF-Spezies im Rahmen des Ribosomal Identification of Micro-organisms (RIDOM)-Projektes etabliert. Anschließend wurde diese Referenzdatenbank mit GenBank und der kommerziellen MicroSeq 500-Datenbank verglichen.

Alle 124 Spezies ließen sich sequenzieren und ergaben Sequenzen von 400 bis 459 bp Länge. 104 der 124 (83,9 %) Spezies ließen sich eindeutig anhand ihrer 16S rDNA-Sequenz identifizieren. In 76 % stimmten die Ergebnisse der RIDOM-Datenbank mit MicroSeq 500 überein.

Die GenBank BLAST-Suche ergab nur für 16,5 % ein eindeutiges und identisches Ergebnis, weshalb diese öffentliche Datenbank nur bedingt zur Identifizierung von Nonfermentern geeignet ist.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die partielle 16S rDNA-Sequenzierung in den meisten Fällen eine eindeutige kulturunabhängige Identifizierung von Nonfermentern ermöglicht. Für die übrigen Spezies können in einem zukünftigen Identifizierungsalgorithmus zusätzliche genetische Zielregionen integriert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 04. 2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1. 1	Historischer Abriss zum Genus <i>Pseudomonas</i> .....	1
1. 2. 1	Eigenschaften der Pseudomonaden .....	2
1. 2. 2	Bedeutung der Pseudomonaden .....	2
1. 2. 3	Klinische Bedeutung am Beispiel von CF-Patienten .....	3
1. 3	Bedeutung der genauen Speziesidentifizierung .....	3
1. 4	Konventionelle phänotypische diagnostische Verfahren .....	3
1. 5	Sequenzierungsverfahren .....	4
1. 6	Bestehende Datenbanken .....	4
1. 7	Das RIDOM-Projekt .....	5
1. 8	Ziel dieser Arbeit .....	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	6
<b>2. 1</b>	<b>Material</b> .....	6
2. 1. 1	Spezielle Geräte .....	6
2. 1. 2	Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	6
2. 1. 3	Enzyme .....	7
2. 1. 4	Synthetische Oligonukleotide .....	7
2. 1. 5	Nährmedien .....	7
2. 1. 6	Bakterienstämme .....	8
2. 1. 7	Verwendete Software .....	11
<b>2. 2</b>	<b>Methoden</b> .....	12
2. 2. 1	Anzucht der Referenzstämme .....	12
2. 2. 2	Molekularbiologische Methodik .....	12
2. 2. 2. 1	DNA-Extraktion .....	12
2. 2. 2. 2	5' 16S-rDNA PCR .....	13
2. 2. 2. 3	Aufreinigung des PCR-Produktes .....	13
2. 2. 2. 4	Gelelektrophorese .....	14
2. 2. 2. 5	Sequenzierungs-Reaktion .....	14
2. 2. 2. 6	Sephadexaufreinigung .....	14
2. 2. 2. 7	Automatisierte Sequenzierung mit dem <i>ABI Prism 3100 Avant Genetic</i>	

	<i>Analyzer</i> .....	15
2. 2. 3	Auswertung der Sequenzdaten .....	15
2. 2. 4	GenBank-Sequenzevaluierung .....	16
2. 2. 5	Datensammlung für das RIDOM-Projekt .....	16
2. 2. 6	Literaturrecherche .....	16
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
3. 1. 1	Vergleichende Sequenzanalyse .....	17
3. 1. 2	Ähnlichkeitslevel .....	21
3. 1. 3	MicroSeq-Sequenzevaluierung .....	22
3. 1. 4	GenBank-Sequenzevaluierung .....	24
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>26</b>
4. 1	Diese Arbeit .....	26
4. 2	Die besondere Eignung der Sequenzierungsverfahren .....	26
4. 3	Bedeutung von qualitätskontrollierten Referenzdatenbanken .....	28
4. 3. 1	Bestehende Datenbanken .....	28
4. 3. 2	MicroSeq .....	29
4. 3. 3	RIDOM-Projekt .....	30
4. 4	Klinische Bedeutung der genauen Speziesbestimmung von Nonfermentern .....	31
4. 5	Konventionelle phänotypische diagnostische Verfahren .....	32
4. 6	Einschränkungen des Verfahrens .....	33
4. 7	Zukünftiger Stellenwert .....	35
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>51</b>

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

### Tabellen

<b>Tab. 1. 1</b>	Liste der mittels 16S rDNA analysierten <i>Pseudomonas</i> -Stammsammlungsstämme .....	9
<b>Tab. 1. 2</b>	Liste der Nicht- <i>Pseudomonas</i> -Stammsammlungsstämme .....	10
<b>Tab. 1. 3</b>	Mittels 16S rDNA untersuchte Genomovare des <i>Burkholderia cepacia</i> -Komplexes .....	11
<b>Tab. 2</b>	Aufstellung der aus GenBank übernommenen Sequenzen .....	18
<b>Tab. 3</b>	Aufstellung der Nonfermenter mit identischen 16S rDNA-Sequenzen .....	21

### Abbildungen

<b>Abb. 1</b>	Neighbour-joining Tree basierend auf partiellen <i>Pseudomonas</i> -16S rDNA-Sequenzen .....	20
---------------	--	----

# 1 Einleitung

*Pseudomonas aeruginosa* und andere Spezies dieser Gattung sowie einige Nonfermenter sind als häufige Erreger nosokomialer Infektionen bekannt (39, 53, 63). Für einige Patientenkollektive, insbesondere Immunsupprimierte (1, 86) und Patienten, die unter Cystischer Fibrose (CF) leiden (49), stellen diese Keime zudem eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität dar (49).

## 1.1 Historischer Abriss zum Genus *Pseudomonas*

Der Begriff „*Pseudomonas*“ (ψευδος = Lüge, Unwahrheit; μονάς = Einheit, Urkörperchen) wurde 1894 von Migula (68) für alle geraden, stäbchenförmigen Bakterien mit polaren Bewegungsorganellen eingeführt. Diese Definition war jedoch so vage, dass das Genus *Pseudomonas* bald 150 Spezies umfasste, wobei es sich größtenteils um schlecht charakterisierbare, bewegliche Mikroben handelte. Erst verbesserte Techniken der Geißeldarstellung, Einsicht in die taxonomische Bedeutung bestimmter physiologischer Merkmale und molekularbiologische Untersuchungsverfahren führten zur Präzisierung der Gattungsbeschreibung und durch Reklassifizierungen zur Reduktion der Speziesanzahl (73). Aufgrund der Erkenntnisse aus rRNA – DNA Hybridisierungen teilten Palleroni *et al.* das Genus in fünf rRNA-Gruppen ein (75) und beschränkten den Begriff *Pseudomonas* sensu stricto auf die zur  $\gamma$ -Subklasse der Proteobakterien gehörende (108) rRNA-Gruppe I. Die Spezies der anderen vier rRNA-Gruppen sind neuen oder bereits bestehenden Genera wie *Acidovorax* (105), *Brevundimonas* (84), *Burkholderia* (112), *Delftia* (103), *Herbaspirillum* (4), *Ralstonia* (113), *Stenotrophomonas* (74) und *Sphingomonas* (114) zugeordnet worden, die zusammen mit den Pseudomonaden und anderen Genera, bedingt durch die Unfähigkeit, Lactose zu fermentieren, heute als Nonfermenter bezeichnet werden. Neuere Verfahren wie die phylogenetische 16S rDNA-Analyse haben viele Spezies als Pseudomonaden sensu stricto bestätigt und stellen andere in dieser Position in Frage (3, 57), was zukünftige Reklassifizierungen mit sich bringen wird.

### **1. 2. 1 Eigenschaften der Pseudomonaden**

Grundsätzlich handelt es sich bei Pseudomonaden um nichtsporenbildende, gramnegative Bakterien, die ihren Kohlenstoff- und Energiebedarf durch oxidativen Abbau organischer Verbindungen decken. Ihre Ansprüche an Kulturbedingungen und Nährstoffangebot sind gering: Sie wachsen auf Universalnährböden mit neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert bevorzugt bei 30 – 37°C (70).

### **1. 2. 2 Bedeutung der Pseudomonaden**

Weltweit sind Pseudomonaden als ubiquitäre Wasser-, Boden- und Oberflächen-Saprophyten in der Natur anzutreffen. Etliche Spezies spielen bei der Remineralisierung toter organischer Substanz eine wichtige Rolle und können die für die Umwelt besonders problematischen aromatischen Ringverbindungen spalten und damit metabolisieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Kohlenstoffhaushalt der Natur und haben deshalb das Interesse der Molekularbiologen und Biotechnologen auf sich gezogen (57). Neben diesen nützlichen Funktionen der Pseudomonaden sind diverse Spezies des Genus in ökonomischer und medizinischer Hinsicht als Lebensmittelverderber und Krankheitserreger bzw. opportunistische Erreger von Nutzpflanzen, Tieren und Menschen bekannt (72). Als opportunistische Erreger stellen sie eine besondere Gefahr für Immunsupprimierte und CF-Patienten dar – speziell wenn sie nosokomial erworben wurden (1, 49, 86). Die Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps.*) wird zudem als transiente Flora bei Gesunden gefunden. Nicht-nosokomiale *Pseudomonas*-Infektionen bei immunkompetenten Personen entstehen vorwiegend durch Kontakt mit kontaminiertem Wasser und anderen Flüssigkeiten und sind in ihrer Ausdehnung meistens lokalisiert. Bekannt ist das „swimmer’s ear“, eine oberflächliche Infektion, die gehäuft bei Wassersportlern auftritt, oder die *Pseudomonas*-bedingte Follikulitis. Das Spektrum der durch Pseudomonaden verursachten Infektionen reicht somit von oberflächlichen Hautinfektionen bis zur fulminanten Sepsis.

### **1. 2. 3 Klinische Bedeutung am Beispiel von CF-Patienten**

Spezielle Relevanz erlangt dieser Keim wie auch andere Nonfermenter im Kollektiv der CF-Patienten: *Ps. aeruginosa* wird bei 60 % aller CF-Patienten in den Atemwegen nachgewiesen; im Erwachsenenalter steigt sein Anteil sogar auf bis zu 80 % (69). Unter den Nonfermentern werden auch für *Burkholderia cepacia*-Komplex-Bakterien, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Alcaligenes xylosoxidans* Prävalenzraten bei CF-Patienten zwischen 1 und 10 % beschrieben (23). Daten einer großen Multicenterstudie besagen, dass die Prävalenz dieser Bakterien sogar noch höher liegen könnte, da sie schwer zu isolieren und zu identifizieren sind (10). Mehr als ein Drittel dieser Patienten haben zumindest eine jährliche pulmonale Exazerbation ihrer Grunderkrankung, die zu einer durchschnittlichen Hospitalisierungsphase von zehn Tagen führt (8).

### **1. 3 Bedeutung der genauen Spezies-Identifizierung**

Insbesondere bei CF-Patienten ist die sichere und genaue Speziesidentifizierung von größter Wichtigkeit, da sich deutliche prognostische Unterschiede hinsichtlich Morbidität und Mortalität ergeben (50, 93). Gegebenenfalls müssen hier Maßnahmen der Infektionskontrolle (14) und Segregationsverfahren (88) wegen der Übertragung durch soziale Kontakte (14, 48, 61, 92) eingeleitet werden. Nicht zuletzt werden geeignete gezielte Therapien aufgrund unterschiedlicher intrinsischer Antibiotikaresistenzen erforderlich (59).

### **1. 4 Konventionelle phänotypische diagnostische Verfahren**

In der mikrobiologischen Routinediagnostik werden zur Identifizierung phänotypische Systeme wie Api, NE, Vitek und die klassische Bunte Reihe eingesetzt. Viele Erreger aus der Gruppe der Nonfermenter, speziell wenn sie von CF-Patienten isoliert wurden, können allerdings mit den herkömmlichen phänotypischen mikrobiologischen Methoden nicht oder nur mit großem Aufwand richtig identifiziert werden (65). Schwierigkeiten entstehen aufgrund der Tatsache, dass sie die klassischen metabolischen und strukturellen Merkmale, die gewöhnlich zu ihrer Identifikation herangezogen werden, verloren haben (32, 58).

