

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters-

Entwicklung und Evaluierung einer qualitätskontrollierten 16S-rDNA-  
Datenbank zur Identifizierung von Vertretern der Unterordnung  
*Micrococccineae* (triv. Mikrokokken)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Lee, Sea-Hyun  
aus Rheinberg

2007

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

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

1. Berichterstatter: H<sup>o</sup>Doz. PD Dr. med. K. Becker

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. D. Harmsen

Tag der mündlichen Prüfung: 14.09.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters-  
Referent: H' Doz. PD Dr. med. K. Becker  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. D. Harmsen

### ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung und Evaluierung einer qualitätskontrollierten 16S rDNA-Datenbank zur Identifizierung von Vertretern der Unterordnung *Micrococcineae* (triv. Mikrokokken)  
Lee, Sea-Hyun

Die Sequenzierung von amplifizierten Genomabschnitten, deren Basenfolgen mit Referenzsequenzen bekannter Organismen verglichen werden, spielt in der Identifizierung von Bakterien eine immer bedeutendere Rolle. Insbesondere für die Spezies der reorganisierten bzw. neu etablierten Gattungen der Unterordnung *Micrococcineae*, die herkömmlich als „Mikrokokken“ (triv.) bezeichnet werden, sind gegenwärtig verfügbare semiautomatisierte Identifizierungssysteme durch eine geringe Spezifität charakterisiert.

Anhand einer klinischen „Mikrokokken“-Stammsammlung wurde die molekulare Identifizierung basierend auf variablen Abschnitten des 16S-rRNA-Gens mit zwei auf phänotypischen Nachweismethoden beruhenden Identifizierungssystemen (API STAPH, VITEK 2) verglichen. Dabei dienten die neuermittelten und qualitätskontrollierten 16S-rRNA-Gensequenzen von 21 ausgewählten Referenz- und Typstämmen als Basis für den Aufbau einer Referenzdatenbank.

Die 16-rDNA-Sequenzanalyse identifizierte 38 der 74 klinischen Isolate (51,4%) innerhalb einer Sequenzübereinstimmung von mindestens 99%. Ausgehend von den systemeigenen Auswertungs- und Identifizierungsschemata, konnte das API STAPH-System 31 klinische Isolate (41,9%), das VITEK 2-System 60 klinische Isolate (81,1%) eindeutig identifizieren. Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse und API-STAPH kamen zu 31 (41,9%), Sequenzanalyse und VITEK 2 zu 28 übereinstimmenden Identifizierungen (37,8%). Insgesamt gab es für 22 der 74 klinischen Isolate (29,7%) ein übereinstimmendes Ergebnis aller drei Nachweismethoden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich eine qualitätskontrollierte 16S-rDNA-Datenbank zur Identifizierung von Vertretern der Unterordnung *Micrococcineae* etabliert werden. Im Gegensatz zu den in der Arbeit eingesetzten phänotypischen Nachweismethoden hat sich die 16S-rDNA-Sequenzanalyse als schnellere und exakte Methode zur Identifizierung von „Mikrokokken“ bewährt und konnte Hinweise auf bisher nicht beschriebene Vertreter der *Micrococcineae* unter den klinischen Isolaten aufzeigen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Bedeutung genotypischer Methoden in der Mikrobiologie	1
1.2	Die DNA-Sequenzierung	2
1.3	Probleme der Sequenzdatenbanken	3
1.4	Das RIDOM-Projekt	5
1.5	Vorstellung der verwendeten Bakterienspezies	6
1.5.1	Taxonomische Entwicklung des Genus <i>Micrococcus</i>	7
1.5.2	Anmerkungen zur taxonomischen Entwicklung weiterer Spezies	10
1.5.3	Natürliches Vorkommen der <i>Micrococcineae</i>	12
1.5.4	Pathogenität und Krankheitsspektrum der <i>Micrococcineae</i>	13
1.5.5	Diagnostik und Therapie	15
1.6	Bearbeitete Fragestellung	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Laboreinrichtungen und Geräte	20
2.1.2	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3	Synthetische Oligonukleotide	21
2.1.4	Nährmedien	21
2.1.5	Bakterienstämme	22
2.2	Methoden	25
2.2.1	Vorbereitende Arbeitsschritte	25
2.2.1.1	Medien und Anzucht der Bakterien	25
2.2.1.2	Extraktion chromosomaler DNA	25
2.2.1.3	Photometrische Messung des DNA-Gehaltes	26
2.2.2	Arbeitsschritte der Sequenzierung	27
2.2.2.1	16S-PCR	27
2.2.2.2	PCR-Produktaufreinigung	28