## **1. 5 Sequenzierungsverfahren**

Seit den achtziger Jahren werden mit der Entwicklung von PCR-Techniken zunehmend molekulare Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen eingesetzt. Im Allgemeinen erfordern sie ein dreistufiges Vorgehen, das aus DNA-Extraktion, *in vitro*-Amplifikation und Charakterisierung der Amplifikate besteht. Heute erfolgt die Anwendung dieser Technik primär bei Erregern, die nur langsam wachsen, schwierig oder aufwändig zu identifizieren sind oder bei Keimen, die eine potentielle Gefährdung für das Laborpersonal darstellen wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis* (2, 107). Eines der molekularen Verfahren ist die vergleichende DNA-Sequenzanalyse, bei der ein genau festgelegter DNA-Sequenzbereich des Genoms eines unbekanntes Mikroorganismus bestimmt und mit einer ausreichend großen Anzahl von Referenzsequenzen verglichen wird. Die Referenzsequenz, die die größte Übereinstimmung mit der untersuchten Sequenz zeigt, weist im Idealfall auf das zutreffende Taxon hin. Eine der Zielregion der Sequenzanalyse ist das für die 16S Untereinheit der ribosomalen RNA kodierende Gen (16S rDNA), das sich bereits bei vielen Organismen für die Identifizierung bewährt hat (42).

## **1. 6 Bestehende Datenbanken**

Um die beschriebene Methodik breitgefächert anwenden zu können, sind entsprechende Referenzdatenbanken nötig. Bereits bestehende öffentliche Datenbanken mit 16S rDNA-Sequenzeinträgen, wie GenBank und RDP, sind unter dem Gesichtspunkt der Identifizierung medizinisch relevanter Keime häufig nicht ausreichend. Die meisten Sequenzen wurden hier unter phylogenetischen Gesichtspunkten bestimmt, sodass wichtige humanpathogene Spezies fehlen. Außerdem sind viele Sequenzen bedingt durch ihr Alter noch mit fehlerträchtigen Techniken ermittelt worden und es existieren teilweise erheblich differierende Doppeleintragungen. Unzulänglichkeiten öffentlicher Datenbanken führten deshalb zur Entwicklung privater und kommerzieller Sequenzdatenbanken wie der amerikanischen MicroSeq-Datenbank (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## **1.7 Das RIDOM-Projekt**

So ist 1999 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit dem Würzburger Lehrstuhl für Informatik II das Projekt zur „Ribosomal Differentiation of Micro-organisms“ (RIDOM) ins Leben gerufen worden (45). Kernstück ist die qualitätskontrollierte Referenzdatenbank medizinisch relevanter Erreger, in die nur Sequenzen gut charakterisierter Stammsammlungsstämme aufgenommen werden.

Die Datenbank präsentiert als Ergebnis des Sequenzvergleichs das Taxon, das die größte Übereinstimmung mit den Sequenzdaten des unbekanntes Erregers aufweist. Ferner hat der Nutzer Zugriff auf weiterführende Spezies-spezifische Informationen und erhält „Links“ zu anderen medizinischen Internet-Datenbanken.

## **1.8 Ziel dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierbarkeit innerhalb des Genus *Pseudomonas* und aufgrund ihrer humanmedizinischen Relevanz ausgewählter anderer Nonfermenter durch vergleichende Sequenzanalyse der partiellen 5' 16S rDNA untersucht. Dazu wurden die ribosomalen Genomabschnitte der Typ- und Referenzstämme sequenziert, gegen MicroSeq 500 und GenBank evaluiert und zusammen mit taxonspezifischen Informationen in die RIDOM-Datenbank integriert. Ziel ist es, dieses Verfahren als Bestandteil eines diagnostischen Algorithmus zu etablieren, an dessen Ende die eindeutige Identifikation des klinischen Isolates stehen soll.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Es wurden Standardgeräte, -chemikalien und -materialien (Glas- und Plastikwaren) der Firmen Abgene (Genf, Schweiz), Applied Biosystems (Darmstadt und Foster City, Ca, USA), Biometra (Göttingen), BioRad-Laboratories (München), Biozym (Wien, Österreich), Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Flacht), Heidolph (Schwabach), Heraeus (Hanau), Herolab (Wiesloch), Kreutz (Reiskirchen), Kirsch (Offenburg), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Osterode am Harz) verwendet.

Spezielle Materialien und Geräte, insbesondere für die molekularbiologischen Versuche, werden im Folgenden mit der jeweiligen Bezugsfirma aufgeführt.

#### **2.1.1 Spezielle Geräte**

ABI Prism 3100Avant Genetic Analyzer: Applied Biosystems, Darmstadt  
Thermocycler T1, Software Vers. 4.16: Biometra, Göttingen

#### **2.1.2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Abi Prism Big Dye <sup>TM</sup> Terminator v.3.0 Reaction Cycle Sequencing Standard Kit:  
Applied Biosystems  
Centrisep Spin Columns: Applied Biosystems  
HPLC: LiChrosolv® (Wasser für die Chromatographie): Merck KGaA, Darmstadt  
Sephadex G-50 Superfine: Amersham, Uppsala, Schweden

### 2. 1. 3 Enzyme

AmpliTaq DNA Polymerase: Applied Biosystems

Exonuclease I (*E. coli*): New England Biolabs, Frankfurt am Main

Lysozym-Lösung (=Muraminidase): Merck KGaA

Taq-Polymerase (AmpliTaq DNA-Polymerase): Applied Biosystems

Proteinase K: Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

### 2. 1. 4 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bezogen.

16S-PCR und Sequenzierung:

16S-27f      5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTG AG – 3'  
(8- 27 16S rDNA)

16S-519r     5' – GWA TTA CCG CGG CKG CTG - 3'  
(536- 519 16S rDNA)

16S-907r     5' – CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT - 3'  
(926- 907 16S rDNA)

In Klammern: “Annealing Position” des Primers bezogen auf *E. coli*-Position der 16S rDNA.

### 2. 1. 5 Nährmedien

Columbia-Blut-Agar-Platten, Caso-Agar-Platten und Müller-Hinton-Agar mit 2% NaCl:

Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg

TSB-Bouillon: Eigenherstellung in der Nährbodenküche des Institutes für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster

### 2. 1. 6 Bakterienstämme

Insgesamt wurden 76 Stämme des Genus *Pseudomonas* und 48 Nonfermenter inklusive der neun Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplexes untersucht. Sequenziert wurden 76 der am 18. Februar 2004 gemäß Bacterial Nomenclature up to date (URL: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>) valide beschriebenen 102 Pseudomonaden.

Unter Ausnahme von 3 Bakterien waren alle Pseudomonaden Typstämme. Unter den 48 Nonfermentern befanden sich 39 Typstämme.

Die Bakterienstämme wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, vom belgischen Laboratorium voor Microbiologie, Rijksuniversiteit Gent, Gent, Belgien (LMG) und dem der französischen Collection des Bacteries de l'institut Pasteur (CIP) in Paris bezogen. Die Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplexes entstammen der Sammlung des Institutes für medizinische Mikrobiologie in Münster.

In Tabelle 1.1 sind die mittels 5' 16S rDNA-Sequenzierung untersuchten *Pseudomonas*-Stämme, in Tabelle 1.2 die untersuchten Nonfermenter-Stämme aufgeführt.

Tab. 1.1 Liste der mittels 16S rDNA analysierten *Pseudomonas*-  
Stammsammlungsstämme

Spezies	Stamm*	Spezies	Stamm*
<i>abietaniphila</i>	CIP 106703 <sup>T</sup>	<i>kilonensis</i>	DSM 13647 <sup>T</sup>
<i>aeruginosa</i>	DSM 50071 <sup>T</sup>	<i>lanceolata</i>	CIP 103297 <sup>T</sup>
<i>agarici</i>	DSM 11810 <sup>T</sup>	<i>libanensis</i>	CIP 105460 <sup>T</sup>
<i>alcaligenes</i>	DSM 50342 <sup>T</sup>	<i>lundensis</i>	DSM 6252 <sup>T</sup>
<i>anguilliseptica</i>	DSM 12111 <sup>T</sup>	<i>luteola</i>	DSM 6975 <sup>T</sup>
<i>asplenii</i>	LMG 2137	<i>mandelii</i>	CIP 105273 <sup>T</sup>
<i>aurantiaca</i>	CIP 106718 <sup>T</sup>	<i>marginalis</i>	DSM 13124 <sup>T</sup>
<i>avellanae</i>	DSM 11809 <sup>T</sup>	<i>mendocina</i>	DSM 50017 <sup>T</sup>
<i>azotoformans</i>	CIP 106744 <sup>T</sup>	<i>mephitica</i>	CIP 106720 <sup>T</sup>
<i>balearica</i>	DSM 6083 <sup>T</sup>	<i>migulae</i>	CIP 105470 <sup>T</sup>
<i>beijerinckii</i>	DSM 7218 <sup>T</sup>	<i>monteilii</i>	DSM 14164 <sup>T</sup>
<i>beteli</i>	LMG 978 <sup>T</sup>	<i>mosselii</i>	CIP 105259 <sup>T</sup>
<i>boreopolis</i>	LMG 979 <sup>T</sup>	<i>mucidolens</i>	LMG 2223 <sup>T</sup>
<i>brassicacearum</i>	DSM 13227 <sup>T</sup>	<i>multiresinivorans</i>	LMG 20221 <sup>T</sup>
<i>brenneri</i>	CIP 106646 <sup>T</sup>	<i>nitroreducens</i>	DSM 14399 <sup>T</sup>
<i>cannabina</i>	LMG 5096 <sup>T</sup>	<i>oleovorans</i>	DSM 1045 <sup>T</sup>
<i>carboxydohydrogena</i>	DSM 1083 <sup>T</sup>	<i>orientalis</i>	CIP 105540 <sup>T</sup>
<i>caricapapayae</i>	LMG 2152 <sup>T</sup>	<i>oryzihabitans</i>	DSM 6835 <sup>T</sup>
<i>cedrina</i>	CIP 105541 <sup>T</sup>	<i>pertucinogena</i>	LMG 1875
<i>chlororaphis</i>	DSM 50083 <sup>T</sup>	<i>pictorum</i>	LMG 981 <sup>T</sup>
<i>cichorii</i>	DSM 50259 <sup>T</sup>	<i>plecoglossicida</i>	DSM 15088 <sup>T</sup>
<i>citronellolis</i>	DSM 50332 <sup>T</sup>	<i>pseudoalcaligenes</i>	DSM 50188 <sup>T</sup>
<i>corrugata</i>	DSM 7228 <sup>T</sup>	<i>putida</i>	DSM 291 <sup>T</sup>
<i>flavescens</i>	DSM 12071 <sup>T</sup>	<i>resinovorans</i>	LMG 2274 <sup>T</sup>
<i>fluorescens</i>	DSM 50090 <sup>T</sup>	<i>rhodesiae</i>	DSM 14020 <sup>T</sup>
<i>fragi</i>	DSM 3456 <sup>T</sup>	<i>saccharophila</i>	DSM 654 <sup>T</sup>
<i>frederiksbergensis</i>	DSM 13022 <sup>T</sup>	<i>savastanoi</i>	LMG 5011
<i>fulva</i>	LMG 11722 <sup>T</sup>	<i>straminea</i>	CIP 106745 <sup>T</sup>
<i>fuscovaginae</i>	DSM 7231 <sup>T</sup>	<i>stuzeri</i>	DSM 5190 <sup>T</sup>
<i>geniculata</i>	LMG 2195 <sup>T</sup>	<i>synxantha</i>	LMG 2190 <sup>T</sup>
<i>gessardii</i>	CIP 105469 <sup>T</sup>	<i>syringae</i>	DSM 6693 <sup>T</sup>
<i>graminis</i>	DSM 11363 <sup>T</sup>	<i>syringae</i> subsp.	LMG 1247 <sup>T</sup>
<i>grimontii</i>	CIP 106645 <sup>T</sup>	<i>syringae</i>	LMG 2336 <sup>T</sup>
<i>halophila</i>	DSM 3050 <sup>T</sup>	<i>taetrolens</i>	LMG 2336 <sup>T</sup>
<i>hibisciola</i>	LMG 980 <sup>T</sup>	<i>thivervalensis</i>	DSM 13194 <sup>T</sup>
<i>huttiensis</i>	DSM 10281 <sup>T</sup>	<i>tolaasii</i>	LMG 2342 <sup>T</sup>
<i>indica</i>	DSM 14015 <sup>T</sup>	<i>vancouverensis</i>	CIP 106707 <sup>T</sup>
<i>jessenii</i>	CIP 105274 <sup>T</sup>	<i>veronii</i>	DSM 11331 <sup>T</sup>
		<i>viridiflava</i>	DSM 11124 <sup>T</sup>

Tab. 1. 2 Liste der Nicht-*Pseudomonas*-Stammsammlungsstämme

Genus	Spezies	Stamm*
<i>Achromobacter</i>	CDC group B	LMG 5414
<i>Achromobacter</i>	CDC group E	LMG 5430
<i>Achromobacter</i>	<i>xylooxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i>	DSM 30026 <sup>T</sup>
<i>Achromobacter</i>	<i>xylooxidans</i> subsp. <i>xylooxidans</i>	DSM 2402 <sup>T</sup>
<i>Achromobacter</i>	<i>piechaudii</i>	DSM 10342 <sup>T</sup>
<i>Acidaminococcus</i>	<i>fermentans</i>	DSM 20731 <sup>T</sup>
<i>Acidovorax</i>	<i>avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	LMG 5276 <sup>T</sup>
<i>Acidovorax</i>	<i>delafieldii</i>	DSM 50263 <sup>T</sup>
<i>Acidovorax</i>	<i>konjaci</i>	DSM 7481 <sup>T</sup>
<i>Acidovorax</i>	<i>temperans</i>	DSM 7270 <sup>T</sup>
<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	DSM 30030 <sup>T</sup>
<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i> subsp. <i>parafaecalis</i>	DSM 13975 <sup>T</sup>
<i>Balneatrix</i>	<i>alpica</i>	CIP 103589 <sup>T</sup>
<i>Bergeyella</i>	<i>zoohelcum</i>	LMG 8351 <sup>T</sup>
<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>	DSM 7234 <sup>T</sup>
<i>Brevundimonas</i>	<i>vesicularis</i>	DSM 7226 <sup>T</sup>
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	DSM 7288 <sup>T</sup>
<i>Burkholderia</i>	<i>gladioli</i>	DSM 4285 <sup>T</sup>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>indologenes</i>	LMG 8337 <sup>T</sup>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>meningosepticum</i>	DSM 2800 <sup>T</sup>
<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>	DSM 50244 <sup>T</sup>
<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>	DSM 39 <sup>T</sup>
<i>Empedobacter</i>	<i>brevis</i>	LMG 4011 <sup>T</sup>
<i>Flavobacterium</i>	<i>mizutaii</i>	DSM 11724 <sup>T</sup>
<i>Microbulbifer</i>	<i>elongatus</i>	DSM 6810 <sup>T</sup>
<i>Myroides</i>	<i>odoratimimus</i>	LMG 4029 <sup>T</sup>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	DSM 6882 <sup>T</sup>
<i>Ralstonia</i>	<i>mannitolilytica</i>	LMG 19092
<i>Ralstonia</i>	<i>pickettii</i>	DSM 6297 <sup>T</sup>
<i>Rhizobium</i>	<i>radiobacter</i>	DSM 30147 <sup>T</sup>
<i>Shewanella</i>	<i>algae</i>	DSM 9167 <sup>T</sup>
<i>Shewanella</i>	<i>putrefaciens</i>	DSM 6067 <sup>T</sup>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>multivorum</i>	DSM 11691 <sup>T</sup>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>spiritivorum</i>	DSM 11722 <sup>T</sup>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>thalophilum</i>	DSM 11723 <sup>T</sup>
<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>	DSM 1098 <sup>T</sup>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>africana</i>	CIP 104854 <sup>T</sup>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophila</i>	DSM 50170 <sup>T</sup>
<i>Weeksella</i>	<i>virosa</i>	LMG 12995 <sup>T</sup>

**Tab. 1.3** Mittels 16S rDNA untersuchte Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplexes

<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Stamm*</b>
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar I	LMG 2161
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar II	LMG 14293
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar III	LMG 12614
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar IV	LMG 14294 <sup>T</sup>
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar V	LMG 10929 <sup>T</sup>
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar VI	LMG 18941
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar VII	LMG 11351
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar VIII	LMG 16670
<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i> Genomovar IX	ATCC 15958 <sup>T</sup>

\*ATCC: American Type Culture Collection

\*CIP: Collection des Bacteries de l'institut Pasteur, Paris

\*DSM: Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

\*LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Rijksuniversiteit Gent, Gent, Belgien

\*T: Typstamm

### 2. 1. 7 Verwendete Software

Bibliographix v. 4, Marcus Schäfer und Olaf Winkelhake, Hildesheim

([www.bibliographix.de](http://www.bibliographix.de))

BLAST-Algorithmus: National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland

Lasergene Software Package v.1.6: DNASTar Inc., Wisconsin, USA

(Umfangreiches Software Paket zum Bearbeiten von Sequenzen: Teile des

Lasergene Pakets: EditSeq v. 3.89, MapDraw v. 3.08, MegAlign v. 3.11).

Sequence Navigator v. 1.01: PE Applied Biosystems, Weiterstadt

T1 Thermocycler Software v. 4.16: Biometra, Göttingen

## 2. 2 Methoden

### 2. 2. 1 Anzucht der Referenzstämmе

Die Stämme wurden auf Columbia-Blut-Agar und/oder Caso-Agar, einzelne zusätzlich auf Müller-Hinton-Agar mit 2 % NaCl kultiviert. Zusätzlich wurden alle Bakterien in TSB-Bouillon überimpft. Die Anzuchttemperatur und das jeweilige Medium richteten sich nach den Empfehlungen der jeweiligen Stammsammlung. Unter Ausnahme von *Acidaminococcus fermentans*, der anaerob wuchs, wurden alle Bakterien unter aeroben Bedingungen angezüchtet. Nach Wachstum wurde von jeder Kultur eine Probe bei -80 °C tiefgefroren. Sie dienen als Referenz für das RIDOM-Projekt und sind Teil der institutseigenen Stammsammlung.

### 2. 2. 2 Molekularbiologische Methodik

#### 2. 2. 2. 1 DNA-Extraktion

Zwei Impfösen Koloniematerial wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 400 µl Tris-EDTA Puffer homogenisiert und anschließend 30 Minuten bei 80 °C inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnte von der Inaktivierung sämtlicher Mikroorganismen ausgegangen werden. Inkubationen mit Lysozym bei 37 °C für 1,5-24 h und 10 % SDS/Proteinase K-Lösung bei 65 °C für 10 Minuten schlossen die Zellwand auf. Eine zehnminütige Behandlung mit N-Acethyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl-Lösung nach dem Protokoll von van Embden *et al.* (100) band Zellwandtrümmer, überschüssige Polysaccharide und Proteine. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit Chloroform/ Isoamylalkohol von den Zellfragmenten abgetrennt und in ein neues Gefäß überführt. Dort präzipitierte die DNA in Isopropanol nach halbstündiger Inkubation bei -20 °C und ebenso langer Zentrifugation bei 14 000 g. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst, um bei -20 °C bis zum Beginn der PCR eingefroren zu werden.

Die extrahierte DNA wurde photometrisch gemessen und dann in 1:10-Verdünnung in den 16S PCR-Ansatz überführt.

### **2. 2. 2. 2 5' 16S rDNA-PCR**

Die universellen Primer 16S-27f und 16S-907r amplifizieren einen Teilabschnitt der ribosomalen 16S-Untereinheit (*E. coli*-Position 8 – 926) der extrahierten und gereinigten DNA. Für die PCR wurde die DNA in TE-Puffer 1:10 verdünnt.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus 2 µl DNA, 2 µl jedes Primers (16S-27f, 16S-907r), 1 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl 10-fach konzentrierter PCR-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub> und 0,25 µl *Taq*-Polymerase zusammen. Insgesamt waren dies 15,25 µl Ansätze, die mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt wurden.

Nach einem „Hot-Start“ bei 80 °C mit einer Dauer von zehn Minuten folgten 28 Amplifizierungszyklen, die durch eine Denaturierungsphase von 45 Sekunden bei 94 °C, eine „Annealing“-Zeit von einer Minute bei 53 °C und eine Extensionsphase von eineinhalb Minuten bei 72 °C gekennzeichnet waren. Die finale Extensionsphase von zehn Minuten bei 72 °C beendete die Reaktion. Die Reaktionen fanden in einem automatischen DNA-Thermocycler (T1 Thermocycler, Biometra) statt. Um die Anwesenheit kontaminierender Nukleinsäuren auszuschließen, wurden Negativkontrollen mit HPLC-H<sub>2</sub>O anstelle von DNA mitgeführt. Ein bereits erfolgreich amplifizierter *Staphylococcus aureus*-Stamm (DSM 799) diente bei der PCR als Positivkontrolle.

### **2. 2. 2. 3 Aufreinigung des PCR-Produktes**

Nach der 16S PCR wurden die PCR-Produkte mit dem Millipore PCR-Produkt-Aufreinigungssystem aufgereinigt, um nicht-verwendete Primer zu entfernen, die die nachfolgende Sequenzierungsreaktion stören könnten. Das PCR-Produkt wurde hierzu in Mikrotiterplatten überführt und mit 60 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. In einem ersten Reinigungsschritt wurde dann die Mikrotiterplatte auf dem Manifold unter Aufbau eines Vakuums von 20 – 25 mmHg für drei Minuten durchgesaugt. Ebenso lief auch der zweite Waschschrift ab, für den noch einmal 100 µl HPLC-H<sub>2</sub>O auf die Membran gegeben wurde. Im dritten Schritt wurden 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O auf die Membran gegeben und die Mikrotiterplatten dann bei höchster Geschwindigkeit auf dem Schütteltisch eluiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde – falls nicht sofort verwendet – bei -20 °C gelagert.

#### **2. 2. 2. 4 Gelelektrophorese**

Nach der Aufreinigung wurde das PCR-Produkt der Gelelektrophorese unterzogen. Dazu wurden je 8 µl des aufgereinigten PCR-Produktes und 2 µl Probenpuffer in den Wells einer Mikrotiterplatte gemischt. Ebenso wurde ein Molekulargewichtsmarker mit einem Mischungsverhältnis von 0,5 µl Molekulargewichtsmarker und 9,5 µl Aqua ad mitgeführt, von dem 6 µl für die Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Die aufgereinigte DNA lief 40 Minuten bei 110 Volt in 1,5%igen Agarosegelen. Die DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid-Färbung mit UV-Licht visualisiert und anschließend fotografiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt ist zum Schluss noch einmal photometrisch gemessen worden, um aus beiden Informationen den DNA-Einsatz für die Sequenzierungs-PCR zu bestimmen.

#### **2. 2. 2. 5 Sequenzierungs-Reaktion**

Bei Erhalt von 5,7 µl PCR-Produkt oder mehr, wurde das PCR-Produkt zunächst in der Speedvac getrocknet bis keine Flüssigkeitsbestandteile mehr vorlagen. Dem Ansatz wurden 0,5 µl Premix, 1,8 µl 5xPuffer und 2 µl des jeweiligen Primers zugeführt (16S-27f oder 16S-519r) mit 5,7 µl HPLC wird das Speedvac-getrocknete PCR-Produkt auf 10 µl aufgefüllt. Bei Erhalt von weniger als 5,7 µl PCR-Produkt wurde dieses nach Zugabe von Premix, Primer und Puffer direkt auf 10 µl mit HPLC aufgefüllt.

Die 25 Zyklen der Sequenzierungsreaktion, die mit Hilfe des T1 Biometra durchgeführt wurden, setzten sich je aus einer Denaturierungsphase von zehn Sekunden bei 96 °C, einer „Annealing“-Phase von fünf Sekunden bei 53 °C und einer Elongationsphase von vier Minuten bei 60 °C zusammen.

#### **2. 2. 2. 6 Sephadexaufreinigung**

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mittels eines Kunstharzes (*Sephadex G50*) aufgereinigt (*Dye Terminator Removal and Sequencing Reaction Clean Up*). Das zunächst pulverförmige Kunstharz quoll dabei über drei Stunden in einer 96 Well-Platte nach Zugabe von HPLC-H<sub>2</sub>O. Nach Gabe des Sequenzierungsproduktes auf die 96 Well-Platte und Zentrifugation lag das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt vor. Im

Anschluss wurde dieses Produkt nach Herstellerempfehlungen (Millipore) getrocknet, von nicht-inkorporierten dNTPs getrennt, in 20 µl Formamid aufgelöst und nach den Anweisungen des Herstellers für die Acrylamid-Gel-Elektrophorese im *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer* so präpariert, dass die Nukleotidfolge für beide DNA-Stränge bestimmt werden konnte.

#### **2. 2. 2. 7 Automatisierte Sequenzierung mit dem *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer***

Die 5' 16S rDNA wurde nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des Taq-cycle sequencing Big Dye Terminator Kit V. 3.0 amplifiziert und im *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer* elektrophoretisch getrennt und detektiert.