2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer	29
2.2.2.4 Gießen des Gels	29
2.2.2.5 Gelelektrophorese	29
2.2.2.6 Färben des Gels	30
2.2.2.7 Sequenzierungs-PCR	30
2.2.2.8 Aufreinigung der Sequenzierproben	31
2.2.2.9 Auswertung der Sequenzdaten	31
2.2.3 Biochemische Identifizierungssysteme von Bakterien	32
2.2.3.1 API STAPH	32
2.2.3.2 VITEK 2 ID-GPC	33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Vergleich der Referenzsequenzen mit GenBankeinträgen	35
3.2 Sequenzanalyse der klinischen Isolate anhand der Referenzsequenzen	39
3.3 Identifizierung der klinischen Isolate anhand des API STAPH-Systems	42
3.4 Identifizierung der klinischen Isolate anhand des VITEK 2-Systems	51
3.5 Vergleich der RIDOM-Ergebnisse mit den beiden biochemischen Identifizierungssystemen	55
<b>4 Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>103</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung genotypischer Methoden in der Mikrobiologie

Die schnelle und genaue Identifizierung bakterieller Isolate ist ein wichtiger Bestandteil des klinisch-mikrobiologischen Alltags. Lange Zeit basierte diese Identifizierung auf phänotypischen Methoden, welche oft sehr aufwendig waren und auf verschiedenen Untersuchungen, wie beispielsweise Koloniemorphologie, Gram-Färbung, biochemischen Reaktionen, Pigmentproduktion oder auch Ernährungsanforderungen, beruhten. Insbesondere bei langsamwachsenden und anspruchsvollen Organismen kann die traditionelle phänotypische Identifizierung schwierig und zeitintensiv sein. Zudem beinhaltet die Beurteilung der Ergebnisse phänotypischer Methoden häufig ein gewisses Maß an Subjektivität. Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Spezies bzw. intraspezifische Unterschiede können genauso wie bisher unbeschriebene Spezies zu falschen Identifizierungen führen.

Dies führte dazu, dass die genotypische Identifizierung mittels molekularer Methoden, wie beispielsweise die DNA-DNA-Hybridisation oder die Amplifikation von Nukleinsäuren, sich immer mehr als Alternative oder Ergänzung zu phänotypischen Methoden durchsetzen und in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik an Bedeutung gewinnen konnte, vor allem in Fällen, in denen phänotypische Möglichkeiten begrenzt sind, z.B. bei nicht, kaum oder nur sehr aufwendig zu kultivierenden Mikroorganismen. Als Beispiel kann hier die Identifizierung des Erregers des Morbus Whipple, *Tropheryma whipplei*, genannt werden. Aufgrund der Unfähigkeit dieses Erregers unter herkömmlichen Bedingungen zu wachsen und des Fehlens serologischer Tests basierte die Diagnose dieser Krankheit auf klinischen Gesichtspunkten und konnte nur histologisch per Biopsie gesichert werden. Mittlerweile ist der Nachweis auch durch Polymerase Chain Reaction (PCR) und anschließender Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens möglich [77].

Richtlinien ähnlich der Kochschen Postulate, die als Kriterien zum Nachweis von infektiösen und parasitären Erregern basierend auf phänotypischen Nachweismethoden weltweit Gültigkeit erlangten, sind für molekulare Techniken, die bei der Identifizierung von Erregern bestimmter Krankheitsbilder Verwendung finden, bereits vorgeschlagen

worden [34]. Molekulare Methoden führen im Vergleich zu den traditionellen phänotypischen Methoden zu schnelleren und eindeutigeren Ergebnissen hinsichtlich der Identifizierung bakterieller Isolate [93,42].

## **1.2 Die DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung besteht aus mehreren Arbeitsschritten. Zuerst wird die Nukleinsäure extrahiert. Dann wird ein definierter DNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert, d.h. vervielfältigt. Es folgen die Bestimmung der Basenreihenfolge und die Analyse.

Typischerweise eignen sich für die genotypische Identifizierung besonders konservierte Abschnitte der DNA, die innerhalb von aussagekräftigen Regionen liegen. An diese Abschnitte können sich dann entsprechende Primer binden, so dass informative, variable Regionen der DNA amplifiziert und sequenziert werden. Anschließend können die gewonnenen Sequenzen mit Referenzsequenzen bekannter Mikroorganismen verglichen werden.