Bei dieser „linearen Amplifizierung“ wurde im Unterschied zu den oben beschriebenen PCRs nur ein Primer und Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt. Die ddNTPs sind entsprechend den unterschiedlichen Nukleotiden mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert und verursachen vorzeitige Strangterminierungen.

#### **2. 2. 3 Auswertung der Sequenzdaten**

Die Sequenzierungsergebnisse des *ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer* wurden mit dem Sequence Navigator (Version 1.0.1) editiert und in der RIDOM-Datenbank gesammelt. Die Region von Basenposition 54 bis 510 (entsprechend der 16S rDNA-Sequenz von *E. coli*) wurde analysiert. Der Erstellung multipler Alignments und der Untersuchung der Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Stämmen diente das Programm MegAlign (Version 3.11), ein Bestandteil des Lasergene Programms (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). Dieser Software liegt der Clustal Algorithmus nach der „Neighbour joining“-Methode von Saitou und Nei zugrunde (83, 97).

#### **2. 2. 4 GenBank-Sequenzevaluierung**

Zum Vergleich mit den öffentlich erhältlichen Sequenzen wurden die 5' 16S rDNA-Sequenzeinträge von GenBank mit den Sequenzdaten der untersuchten Stämme verglichen. Dabei wurden jegliche Diskrepanzen im „Alignment“ der Sequenzen als Basenunterschiede gewertet.

#### **2. 2. 5 Datensammlung für das RIDOM-Projekt**

Die Auswahl der Mikroorganismen für die RIDOM-Datenbank orientierte sich an der Liste der „Bacterial Nomenclature up to date“ der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Alle dort aufgeführten Taxa sind durch ihre Veröffentlichung im „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology“ validiert. Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen. Die Beschreibung jedes einzelnen Taxons behandelt makro- und mikroskopische Morphologie, Physiologie, differentialdiagnostische Kriterien, Pathogenität und Verbreitung des Mikroorganismus.

#### **2. 2. 6 Literaturrecherche**

Die für das RIDOM-Projekt relevanten Literaturangaben wurden mit dem Programm *Bibliographix Pro* Version 4 editiert und verwaltet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleichende Sequenzanalyse

Zur Erstellung einer Referenz-Sequenzdatenbank wurde von 76 Spezies des Genus *Pseudomonas* sowie 48 Nonfermentern – inklusive der neun Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplexes - eine 5' 16S rDNA-Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden die Sequenzen von 101 der am 18. Februar 2004 (gemäß DSMZ, „Bacterial nomenclature up to date“) validen *Pseudomonas*-Spezies, darunter die zwei Subspezies *Ps. pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes* und *Ps. syringae* subsp. *syringae*, zusammengestellt. Die fehlenden Sequenzen von 25 Pseudomonaden sowie *Burkholderia mallei* und *pseudomallei* wurden GenBank entnommen und entsprechend den *E. coli*-Positionen 54 bis 510 gekürzt. Die übernommenen Sequenzen von *Ps. palleroniana* und *Ps. salomonii* entsprechen nicht den üblichen Abschnitten, da die nötigen Sequenzbestandteile in GenBank nicht vollständig vorhanden waren. So ist bei *Ps. palleroniana* die Anfangssequenz um sechs Basenpaare (bp) verkürzt; bei *Ps. salomonii* ist der Anfang soweit verkürzt, dass nur 417 bp in die Analyse eingingen. In Tabelle 3 sind alle Stämme mit der jeweiligen Accessionnummer aufgeführt, die von GenBank übernommen wurden. Anschließend wurden die Sequenzen miteinander verglichen, um deren Fähigkeit, einen Organismus eindeutig zu identifizieren, zu überprüfen.

**Tab. 2** Aufstellung der aus GenBank übernommenen Sequenzen

<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Stamm</b>	<b>Acc.-No. Bei GenBank</b>
<i>Burkholderia</i>	<i>mallei</i>	ATCC 23344 <sup>T</sup>	AH 004174
<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	taxon	AJ 131790
<i>Pseudomonas</i>	<i>alcaliphila</i>	taxon	AJ 550466
<i>Pseudomonas</i>	<i>amygdali</i>	ATCC 33614 <sup>T</sup>	D 84007
<i>Pseudomonas</i>	<i>chloritidismutans</i>	AW-1 <sup>T</sup>	AY 017341
<i>Pseudomonas</i>	<i>cissicola</i>	ATCC 33616 <sup>T</sup>	AB 021399
<i>Pseudomonas</i>	<i>congelans</i>	DSM 14939 <sup>T</sup>	AJ 492828
<i>Pseudomonas</i>	<i>constantinii</i>	CFBP 5705	AF 374472
<i>Pseudomonas</i>	<i>cremoricolorata</i>	IAM 1541 <sup>T</sup>	AB 060137
<i>Pseudomonas</i>	<i>extremorientalis</i>	KMM 3447	AF 405328
<i>Pseudomonas</i>	<i>flectens</i>	ATCC 12775 <sup>T</sup>	AB 021400
<i>Pseudomonas</i>	<i>jinjuensis</i>	Pss 14	AF 468449
<i>Pseudomonas</i>	<i>koreensis</i>	Ps 9-14 <sup>T</sup>	AF 468452
<i>Pseudomonas</i>	<i>lini</i>	CFBP 5737 <sup>T</sup>	AY 035996
<i>Pseudomonas</i>	<i>mediterranea</i>	CFBP 5488	AF 386081
<i>Pseudomonas</i>	<i>palleroniana</i>	CFBP 4389 <sup>T</sup>	AY 091527
<i>Pseudomonas</i>	<i>parafulva</i>	AJ 2130	AB 060133
<i>Pseudomonas</i>	<i>poae</i>	DSM 14936 <sup>T</sup>	AF 492829
<i>Pseudomonas</i>	<i>psychrophila</i>	E-3 <sup>T</sup>	AB 041885
<i>Pseudomonas</i>	<i>rhizosphaerae</i>	IH5	AY 152673
<i>Pseudomonas</i>	<i>salomonii</i>	CFBP 2022 <sup>T</sup>	AY 091528
<i>Pseudomonas</i>	<i>spinosa</i>	ATCC 14606 <sup>T</sup>	AB 021387
<i>Pseudomonas</i>	<i>syzygii</i>	ATCC 49543 <sup>T</sup>	AB 021403
<i>Pseudomonas</i>	<i>thermotolerans</i>	CM3	AJ 311980
<i>Pseudomonas</i>	<i>tremae</i>	CFBP 6111 <sup>T</sup>	AJ 492826
<i>Pseudomonas</i>	<i>trivialis</i>	DSM 14937 <sup>T</sup>	AJ 492831
<i>Pseudomonas</i>	<i>umsongensis</i>	Ps 3-1	AF 468453

Unter Ausnahme der Spezies *Ps. gelidicola*, die sich nicht im GenBank-Datensatz befand, konnten damit alle valide beschriebenen *Pseudomonas*-Spezies in die Analyse aufgenommen werden. Unter den neu-sequenzierten *Pseudomonas*-Spezies waren 73 Typstämme. Unter den übernommenen *Pseudomonas*-Sequenzen befanden sich 16 Typstämme. Die übernommene Sequenz von *Burkholderia mallei* war ebenfalls ein Typstamm.

Nach DNA-Extraktion, 5' 16S rDNA-PCR und Sequenzierung wurde von jedem Stamm ein zwischen 400 (*Ps. carboxydohydrogena*) und 459 bp (*Ps. pictorum*) langer Sequenzabschnitt (*E. coli*-Position 54 bis 510) untersucht.

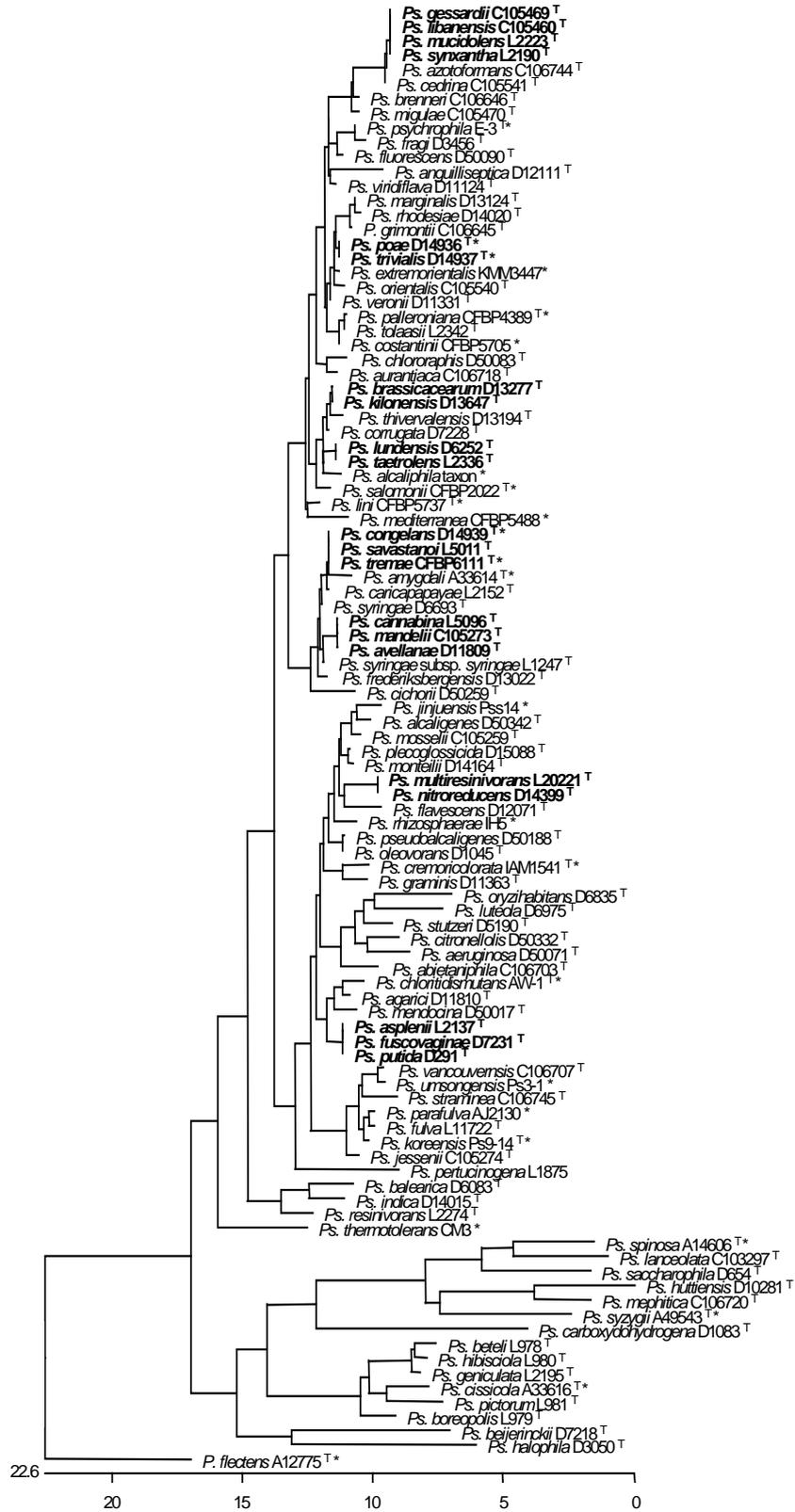
Insgesamt 50 Nonfermenter wurden in die Analyse aufgenommen. Die Auswahl richtete sich nach der Liste medizinisch relevanter Keime des Gideon-Programmes Version 2.0. 15 Nonfermenterstämme waren ehemalige Pseudomonaden (heutige Genera: *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas* und *Stenotrophomonas*), unter den übrigen befanden sich etliche, die bereits bei CF-Patienten isoliert wurden (z.B. *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*) oder in der phänotypischen Diagnostik Schwierigkeiten bereiten können. Unter den 48 neu sequenzierten Nonfermentern befanden sich 39 Typstämme. Bei den beiden Vertretern der *Achromobacter*-Gruppen sowie bei *Ralstonia mannitolilytica* handelte es sich nicht um Typstämme. Unter den Genomovaren des *Burkholderia cepacia*-Komplexes befanden sich drei Typstämme (Genomovar IV, V und IX) und drei Referenzstämme für den *Burkholderia cepacia*-Komplex (Genomovar I, VI und VIII), die in der Zwischenzeit als eigene Spezies anerkannt sind.

Mittels „Clustal-Alignment“ wurde nach der Neighbour-joining-Methode von Saitou und Nei (83) von den partiellen Sequenzen aller aufgenommenen Stämme ein 5' 16S rDNA-Baum erstellt. Abbildung 1 zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des Genus *Pseudomonas* bei alleiniger Betrachtung partieller Sequenzen. Bei den mit Sternchen versehenen Einträgen handelt es sich um GenBank-Sequenzen. Spezies, die gleiche Sequenzen haben, sind fett-gedruckt dargestellt.

Mit Hilfe der 5' 16S rDNA-Sequenzanalyse ist es möglich, 80 der 101 validen *Pseudomonas*-Taxa zu differenzieren. 21 Spezies des Genus *Pseudomonas* stimmen in ihrer partiellen Sequenz mit mindestens einer weiteren Spezies überein – darunter vier GenBank-Sequenzen (Tabelle 3). Weitere sechs Pseudomonaden unterscheiden sich nur um eine Base in ihrer 5' 16S rDNA-Sequenz. Auch drei Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplexes (*B. stabilis*, *B. ambifaria* und *B. pyrrocina*) haben gleiche Sequenzen. Insgesamt haben damit 24 der 151 untersuchten Sequenzen (inklusive der GenBank-Sequenzen) absolut identische partielle Sequenzen (Tabelle 3). Die 5' 16S rDNA-Sequenz beinhaltet in diesen Fällen nicht genügend Informationen, um das Bakterium bis auf Spezieslevel zu identifizieren.

Abb. 1

Neighbour-joining Tree basierend auf partiellen *Pseudomonas*-16S rDNA-Sequenzen



\*: Stamm von GenBank übernommen

Tab. 3 Gleiches Sequenzprofil

Genus	Spezies	Stamm	Acc.-No. bei GenBank
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>gessardii</i> <i>libanensis</i> <i>mucidolens</i> <i>synxantha</i>	CIP 105469 <sup>T</sup> CIP 105460 <sup>T</sup> LMG 2223 <sup>T</sup> LMG 2190 <sup>T</sup>	
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>poae</i> <i>trivialis</i>	DSM 14936 <sup>T*</sup> DDM 14937 <sup>T*</sup>	AF 492829 AJ 492831
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>brassicacearum</i> <i>kilonensis</i>	DSM 13277 <sup>T</sup> DSM 13547 <sup>T</sup>	
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>lundensis</i> <i>taetrolens</i>	DSM 6252 <sup>T</sup> LMG 2336 <sup>T</sup>	
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>congelans</i> <i>savastanoi</i> <i>tremae</i>	DSM 14939 <sup>T*</sup> LMG 5011 <sup>T</sup> CFBP 6111 <sup>T*</sup>	AJ 492828 AJ 492826
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>cannabina</i> <i>mandelii</i> <i>avellanae</i>	LMG 5096 <sup>T</sup> CIP 105273 <sup>T</sup> DSM 11809 <sup>T</sup>	
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>multiresinivorans</i> <i>nitroreducens</i>	LMG 20221 <sup>T</sup> DSM 14399 <sup>T</sup>	
<i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>asplenii</i> <i>fuscovaginae</i> <i>putida</i>	LMG 2137 <sup>T</sup> DSM 7231 <sup>T</sup> DSM 291 <sup>T</sup>	
<i>Burkholderia</i> <i>Burkholderia</i>	<i>mallei</i> <i>pseudomallei</i>	ATCC 23344 <sup>T</sup> taxon	AH 004174 AJ 131790

### 3. 1. 2 Ähnlichkeitslevel

Eine optimale Referenzdatenbank ist unendlich groß, um auch genetische Variabilität innerhalb einer Spezies abbilden zu können. Da dies aus rein praktischen Gründen nicht möglich ist, wird es immer Konstellationen geben, in denen keine 100%ige Übereinstimmung einer unbekanntem Spezies mit einer Referenzsequenz erreicht

werden kann. Für diese Fälle ist es möglich, anhand statistischer Berechnungen genuspezifische Grenzwerte zu generieren, da innerhalb eines Genus die Sequenzvariabilität meist einer Normalverteilung entspricht (42). Diese Berechnungen wurden auch für das Genus *Pseudomonas* durchgeführt. Hierbei stellte sich die Sequenzvariabilität jedoch als so hoch dar, dass eine sinnvolle Berechnung der Ähnlichkeitslevel nicht möglich erschien. Selbst unter Ausschluss all der Spezies, die nach Kersters *et al.* (57) und Anzai *et al.* (3) zukünftig nicht dem Genus *Pseudomonas* sensu stricto zuzuordnen sind, lag die Standardabweichung noch über dem Mittelwert der Sequenzvariabilität und konnte deshalb nicht als Maß für eine sichere Speziesidentifizierung genommen werden.

### 3. 1. 3 MicroSeq 500-Sequenzevaluierung

Die erhaltenen Sequenzen der Pseudomonaden sind darüber hinaus mit dem MicroSeq™ software System v. 1.4.3. und der library Version 500-0125 analysiert worden. Microseq gibt am 1. April 2004 51 Pseudomonaden im System an. Hinzu kommt *Ps. luteola*, die in MicoSeq als *Chryseomonas luteola* geführt wird, was nicht dem aktuellen Taxonomiestand entspricht. Acht dieser 52 Sequenzen befinden sich nicht in RIDOM; fünf deshalb nicht, weil sie als verschiedene Formen von *Ps. fluorescens* geführt werden. *Ps. stanieri* aus dem MicroSeq-Datensatz ist nicht in RIDOM aufgenommen worden, da diese Spezies laut Nomenclature up to date (URL: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>), besucht am (18.2.04), nur Basonymstatus hat und eigentlich *Marinobacterium stanieri* heißt. *Ps. syringae* subsp. *coronafaciens* befindet sich ebenfalls nicht im RIDOM-Datensatz, da diese Subspezies nicht valide beschrieben ist. Gleiches gilt für *Ps. syringae* subsp. *tabaci*. Folglich finden sich 44 der 102 validen Pseudomonaden (Stand 18.2.04) in MicroSeq (43 %); das sind 44 der 76 RIDOM-Pseudomonaden (58 %).

Die Sequenzen von *Ps. syzygii*, *Ps. amygdali* und *Ps. spinosa* wurden für die RIDOM Datenbank zunächst aus GenBank übernommen. Die RIDOM-Sequenzen *Ps. asplenii*, *Ps. pertucinogena* und *Ps. savastanoi* sind keine Typstämme. Obwohl zwei dieser drei Sequenzen 100 % identisch mit MicroSeq-Typstämmen waren, sind diese sechs

Sequenzen nicht in die Auswertung einbezogen worden, da für sie keine gleichen Ausgangsvoraussetzungen vorliegen.

Demzufolge liefern 38 Sequenzen identische Voraussetzungen zum Abgleich von RIDOM und MicroSeq. Für 29 Sequenzen (76 %) liefern RIDOM und MicroSeq ein absolut identisches Profil. Drei weitere RIDOM-Sequenzen stimmen zu 100 % mit MicroSeq überein, liefern aber ein anderes Profil: Die RIDOM-Sequenz von *Ps. mephitica* entspricht dem MicroSeq-Profil: *Ps. mephitica/Jantinobacterium lividum*. Letzteres ist nicht im RIDOM-Datenbestand vorhanden. Die RIDOM-Sequenz von *Ps. putida* entspricht dem MicroSeq-Profil *Ps. putida/Ps. asplenii*. Letzterer ist in RIDOM kein Typstamm. Eventuell wird aus diesem Grund nicht dasselbe Profil geliefert. *Ps. nitroreducens* wird zwar richtig identifiziert, doch ohne Hinweis darauf, dass sich die Spezies die Sequenz mit *Ps. multiresinivorans* teilt, die nicht in MicroSeq vorhanden ist. Für 32 (84 %) der in beiden Datenbanken vorhandenen Spezies wird damit mit 100 % unter anderem die richtige Spezies geliefert. Vier Mal liefert MicroSeq dieselbe Spezies, obwohl Sequenzabweichungen zwischen 0,11 und 0,55 % vorliegen. Somit wurde für 36 Sequenzen (95 %) die richtige Spezies herausgefunden – sei es mit 100 % oder mit höchster Übereinstimmung in der Abfrage. Zwei Mal kommt MicroSeq zu einem anderen Ergebnis als RIDOM, wobei die RIDOM-Spezies mit 0,22%iger Abweichung genannt wird. Die fünf Sequenzen weisen keine 100%ige Übereinstimmung zwischen RIDOM und MicroSeq auf, da insgesamt zehn Basenunterschiede zu verzeichnen sind. Unter diesen zehn Basenunterschieden sind acht auf Ambiguities zurückführbar: Sechs Ambiguities bei MicroSeq und zwei bei RIDOM.

Einmal liefert MicroSeq nur eine Spezies des Profils *Ps. nitroreducens/Ps. multiresinivorans*, weil *Ps. multiresinivorans* nicht im MicroSeq-Datenbestand ist. Daher wird für die Anfrage *Ps. multiresinivorans* eine 100%ige Übereinstimmung mit *Ps. nitroreducens* genannt, was zwar korrekt ist, aber die falsche Spezies liefert.

### 3. 1. 4 GenBank-Sequenzevaluierung

Insgesamt fanden sich 115 der 124 (93 %) selbst erstellten RIDOM-Sequenzen im GenBank-Datensatz. Unter den Pseudomonaden allein waren es 71 der 76 neu sequenzierten (93 %) (BLAST-Suche: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Stand Februar 2004: Die RIDOM-Sequenzen der Pseudomonaden sind am 19. 2. 2004 mit GenBank- Einträgen, die der Nonfermenter am 27. 2. 2004 mit GenBank- Einträgen verglichen worden). Für neun Sequenzen war kein GenBank-Eintrag vorhanden. Bei Sequenzabgleichungen mit dem GenBank-Datensatz, wurde um zur Speziesidentifizierung zu gelangen, davon ausgegangen, dass der Anwender die Spezies mit der höchst-möglichen Übereinstimmung für die zu identifizierende Spezies hält. Erschienen mehrere Spezies mit höchster Übereinstimmung, wurde angenommen, dass die Entscheidung indifferent ausfällt, wenn dem Anwender nicht zusätzliche Informationen vorliegen, die die eine oder andere der angegebenen Spezies ausschließen (z. B. Ort der Gewinnung des Probenmaterials). Befinden sich unter den höchsten Übereinstimmungen auch nicht klassifizierte Stämme, so kann die Entscheidung prinzipiell indifferent ausfallen, ist aber auch zu Gunsten der bekannten Spezies möglich. Liefert die GenBank-Suche hingegen andere Spezies mit höherer Übereinstimmung als die eigentlich richtige, muss davon ausgegangen werden, dass sich der Anwender falsch entscheidet, wenn ihm nicht Informationen vorliegen, anhand derer er diese Spezies ausschließen kann, um doch zum richtigen Ergebnis zu kommen. Unter der Voraussetzung, dass jede Diskrepanz im „Alignment“ als Basenunterschied gewertet wird, wurde für 19 Sequenzen eine 100%ige Profil-Übereinstimmung zwischen RIDOM und GenBank ermittelt, in denen GenBank keine alternativen Einträge mit 100%iger Übereinstimmung angab (16,5 %). 46 Sequenzen lieferten darüber hinaus 100%ige Übereinstimmungen zwischen RIDOM und GenBank, wobei sich in GenBank jedoch eine oder mehrere alternative Spezies für die gesuchte Sequenz fanden (40 %). In sieben dieser 46 Fälle war unter den Alternativen nur eine nummerierte Spezies. 43 Mal fand sich unter den 71 *Pseudomonas*-Sequenzen eine 100%ige Übereinstimmung zwischen RIDOM- und GenBank-*Pseudomonas*-Sequenzen (61 %). 22 GenBank-Sequenzen waren von mangelhafter Qualität, da sie nicht-identifizierte Basen oder Lücken zu RIDOM aufwiesen (17xN, 7xG, 2xN+G). Für zwei Sequenzen (*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* und *Alcaligenes faecalis* subsp.