Als Target genotypischer Diagnostik kommen verschiedene genomische Strukturen in Frage. DNA-Sequenzen, die Kodierungen für pathogene Faktoren beinhalten, DNA-Sequenzen spezifischer Antigene, DNA-Plasmidsequenzen und Gene ribosomaler RNA (rRNA) sind häufig benutzte Targets. Für die Unterscheidung zwischen Staphylokokkenspezies wurden beispielsweise unter anderem die Sequenzabschnitte, die für das Heat Shock Protein 60 (hsp60), die Superoxidase Dismutase A (sodA) und die RNA Polymerase B (rpoB) kodieren, untersucht, wobei vor allem das RNA Polymerase B-Gen für die Differenzierung von Staphylokokken geeignet zu sein scheint [62].

Die rRNA-Gene, darunter auch die 16S-rDNA-Sequenz, gelten aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in allen Zellen als sehr geeignet für diagnostische Zwecke, da sie dadurch universell verwendbar sind und sich nicht auf wenige Bakteriengruppen beschränken. Sie sind relativ einfach aufzuspüren und bestehen aus konservierten, variablen und sehr variablen Regionen, so dass im Rahmen der gewünschten Spezifität entsprechend passende Regionen ausgesucht werden können.

Durch ihre geeignete Größe und strukturellen Merkmale haben sich insbesondere die rRNA-Gene, die die kleine Untereinheit der Ribosomen kodieren, die sogenannten Small-Subunit-rRNA (SSU-rRNA)-Gene, als nützliches Mittel beim Nachweis und Identifizieren von Mikroorganismen erwiesen und auch in der Klassifikation von Prokaryoten und der Untersuchung phylogenetischer Beziehungen unter denselbigen eine große Bedeutung erlangt [102]. Es handelt sich im Falle von Bakterien um das 16S-rRNA-Gen, das 23S-rRNA-Gen und die Interspacer-Regionen.

Die Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens, d.h. die 16S-rDNA-Sequenzanalyse, ist im Moment das am weitesten verbreitete Mittel hinsichtlich der Untersuchung phylogenetischer Beziehungen unter Bakterien und hat viel zu deren Verständnis beigetragen. Mit ihrer Hilfe ist es möglich geworden, heterogene Bakteriengruppen aufzuspüren und neu zu klassifizieren. Zusätzlich sind viele neue Spezies entdeckt worden. 16S-rDNA-Sequenzen erlauben die Klassifikation bisher unentdeckter und unbeschriebener Spezies in hierarchisch aufgebaute Taxa und liefern Informationen über ihre phylogenetischen Beziehungen.

In diesem Zusammenhang wird in Ergänzung zur DNA-DNA-Hybridisierung die rDNA-Sequenzierung auch als „gold standard“ in der Identifizierung und Klassifikation von Bakterien bezeichnet [4].

### **1.3 Probleme der Sequenzdatenbanken**

Die Auswertung der Ergebnisse der Sequenzanalyse basiert auf Vergleichen mit bereits bestimmten Sequenzen bekannter Mikroorganismenspezies. Deshalb bildet eine umfassende Sammlung korrekter Sequenzen die Basis für die richtige Identifizierung von Bakterien.

Dies hat zur Bildung verschiedener Datenbanken geführt, von denen einige öffentlich, d.h. freizugänglich sind, wie beispielsweise „GenBank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) [14]. Die wachsende Bedeutung der Sequenzanalyse in der Mikrobiologie führt dazu, dass öffentliche Datenbanken schnell an Größe zunehmen. GenBank enthält DNA-Sequenzen von mehr als 205 000 benannten Organismen (Stand 03/2006) und erhält Datenbankeinträge in erster Linie durch wissenschaftliche und kommerzielle Arbeitsgruppen sowie von größeren Sequenz-Projekten.

Öffentliche Sequenzdatenbanken weisen viele Problemen auf und sind nicht immer für die exakte Identifizierung klinisch relevanter Mikroorganismen geeignet [84]. Häufig sind die Einträge dieser Datenbanken aufgrund ihrer Organisation nicht standardisiert, da keine konkreten Richtlinien und Vorgaben definiert sind. So kann es zu uneinheitlichen Längen der Sequenzenden kommen. Weitere Nachteile sind fehlerhafte Sequenzen, die oft durch veraltete, anfällige Sequenziermethoden zu erklären sind, da viele Einträge aus den frühen Neunzigern stammen, eine veraltete, falsche oder auch bisher unveröffentlichte, nicht validierte Nomenklatur und das Fehlen von Sequenzen der Typstämme klinisch wichtiger Mikroorganismen. Hinzu kommen unbeschriebene oder mehrdeutige Einträge und das Vorkommen von Lücken innerhalb der Sequenzen bzw. von vermeintlichen Lücken, den sogenannten Pseudogaps. Die Einträge werden nicht hinreichend überprüft und es fehlt im Allgemeinen an einer notwendigen Qualitätskontrolle [96]. Dadurch kann es zu irreführenden und fehlerhaften Ergebnissen kommen, auch wenn die Datenbank die Sequenz des gesuchten Organismus beinhaltet. Übereinstimmungen von unter 100% sind keine Seltenheit und können sowohl als Zeichen verminderter Qualität hinsichtlich der Einträge als auch als Vorhandensein zweier unterschiedlicher Spezies interpretiert werden.

Ein weiteres Problem kann die unübersichtliche, anwenderunfreundliche Bedienung und Präsentation dieser Datenbanken sein.

Neben den öffentlichen Datenbanken existieren auch Datenbanken kommerzieller Anbieter, die aufgrund der angesprochenen Probleme freizugänglicher Systeme eine wichtige Alternative darstellen. Ein Beispiel ist die MicroSeq 500 Bacterial-Datenbank als Teil des MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification System der Firma Applied Biosystems, welches alle notwendigen Materialien zur Amplifikation der ersten, annäherungsweise 500 Basenpaare des 5'-Endes des 16S-rRNA-Gens und der anschließenden Sequenzierung beinhaltet. Die für die Sequenzanalyse erforderliche Software ist ebenfalls Teil des Systems. Bei den Einträgen handelt es sich um Neubestimmte, einheitliche, d.h. in ihrer Länge, Anfangs- und Endposition genormte, Sequenzen von Isolaten aus der American Type Culture Collection (ATCC). Diese Isolate können sowohl Typ- als auch Referenzstämme sein. Typstämme werden in der

Regel als Prototyp einer Spezies betrachtet und müssen bei Erstbeschreibung einer Spezies definiert werden.

Das MicroSeq 500-System hat sich als schnellere und genauere Alternative zu phänotypischen Nachweismethoden bewährt, was beispielsweise bei der Identifizierung von Mykobakterien [70], coryneformen Bakterien [94] oder auch klinischen Isolaten, die durch konventionelle Methoden nicht zu bestimmen waren [31], gezeigt werden konnte. Allerdings hat auch dieses System einige Nachteile und Schwachstellen. Neben den vergleichsweise hohen Kosten als kommerzielles System ist ein besonderer Nachteil das Fehlen von Sequenzen klinisch signifikanter Bakterien [103], was zu uneindeutigen Ergebnissen führt und die Identifizierung dieser Isolate erschwert. Eine weitere Schwachstelle der MicroSeq-Datenbank ist, dass es für jede Spezies nur einen Eintrag gibt. So werden eine eventuelle Mikroheterogenität innerhalb einer Spezies oder intraspezifische Variabilitäten in der SSU-rRNA-Sequenz, für deren unterschätzte Zahl es Hinweise gibt [19], nicht berücksichtigt.

#### **1.4 Das RIDOM-Projekt**

Das Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM)-Projekt [44] wurde als Hilfsmittel zur Identifizierung von Bakterien und Alternative zu den bereits existierenden Datenbanken entwickelt. Einen wesentlichen Teil dieses Projektes stellt die diagnostikorientierte, freizugängliche Datenbank dar, deren Einträge sich besonders auf klinisch relevante, pathogene Organismen konzentrieren. Um einen hohen Qualitätsstandard zu halten, werden nur Stämme aus bekannten Stammsammlungen berücksichtigt. Ähnlich des MicroSeq-Ansatzes beinhaltet die Datenbank Neubestimmte Sequenzen einheitlicher Länge, Anfangs- und Endposition, wobei sich aufgrund des Problems der intraspezifischen Variabilität die Datenbank allerdings nicht auf einen einzelnen Eintrag pro Spezies beschränkt.

Für die Sequenzanalyse maßgeblich ist beim RIDOM-Projekt die 16S-rDNA-Sequenz zwischen und einschließlich den Basenpositionen 54 und 510 am 5'-Ende, entsprechend den Positionen bei *Escherichia coli*. Diese Region ist aufgrund struktureller Merkmale ähnlich aussagekräftig hinsichtlich der Identifikation und Klassifikation von Bakterien

wie die vollständige 16S-rDNA-Sequenz, aber wegen geringerer Länge weniger aufwendig, zeitintensiv und kostspielig zu bestimmen.