*parafaecalis*) gibt GenBank eine N-Kettung im Query an, die sich nicht in der Sequenz befand. Unter Zuhilfenahme von GenBank im Vergleich mit RIDOM kommt man zu 35 richtigen Entscheidungen oder 41 richtigen Entscheidungen, wenn man das Vorhandensein von nummerierten Spezies ignoriert. Man trifft 53 indifferente Entscheidungen und 36 falsche Entscheidungen. Auch 26 Entscheidungen wären bei alleiniger Anwendung von RIDOM indifferent.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diese Arbeit**

Durch vergleichende Sequenzanalyse ihrer partiellen 16S rDNA ließen sich ein Großteil der Pseudomonaden und die untersuchten klinisch relevanten Nonfermenter voneinander unterscheiden. Die so erstellten genormten Sequenzabschnitte wurden in die Datenbank des RIDOM-Projektes integriert, das klinisch-praktisch orientierten Ansprüchen entspricht. Da die Sequenzierung des gesamten 16S rDNA-Gens in der Routinediagnostik wenig praktikabel ist, wurde lediglich das 5'-Ende des 16S rDNA-Gens ohne Einschluss der Primerregion sequenziert. Diese Verfahrensweise wird in der Literatur favorisiert (94, 110), da sie im Vergleich zur vollen Sequenzanalyse des 16S rDNA-Gens weniger zeitaufwändig und teuer ist und zudem keine größeren Nachteile hinsichtlich der Genus- und Speziesdeterminierung mit sich bringt (94).

### **4.2 Die besondere Eignung der Sequenzierungsverfahren**

Unter den möglichen genomischen Zielregionen zur molekularen Identifizierung eines Mikroorganismus beschrieben George Fox und seine Mitarbeiter 1980 bereits die besondere Eignung der rRNA für die bakterielle Taxonomie und ihre phylogenetische Analyse (35, 37, 109). Da Veränderungen einzelner Positionen innerhalb des 16S rDNA-Moleküls nur alle 1-2 Millionen Jahre vorkommen, unterliegen die mit dieser Methodik erzielten Identifizierungsergebnisse nahezu keinen Schwankungen (62). Das 16S rDNA-Gen eignet sich daher – abgesehen von phylogenetischen Fragestellungen – auch für die genaue Identifizierung medizinisch relevanter Keime (19, 28, 94, 95, 98). Die Gründe, die es zum günstigen Target molekularer Analyse machen, liegen im universellen Vorhandensein unter den Bakterien, der Präsenz Spezies-spezifischer variabler Regionen und dem gleichzeitigen Vorhandensein konservierter, variabler und hypervariabler Regionen (108). Darüberhinaus liegt das Gen für die rDNA mit hoher Genredundanz im Genom des Bakteriums vor. Auch in Bezug auf Spezifität, diskriminatorische Schärfe, Quantifizierungs- und Standardisierungsmöglichkeiten sind

ribosomale Diagnoseverfahren den traditionell genutzten phänotypischen Markern überlegen.

Die 16S rDNA-Gen-Sequenzierung ist ein wichtiges Verfahren für unidentifizierbare Stämme, die atypische biochemische Profile liefern, für generell schwierig zu differenzierende Bakterien (94), langsamwachsende Bakterien (22), selten anzutreffende Bakterien und nicht – oder nur in zeitaufwendigen Verfahren – kultivierbare Stämme (11). Für Mykobakterien, auf die die genannten Aspekte zutreffen, ist die Sequenzierung der 16S rDNA bereits mehrfach als definitive Methode zur Identifizierung untersucht worden (19, 22, 31). Sie wurde auch als leistungsfähiges, nützliches und universelles Werkzeug zur Identifizierung und Klassifizierung von anderen Prokaryonten bestätigt (42, 94, 98). Daher werden PCR-Verfahren auf 16S rRNA-Gen-Basis häufig als neuer „Gold-Standard“ für die Identifikation von Bakterien bis auf Spezieslevel (110) gesehen. Selbst Pathogene aus Kultur-negativen Proben können häufig mittels PCR-Verfahren entdeckt werden (80, 104).

Die Sequenzen im RIDOM-Projekt sind von Stammsammlungsisolaten angefertigt worden, da diese von Dritten auf einfache Weise zu Referenzzwecken bezogen werden können. Die Sequenzdaten und weitere taxonomische und krankheitsbezogene Daten werden als Teil des RIDOM Software Pakets, Version 1.1 auf den RIDOM web server gelegt (45). Zur Identifizierung eines unbekanntes Erregers werden dessen Sequenzdaten dann mit den Referenzdaten der Datenbank verglichen.

Zur Evaluierung der Qualität der GenBank-Sequenzen wurden die sequenzierten 5' 16S rDNA-Abschnitte der Pseudomonaden und der Nonfermenter, die im Rahmen dieser Arbeit sequenziert worden waren, mit den Sequenzeinträgen identischer Stämme der GenBank verglichen. Alle RIDOM-*Pseudomonas*-Sequenzen sind darüberhinaus auch gegen das MicroSeq 500 System getestet worden. Diese Arbeit stellt die bisher detaillierteste Zusammenstellung sequenzierter Pseudomonaden dar.

### **4.3 Bedeutung von qualitätskontrollierten Referenzdatenbanken**

#### **4.3.1 Bestehende Datenbanken**

Seit den 80er Jahren sind sowohl öffentliche universelle Datenbanken (GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (7) oder EMBL (79)), als auch auf ribosomale Gene spezialisierte Datenbanken („Ribosomal Database Project“ (RDP) (21) oder die „European database on small subunit ribosomal RNA“ (111)) entstanden, in denen Sequenzen gesammelt werden und die dem Anwender eine Computer-gestützte Analyse einer unbekanntem Benutzersequenz erlauben. Dennoch können diese Datenbanken die notwendige Referenzfunktion nur bedingt wahrnehmen und stellen sich vielfach nicht als optimal für die akkurate Identifizierung medizinisch relevanter Mikroorganismen dar (89). Bei GenBank fallen beispielsweise hohe Intraspezies-Sequenzheterogenitäten auf (17), die ihren Wert für die Diagnostizierung pathogener Mikroorganismen limitieren. So können schlechte Sequenzen zu falschen „besten“ Ergebnissen bei der Ähnlichkeitssuche führen. Auch tragen die fehlerträchtigen Sequenztechniken (z. B. reverse Transkription und anschließende DNA-Sequenzierung), die früher verwendet wurden zu einer großen Anzahl relativ schlechter Sequenzen in GenBank bei (89). Die Einträge beziehen sich zuweilen auf Stämme, deren Herkunft nur mangelhaft dokumentiert ist oder die sich nicht im Einklang mit der aktuell gültigen Nomenklatur befinden. Im Laufe der letzten Dekade beruhten etwa 40 % aller Neubeschreibungen einer Spezies auf der Analyse eines einzigen Stammes (15). Dies hat zu einer Datenflut geführt, die sich in den GenBank-Einträgen vor allen Dingen in Form nummerierter Spezies und Klone widerspiegelt, die nicht sehr benutzerfreundlich sind und deren Wertigkeit schlecht abgeschätzt werden kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Sequenzen keinen einheitlichen Qualitätsstandards entsprechen. Eine Vergleichbarkeit der Isolate dieser Sequenzen ist damit nicht oder nur begrenzt möglich. Oft beinhalten diese Datenbanken nur unvollständige Sequenzeinträge aus unterschiedlichen Regionen der rDNA-Gene, die das Score-Ergebnis in der Ähnlichkeitssuche von BLAST und FASTA verfälschen. Um diese Fehler und Nachteile zu korrigieren, sind deshalb andere Datenbanken entwickelt worden. Ein Beispiel ist die qualitätskontrollierte RIDOM-Datenbank, die nur Einträge von gut charakterisierten Typ- und Stammsammlungsstämmen aufnimmt (45).

### **4.3.2 MicroSeq**

Das „MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification System“ entstand in erster Linie als System zur Identifikation von Umweltkeimen (94). Die kommerziell erhältliche Sequenzdatenbank (Applied Biosystems) beinhaltet neu determinierte, qualitativ hochwertige, partielle ribosomale 16S Sequenzen (es werden die ersten 500 bp am 5'-Ende des 16S rRNA-Gens bereitgestellt (76)) von ATCC-Stammsammlungsisolaten und ist hierin dem RIDOM-Projekt gleichzustellen. Für die Identifizierung von ungewöhnlichen aeroben pathogenen gram-negativen Keimen, Mykobakterien und Corynebakterien wurde das MicroSeq-System bereits als gut geeignet und gegenüber GenBank überlegen beschrieben (41, 94, 95, 98). Das MicroSeq 500-System mit PCR und Sequenzierungskit gilt auch als zuverlässige und schnelle Methode, um aerobe Bakterien direkt aus Blutkulturflaschen des BACTEC 9240 Blutkultursystems zu identifizieren (77). Während sich der Datenbestand des RIDOM-Projektes noch im Aufbau befindet, enthält MicroSeq 500 bereits über 2300 validierte Sequenz-Einträge, darunter mehr als 1400 validierte Bakterien-Sequenzen. Es gibt aber noch weitere Unterschiede zwischen beiden Systemen. Die Datenbank MicroSeq 500 hat keine Anbindung an das „World Wide Web“ und ist daher auch nicht mit anderen Datenbanken verlinkt. MicroSeq liefert auch keine weiterführenden Informationen zu den Mikroorganismen wie RIDOM dies tut, weswegen der polyphasische Identifizierungsgedanke bei RIDOM deutlich größer ausgeprägt ist. Im direkten Vergleich beider Systeme wird RIDOM gegenüber MicroSeq als überlegen dargestellt, wobei hier allerdings bisher erst eine Arbeit veröffentlicht wurde (19).

### 4.3.3 RIDOM-Projekt

Das Projekt zur „Ribosomal Differentiation of Microorganisms“ (RIDOM) wurde 1999 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit dem Würzburger Lehrstuhl für Informatik II ins Leben gerufen. Es beinhaltet die qualitätskontrollierte Referenzdatenbank medizinisch relevanter Erreger. Aus Gründen der Qualitätskontrolle wird bei der Auswahl der Organismen – soweit dort verfügbar – nur auf Isolate öffentlicher Stammsammlungen, entsprechend der aktuell gültigen Nomenklatur, zurückgegriffen. Die ribosomalen Sequenzen dieser Datenbank sind in Länge, Anfangs- und Endposition vereinheitlicht und entsprechen damit einem von vielen Autoren als Basis zur akkuraten Identifizierung geforderten einheitlichen Qualitätsstandard (89). Neben den Sequenzen enthält die Datenbank zu allen Mikroorganismen auch mikrobiologische und medizinische Charakterisierungen sowie Primärdaten (z. B. Sequenzchromatogramme), um dem Nutzer die intersubjektive Qualitätskontrolle zu ermöglichen (45). Führt die Suche nicht zu einem eindeutigen Ergebnis, können weiterführende molekularbiologische (wie z. B. die „internal transcribed spacer“ für Mykobakterien) und phänotypische Differenzierungsschritte angeschlossen werden, was einem polyphasischen Ansatz entspricht.

Die offene Hypertext-Struktur von RIDOM bietet zudem viele Schnittstellen mit anderen Internet-Datenbanken (z. B. Pubmed und GenBank). Durch Kopplung an die Pharmakadatenbank (RxLIST) lassen sich dem System bei Identifizierung eines Mikroorganismus direkt Vorschläge zur medikamentösen Therapie entnehmen. 2001 wurde RIDOM als „LinkOut“-Partner an die Datenbanken GenBank, Pubmed und TAXONOMY des „National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)“ gekoppelt. 2002 erfolgte die Aufnahme von RIDOM in die Datenbank-Ausgabe der Zeitschrift „Nucleic Acid Research“ als erste rein diagnostisch orientierte Datenbank (44). Die aufgezeigte Kombination aus Qualitätsmerkmalen und einer benutzerfreundlichen Eingabemaske soll auch in Zukunft eine hohe Benutzerakzeptanz von RIDOM sichern, dessen Ziel die möglichst vollständige Sequenzsammlung aller medizinisch relevanten Mikroorganismen ist.

#### **4.4. Klinische Bedeutung der genauen Speziesbestimmung von Nonfermentern**

Als opportunistischer Keim verursacht *Ps. aeruginosa* insbesondere bei Immunsupprimierten lokale und systemische Infektionen (1, 86, 88). Besondere prognostische und therapeutische Relevanz haben diese Erreger im Kollektiv der Patienten, die an Cystischer Fibrose erkrankt sind (23, 49).

Aus diagnostischen und therapeutischen Gründen – vor allen Dingen vor dem Hintergrund zunehmender antimikrobieller Resistenzen bei fast allen Krankenhaus-assoziierten Keimen, bei *Ps. aeruginosa* und anderen gram-negativen Keimen (34, 55, 64) – gewinnt die genaue Speziesdiagnostik zunehmend an Bedeutung. Speziell das Kollektiv der Patienten, die an Cystischer Fibrose leiden, soll exemplarisch genannt werden, da hier die Notwendigkeit einer speziesgenauen Identifizierung der Nonfermenter besonders gut deutlich wird. Die Anzucht von Erregern, die aus dem Respirationstrakt von CF-Patienten isoliert werden, ist ein arbeitsintensives und teures Verfahren. Eine speziesgenaue Identifizierung von CF-Isolaten ist aber insbesondere deswegen wichtig, weil abhängig vom Ergebnis unterschiedliche Therapieregime folgen und sich Unterschiede im Hinblick auf die Morbiditäts- und Mortalitäts-Prognose ergeben (49, 71). Höhere Mortalitätsraten nach Lungentransplantation werden für Patienten beschrieben, die mit *Burkholderia cepacia*-Komplex-Isolaten infiziert waren (25, 26, 30). Einige Transplantationszentren nehmen CF-Patienten, die mit gewissen Keimen des *Burkholderia cepacia*-Komplexes kolonisiert sind, aus diesen Gründen gar nicht erst zur Transplantation an (13, 60). Weil einige Stämme hochtransmissibel sind (14, 54, 61, 88, 92), werden Infektionskontrollmaßnahmen, die beispielsweise in der Trennung von „*Burkholderia cepacia*-positiven“ und „*Burkholderia cepacia*-negativen“ Patienten bestehen, immer wieder in ihrer Wichtigkeit betont und haben natürlich Auswirkungen auf die Lebensqualität der CF-Patienten (40). Bei genauer Kenntnis des vorliegenden Erregers kann die antimikrobielle Therapie optimiert und damit der klinische Status und die Prognose des Patienten verbessert werden (33), während auf der anderen Seite die Selektion bestimmter Erreger durch unnötige oder falsche Antibiotikagabe vermindert wird.

#### 4.5 Konventionelle phänotypische diagnostische Verfahren

Verschiedene kommerzielle Systeme sind für die Identifizierung gram-negativer Nonfermenter erhältlich. Schwächen ergeben sich dadurch, dass sich die Konfigurationen biochemischer Testprofile wie beispielsweise beim Api 20 NE-Test selten ändern (51), auch wenn die Anzahl bekannter Organismen stetig zunimmt. Die meisten kommerziellen Systeme berücksichtigen überdies die klinische Häufigkeit oder den Isolationsort des zu identifizierenden Keimes nicht. Bei der Auswertung phänotypischer Merkmale muss auch berücksichtigt werden, dass diese im zeitlichen Verlauf instabil sein können und dass ihr Erscheinungsbild von Veränderungen der Umweltgegebenheiten wie Substrat, Temperatur und pH-Wert abhängig sein kann. Darüber hinaus unterliegen sie teilweise einer subjektiven Auswertung (51). Selbst Selektivnährmedien stellen sich Studien zufolge nicht als ausreichend selektiv dar (20, 101). Um zu eindeutigen Identifizierungen zu gelangen, werden im Falle von CF-Isolaten häufig auch Referenzlabore eingeschaltet, die Erfahrungen mit deren atypischen Profilen haben. Verschiedene Autoren evaluierten bereits die Arbeit der Referenzlabore und beschrieben diverse Fehlidentifizierungen (20, 65, 87). Bei einigen Erregern versagte die phänotypische Identifizierung vollständig, während eine Spezies-Identifizierung auf 16S rRNA-Gen-Basis durchaus möglich war (96).

Bedingt durch Ähnlichkeiten phänotypischer und biochemischer Profile – besonders bei CF-Isolaten - wurden konventionelle Verfahren zur Differenzierung auf Speziesebene als ungenau beschrieben und hatten Misidentifizierungen zur Folge (5, 6, 9, 47, 58, 65, 82, 85, 87). Es sind aber auch Fälle beschrieben worden, wo genotypische Verfahren (z.B. Riboprinting) zu Fehldiagnosen geführt haben. So beschrieben Wilsher *et al.* Todesfälle von CF-Patienten, die – basierend auf biochemischen Charakteristika und Ribotyping – für *Burkholderia gladioli* gehalten wurden (106). Clode *et al.* identifizierten alle Isolate von Wilsher *et al.* als *Burkholderia cepacia*-Komplex-Genomovare und kamen daher zu dem Schluss, dass die Identifizierung von *Burkholderia cepacia* und die Differenzierung von *Burkholderia gladioli* mit phänotypischen Methoden unzuverlässig sei und der Bestätigung durch PCR-Verfahren bedurfte (18). In der Literatur finden sich weitere Beispiele für derartige Fehler (52).

#### 4.6 Einschränkungen des Verfahrens

Auch bei zunehmender Etablierung der rDNA-Sequenzierung als „Gold-Standard“ für die Identifizierung von Bakterien weist das Verfahren Grenzen auf. Die Methode eignet sich bei dem kulturunabhängigen Direktnachweis aus klinischem Material nur zur Detektion von Mikroorganismen aus primär sterilem Material. Für eine korrekte Identifikation auf DNA-Ebene ist eine noch über die Sterilität hinausgehende DNA-Freiheit notwendig. Keay *et al.* entdeckten beispielsweise DNA-Kontaminationen steriler cold cup-Biopsiezangen, die zur PCR-Ergebnisverfälschung führten (56). Daher müssen eventuelle Kontaminationen (66, 81) oder PCR-Inhibitoren (38) durch bestimmte Verfahrensweisen aus dem Ansatz eliminiert werden (102). Kontaminationen im Labor müssen durch sauberes Arbeiten verhindert und Artefakte durch die PCR selbst (z. B. Chimärenmoleküle) bei der Auswertung bedacht werden. Falsch negative Ergebnisse können auch auf eine sich schwierig gestaltende DNA-Extraktion bei gewissen Erregern zurückzuführen sein.

Abgesehen von solchen organisatorisch-technischen Problemen gibt es bei der 16S rDNA-Sequenzierung auch inhaltliche Grenzen. Die diskriminatorische Schärfe ist auf Subspeziesebene nicht groß genug, als dass die rDNA-Sequenzierung hier die geeignete Methode wäre. Die Genomovare des *Burkholderia cepacia*-Komplex beispielsweise können mittels *recA*-Gen-Analyse unterschieden werden (29). Mahenthiralingam *et al.* beschrieben ein PCR-Verfahren des *recA*-Gens gefolgt von einer RFLP-Analyse und kamen dabei zu dem Ergebnis, dass das *recA*-Gen zur Unterscheidung von Genomovaren als Target geeigneter ist als die 16S-Region (64). Die Identifizierung zwischen *Burkholderia cepacia*-Komplex-Isolaten mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und anschließender PCR, um das capable pilin Gen (*cb1A*) zu detektieren, ist als Alternative beschrieben worden (46).

Intra-genomische Sequenzheterogenitäten limitieren darüber hinaus das phylogenetische Auflösungsvermögen des 16S rRNA-Gens (17, 24). In den Strukturgenen der rRNA wurden Mikroheterogenitäten bereits von anderen Genera berichtet (12, 16, 90). Das Molekül kann auch keine kürzlichen evolutionären Ereignisse widerspiegeln (36). Wenn nur die 16S rDNA-Gen-Sequenzierung zur Identifizierung angewendet wird, können daher verschiedene Spezies als gleich erscheinen, obwohl sie genetisch unterschiedlich sind und eigene ökologische Nischen besetzen – ein Umstand, der erstmals von Fox

beschrieben wurde (36). Auch der gegenteilige Fall – die Gleichheit zweier Bakterien trotz unterschiedlicher Sequenzen – ist ein Problem, dass die Interpretation von Sequenzierungsergebnissen erschweren kann. 1994 ist von Stackebrandt und Goebel auf der Basis von Korrelationen zwischen kompletten 16S rDNA-Sequenzen und DNA – DNA-Hybridisierungsergebnissen ein Ähnlichkeitslevel von 97 % Sequenzähnlichkeit festgelegt worden, unter dem von einer neuen Spezies ausgegangen werden muss (91). Bei darüberliegenden Ähnlichkeitsleveln sei die Prognose hinsichtlich Speziesidentität nicht verlässlich und nähere sich lediglich gegen 100 % Ähnlichkeitslevel hohen Wahrscheinlichkeiten an. Häufig wurden diese Werte auch auf partielle 16S-Sequenzen übertragen oder man bediente sich empirischer Erfahrungen zur Schwellenwertdefinition (76). Arbeiten von Harmsen und Mellmann zeigten jedoch, dass die paarweisen Distanzwerte vielmehr normalverteilt sind und dass sich diese paarweisen Distanzen selbst bei nahe verwandten Genera wie Mykobakterien und Nokardien doch deutlich unterscheiden (43, 67). Daher lässt sich kein einheitlicher Schwellenwert und damit auch keine einheitliche Kategorisierung für alle Genera generieren, da sich die Einzelschwellenwerte bei Erweiterung des Genus mit neuen Spezies verändern. Bei genereller Normalverteilung innerhalb des Genus können allerdings für einzelne Schwellenwerte assoziierte Fehlerwahrscheinlichkeiten kalkuliert werden.

#### **4.7 Zukünftiger Stellenwert**

Die 16S rDNA-Technologie ist als automatisierbares Verfahren, besonders im Zuge einer Kostenreduktion, für mikrobiologische Untersuchungen zukünftig als Bestandteil einer polyphasischen Identifizierungsstrategie anzusehen, welche phänotypische und genotypische Testverfahren zur Taxonidentifikation beinhaltet (26, 99). Dies konnte bereits für Nicht-Tuberkulose Mykobakterien gezeigt werden, bei denen sich die genotypische Analyse als günstiger als konventionelle Methoden herausstellte (22).

Die partielle 16S rDNA-Sequenzierung kann dabei eine Art Screening-Plattform darstellen, an die sich bei Bedarf andere Verfahren, wie die Sequenzierung von Genen, die für Proteine kodieren oder der innergenischen Spacer-Region des ribosomalen Gen-Komplexes anschließen (94), um zwischen Spezies mit identischen 16S-Sequenzen unterscheiden zu können. Im speziellen Hinblick auf Nonfermenter und Pseudomonaden kommen Ferroni *et al.* in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass genotypische Verfahren, wie die 16S rDNA-Sequenzierung, einen kleinen, aber signifikanten Stellenwert im klinischen Umgang mit CF-Patienten haben werden (33).

Die Qualität der eigenen Sequenzdaten wurde in einer Folgearbeit durch die Analyse klinischer Isolate evaluiert. Vorläufigen Ergebnissen dieser Analysen zufolge, kann von einer hohen Datenqualität ausgegangen werden, wobei die bereits in dieser Arbeit beobachtete Intraspeziesvariabilität innerhalb des Genus *Pseudomonas* in einigen Fällen nicht in 100%ige Übereinstimmungen der Sequenzen mit der Referenzdatenbank mündet. So scheint die 16S rDNA-Sequenzierung die derzeit beste wenn auch nicht die perfekte Identifizierungsmöglichkeit für Pseudomonaden darzustellen.

## 5 Literaturverzeichnis

- (1) Ali NJ, Kessel D, Miller RF (1995) Bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Genitourin Med* 71: 73-77
- (2) Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH (1991) *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 29: 2838-2842
- (3) Anzai Y, Kim H, Park J-Y, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1563-1589
- (4) Baldani JI, Pot B, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Döbereiner J (1996) Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. *Int J Syst Bacteriol* 46: 802-810
- (5) Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C (1998) Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J Clin Microbiol* 36: 2748-2751
- (6) Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Roller C (1999) Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* Genomovars I, III and IV by PCR. *J Clin Microbiol* 37: 1335-1339
- (7) Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2005) GenBank. *Nucleic Acids Res* 33: D34-D38
- (8) Beringer PM, Appleman MD (2000) Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med* 6: 545-550
- (9) Burdge DR, Noble MA, Campbell ME, Krell VL, Speert DP (1995) *Xanthomonas maltophilia* misidentified as *Pseudomonas cepacia* in cultures of sputum from patients with cystic fibrosis: a diagnostic pitfall with major clinical implications. *Clin Infect Dis* 20: 445-448

- (10) Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW, Clausen CR (1998) Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 27: 158-163
- (11) Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28: 1751-1759
- (12) Casamayor EO, Pedrós-Alió C, Muyzer G, Amann R (2002) Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Appl Environ Microbiol* 68: 1706-1714
- (13) Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Krajden M, Chan C, Winton T, Keshavjee S, Scavuzzo M, Tullis E, Hutcheon M, Kesten S (2001) Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. *Am J Crit Care Med* 163: 43-48
- (14) Chen JS, Witzmann KA, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ (2001) Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *Journal Pediatr* 139: 643-649
- (15) Christensen H, Bisgaard M, Frederiksen W, Mutters R, Kuhnert P, Olsen JE (2001) Is characterization of a single isolate sufficient for a valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the *Bacteriological Code* (1990 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2221-2225
- (16) Cilia V, Lafay B, Christen R (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol* 13: 451-461
- (17) Clayton RA, Sutton G, Hinkle Jr PS, Bult C, Fields C (1995) Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Bacteriol* 45: 595-599
- (18) Clode FE, Metherell LA, Pitt TL (1999) Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 374-375
- (19) Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, Carroll KC (2002) Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal

- DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 40: 400-406
- (20) Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ (2002) Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: Identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 8: 692-696
- (21) Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33: D294-D296
- (22) Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A (2003) Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: Cost analysis. *J Clin Microbiol* 41: 1010-1015
- (23) Cystic Fibrosis Foundation (2002) Patient registry 2002 annual Report. Bethesda, Maryland
- (24) Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S (2000) *rpoB* - based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 66: 3376-3380
- (25) de Perrot M, Chaparro C, McRae K, Waddell TK, Hadjiliadis D, Singer LG, Pierre AF, Hutcheon M, Keshavjee S (2004) Twenty-year experience of lung transplantation at a single center: Influence of recipient diagnosis on long-term survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127: 1493-1501
- (26) De Soyza A, Archer L, Wardle J, Parry G, Dark JH, Gould K, Corris PA (2003) Pulmonary transplantation for cystic fibrosis: pre-transplant recipient characteristics in patients dying of peri-operative sepsis. *J Heart Lung Transplant* 22: 764-769
- (27) Diggle MA, Clarke SC (2002) What a load of old sequence!!!. *J Clin Microbiol* 40: 2707
- (28) Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral J-P, Raoult D (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38: 3623-3630
- (29) Drevinek P, Hrbáčková H, Cinek O, Bartošová J, Nyc O, Nemeč A, Pohunek P

- (2002) Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. J Clin Microbiol 40: 3485-3488
- (30) Egan TM, Detterbeck FC, Mill MR, Bleiweis MS, Aris R, Paradowska L, Retsch-Bogart G, Mueller BS (2002) Long term result of lung transplantation for cystic fibrosis. Eur J Cardiothorac Surg 22: 602-609
- (31) El Amin NM, Hanson HS, Pettersson B, Petrini B, von Stedingk LV (2000) Identification of non-tuberculous mycobacteria: 16S rRNA gene sequence analysis vs. conventional methods. Scand J Infect Dis 32: 47-50
- (32) Fegan M, Francis P, Hayward AC, Davis GHG, Fuerst JA (1990) Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. J Clin Microbiol 28: 1143-1146
- (33) Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL (2003) Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à gram négatif non fermentants isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. Pathol Biol 51: 405-411
- (34) Flournoy DJ, Reinert RL, Bell-Dixon C, Gentry CA (2000) Increasing antimicrobial resistance in gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units. Am J Infect Control 28: 244-250
- (35) Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN (1980) The phylogeny of prokaryotes. Science 209: 457-463
- (36) Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol 42: 166-170
- (37) Fredricks DN, Relman DA (1996) Sequence-based identification of microbial pathogens: A reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol Rev 9: 18-33
- (38) Fredricks DN, Relman DA (1998) Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. J Clin Microbiol 36: 2810-2816

- (39) Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance System (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 41: 848-854
- (40) Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP, Webb AK (1993) Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 342: 15-19
- (41) Hall L, Doerr KA, Wohlfield SL, Roberts GD (2003) Evaluation of the MicroSeq System for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 41: 1447-1453
- (42) Harmsen D, Karch H (2004) 16S rDNA for diagnosing pathogens: A living tree. *Features* 70: 19-24
- (43) Harmsen D, Dostal S, Roth A, Niemann S, Rothgänger J, Sammeth M, Albert J, Frosch M, Richter E (2003) RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infect Dis* 3: 26
- (44) Harmsen D, Rothgänger J, Frosch M, Albert J (2002) RIDOM: Ribosomal differentiation of medical micro-organisms database. *Nucleic Acids Res* 30: 416-417
- (45) Harmsen D, Rothgänger J, Singer C, Albert J, Frosch M (1999) Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* 253: 291
- (46) Heath DG, Hohneker K, Carriker C, Smith K, Routh J, LiPuma JJ, Aris RM, Weber D, Gilligan PH (2002) Six-year molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates among cystic fibrosis patients at a referral center for lung transplantation. *J Clin Microbiol* 40: 1188-1193
- (47) Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP (1997) Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 35: 614-619
- (48) Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Roley M, Jiang R, Steinbach S, Goldstein R (1999) An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis* 179: 1197-1205

- (49) Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE (1993) Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr* 122: 854-860
- (50) Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 104: 206-210
- (51) Janda JM, Abbott SL (2002) Bacterial identification for publication: When is enough enough? *J Clin Microbiol* 40: 1887-1891
- (52) Janda JM, Abbott SL, Albert MJ (1999) Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol* 37: 2399-2401
- (53) Jarvis WR, Martone WJ (1992) Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 29: 19-24
- (54) Jones AM, Govan JRW, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK (2001) Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 358: 557-558
- (55) Jones RN (2001) Resistance patterns among nosocomial pathogens. *Chest* 119: 397S-404S
- (56) Keay S, Zhang C-O, Baldwin BR, Alexander RB, Warren JW (1998) Polymerase chain reaction amplification of bacterial 16S rRNA genes from cold-cup biopsy forceps. *J Urol* 160: 2229-2231
- (57) Kersters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer K-H (1996) Recent changes in the classification of the pseudomonads: An overview. *Syst Appl Microbiol* 19: 465-477
- (58) Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, Miller S, Hughes D, King N, Gilligan PH (1996) Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 34: 886-891
- (59) Lewin C, Doherty C, Govan J (1993) In vitro activities of Meropenem, PD 127391,

- PD 131628, Ceftazidime, Chloramphenicol, Co-Trimoxazole and Ciprofloxacin against *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 123-125
- (60) LiPuma JJ (2001) *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? *Transpl Infect Dis* 3: 149-160
- (61) LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL (1990) Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 336: 1094-1096
- (62) Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleier KH (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19: 554-68
- (63) Luzzaro F, Viganò EF, Fossati D, Grossi A, Sala A, Sturla C, Saudelli M, Toniolo A (2002) Prevalence and drug susceptibility of pathogens causing bloodstream infections in northern Italy: A two-year study in 16 hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 849-855
- (64) Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P (2000) DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 38: 3165-3173
- (65) McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ (2000) Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers. *Chest* 117: 1661-1665
- (66) Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC (1993) Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: Implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 31: 646-652
- (67) Mellmann A, Cloud JL, Andrees S, Blackwood K, Carroll KC, Kabani A, Roth A, Harmsen D (2003) Evaluation of RIDOM, MicroSeq and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* 293: 359-370
- (68) Migula W (1849) Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, Bd 1, 235-238



- (79) Rice CM, Fuchs R, Higgins DG, Stoehr PJ, Cameron GN (1993) The EMBL data library. *Nucleic Acids Res* 21: 2967-2971
- (80) Riley DE, Berger RE, Miner DC, Krieger JN (1998) Diverse and related 16S rRNA-encoding DNA sequences in prostate tissues of men with chronic prostatitis. *J Clin Microbiol* 36: 1646-1652
- (81) Rys PN, Persing DH (1993) Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 31: 2356-2360
- (82) Saiman L, Burns JL, Larone D, Chen Y, Garber E, Whittier S (2003) Evaluation of MicroScan autoscan for identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 41: 492-494
- (83) Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- (84) Segers P, Vancanneyt M, Pot B, Torck U, Hoste B, Dewettinck D, Falsen E, Kersters K, De Vos P (1994) Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 44: 499-510
- (85) Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G (1999) Differentiation of *Burkholderia* Species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 37: 2201-2208
- (86) Shankowsky HA, Callioux LS, Tredget EE (1994) North American survey of hydrotherapy in modern burn care. *J Burn Care Rehabil* 15: 143-146
- (87) Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ (2000) Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 38: 3112-3115

- (88) Smith DL, Gumery LB, Smith EG, Stableforth DE, Kaufmann ME, Pitt TL (1993) Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: Evidence of person-to-person transmission. *J Clin Microbiol* 31: 3017-3022
- (89) Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM (2003) 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol* 41: 1363-1369
- (90) Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, De Jong S, Kline E, Stephen JR, Laanbroek HJ (2001) Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 67: 469-472
- (91) Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849
- (92) Sun L, Jiang RZ, Steinbach S, Holmes A, Campanelli C, Forstner J, Sajjan U, Tan Y, Riley M, Goldstein R (1995) The emergence of a highly transmissible lineage of *cb1+* *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat med* 1: 661-666
- (93) Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, White JW, Hardy KA, Gilligan PH, Morgan WM, Carson LA, Martone WJ, Jason JM (1985) *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr* 107: 382-387
- (94) Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH (1998) Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 36: 3674-3679
- (95) Tang YW, von Graevenitz A, Waddington MG, Hopkins MK, Smith DH, Li H, Kolbert CP, Montgomery SO, Persing DH (2000) Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 38: 1676-1678
- (96) Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, Persing DH (1998) *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis* 26: 389-392

- (97) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- (98) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A (2001) Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: Identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J of Clin Microbiol* 39: 3637-3648
- (99) Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-438
- (100) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409
- (101) van Pelt C, Verduin CM, Goessens WHF, Vos MC, Tümmler B, Segonds C, Reubsat F, Verbrugh H, van Belkum A (1999) Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: Comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol* 37: 2158-2164
- (102) Victor T, Jordaan A, du Toit R, Van Helden PD (1993) Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 31: 531-535
- (103) Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI (1999) Phylogenetic relationship among members of the *Comamonadaceae* and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 567-576
- (104) Whitby PW, Dick HLN, Campbell III PW, Tullis E, Matlow A, Stull TL (1998) Comparison of culture and PCR for detection of *Burkholderia cepacia* in sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 36: 1642-1645
- (105) Willems A, Falsen E, Pot B, Jantzen E, Hoste B, Vandamme P, Gillis M, Kersters K, De Ley J (1990) *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*,

- Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov. and *Acidovorax temperans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 40: 384-398
- (106) Wilsher ML, Kolbe J, Morris AJ, Welch DF (1997) Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 155: 1436-1440
- (107) Wilson KH, Blitchington R, Frothingham R, Wilson JA (1991) Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium. Lancet 338: 474-475
- (108) Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271
- (109) Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Arachea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 4576-4579
- (110) Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip K-t, Fung AMY, Leung K-w, Tam DMW, Que T-l, Yuen K-y (2003) Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. J Clin Microbiol 41: 1996-2001
- (111) Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmanns T, De Wachter R (2002) The European database an small subunit ribosomal DNA. Nucleic Acids Res 30: 183-185
- (112) Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol 36: 1251-1275
- (113) Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia soanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969). Microbiol Immunol 39: 897-904
- (114) Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H (1990)

Proposal of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. Microbiol Immunol 34: 99-119

## 6 Abkürzungsverzeichnis

16S rDNA	ribosomale 16S- DNA
5S rRNA	ribosomale 5S- RNA
5´-16S rDNA	5´- 16S ribosomale Desoxiribonucleid Acid
Acc.No.	Accessionnumber
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Biosynthetisches Humaninsulin
bp	Basenpaare
CIP	La Collection de l´institut Pasteur, Paris
CF	Cystische Fibrose
CTAB	N- Acethyl- N,N,N-trimethylammoniumbromid
dNTPs	Desoxynukleotide
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LMG	Belgisches Laboratorium voor Microbiologie, Rijksuniversiteit Gent
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIDOM	Ribosomal Differentiation of Micro-organisms
RNA	Ribonucleid Acid
rRNA	ribosomale Ribonucleid Acid
SDS	Sodium Duodecylsulfate
ssp.	Subspezies
TBE	Tris-Borsäure, EDTA
TE	Tris-HCl, EDTA
TSB	Trypticase Soja Bouillon



## 8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Harmsen* für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die freundliche Unterstützung sowie Herrn *Prof. Dr. Karch* für die Möglichkeit, in seinem Labor die Arbeiten durchführen zu können.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn *Dr. Mellmann* für die hervorragende Betreuung im Rahmen meiner Arbeit, für wertvolle Anregungen und Ratschläge.

Den Mitarbeitern des Institutes für Hygiene in Münster danke ich für die Kooperation und das ausgesprochen freundliche Arbeitsklima.

Bei meinem Mann und meinen Eltern bedanke ich mich für die stetige Anteilnahme und Unterstützung.