Wird bei Abfrage ein Ergebnis nicht bis auf Speziesniveau bestimmt, werden Hinweise für weitere Identifizierungsschritte gegeben, die sowohl auf molekularen als auch auf phänotypischen Techniken basieren können. Obwohl durch partielle 16S-rDNA-Sequenzierung die Mehrzahl der Bakterien identifiziert werden kann, verbleiben einige Stämme, die nur durch weitere Diagnostik bestimmt werden können [43]. Genus- und Speziesbeschreibungen über Morphologie, Physiologie, differentialdiagnostische Kriterien, Pathogenität und Verbreitung des Mikroorganismus sowie taxonomische Informationen sind Teil der Datenbank und werden den jeweiligen Suchergebnissen hinzugefügt, wobei die Aktualität der Nomenklatur mit Hilfe der Bacterial Nomenclature up-to-date-Datenbank der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) geprüft wird. Daneben existieren Links zu anderen Internetadressen und –diensten.

Der Datenbestand des RIDOM-Projektes ist hinsichtlich des Umfangs und der Breite der aufgeführten Organismen nicht mit umfassenden Datenbanken wie beispielsweise GenBank zu vergleichen und wird weiter aufgebaut. Hinsichtlich der eingetragenen Bakteriengruppen stellt das Projekt eine Alternative zu anderen Datenbanken dar und bietet eine umfassende Sequenzsammlung, was beispielsweise für die Gattungen *Mycobacterium* [20] und *Nocardia* [63] gezeigt werden konnte.

## **1.5 Vorstellung der verwendeten Bakterienspezies**

Um die RIDOM-Datenbank zu erweitern, wurde für bakterielle Spezies der Unterordnung *Micrococccineae* die 16S-rDNA-Sequenzierung durchgeführt.

Den Kern dieser Gruppe bildet das Genus *Micrococcus*, wie es im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 von 1986 [52] dargestellt worden ist. Von den damaligen Spezies sind nach aktueller Nomenklatur nur noch *Micrococcus luteus* als Typspezies und *Micrococcus lylae* in diesem Genus zu finden. Die anderen sieben Spezies sind mittlerweile in fünf verschiedene Genera unter- bzw. eingeteilt worden: *Arthrobacter agilis*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria rosea*, *Kocuria varians*, *Kytococcus sedentarius* und *Nesterenkonia halobia*.

Entsprechend den heute bekannten verwandtschaftlichen Beziehungen wurden weitere Spezies der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Dermabacter*, *Kytococcus*, *Microbacterium*, *Oerskovia* und *Rothia* mit in die vorliegende Arbeit einbezogen. Im einzelnen handelt es sich dabei um *Arthrobacter cumminsii*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium epidermidis*, *Brevibacterium otitidis*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Dermabacter hominis*, *Kytococcus schroeteri*, *Microbacterium resistens*, *Oerskovia turbata*, *Rothia dentocariosa* und *Rothia mucilaginoso*.

Obwohl die genannten 21 Spezies 12 Genera angehören, verbindet sie eine enge phylogenetische Verwandtschaft, was, basierend auf Untersuchungen der 16S-rDNA-Sequenzen und der Anwesenheit charakteristischer taxonspezifischer 16S-rDNA-Nukleotide, bereits gezeigt werden konnte [89]. Nach der absteigenden Einteilung der Gruppe der *Actinobacteria* in Klassen, Unterklassen, Ordnungen, Unterordnungen, Familien und Gattungen gehören alle genannten Genera der Unterordnung *Micrococcineae* an. Die Familie *Micrococcaceae* umfasst dabei neben weiteren Genera die Gattungen *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Nesterenkonia* und *Rothia*. Das Genus *Cellulosimicrobium* gehört zur Familie *Promicromonosporaceae* und *Oerskovia* zur Familie *Cellulomonadaceae*. *Kytococcus* und *Dermacoccus* werden zur Familie *Dermacoccaceae* [90] gezählt. Desweiteren ist *Brevibacterium* das Typgenus der *Brevibacteriaceae* und *Dermabacter* wird zu den *Dermabacteraceae* gezählt. Schließlich beinhaltet die Familie *Microbacteriaceae* unter anderem das Genus *Microbacterium*.

### **1.5.1 Taxonomische Entwicklung des Genus *Micrococcus***

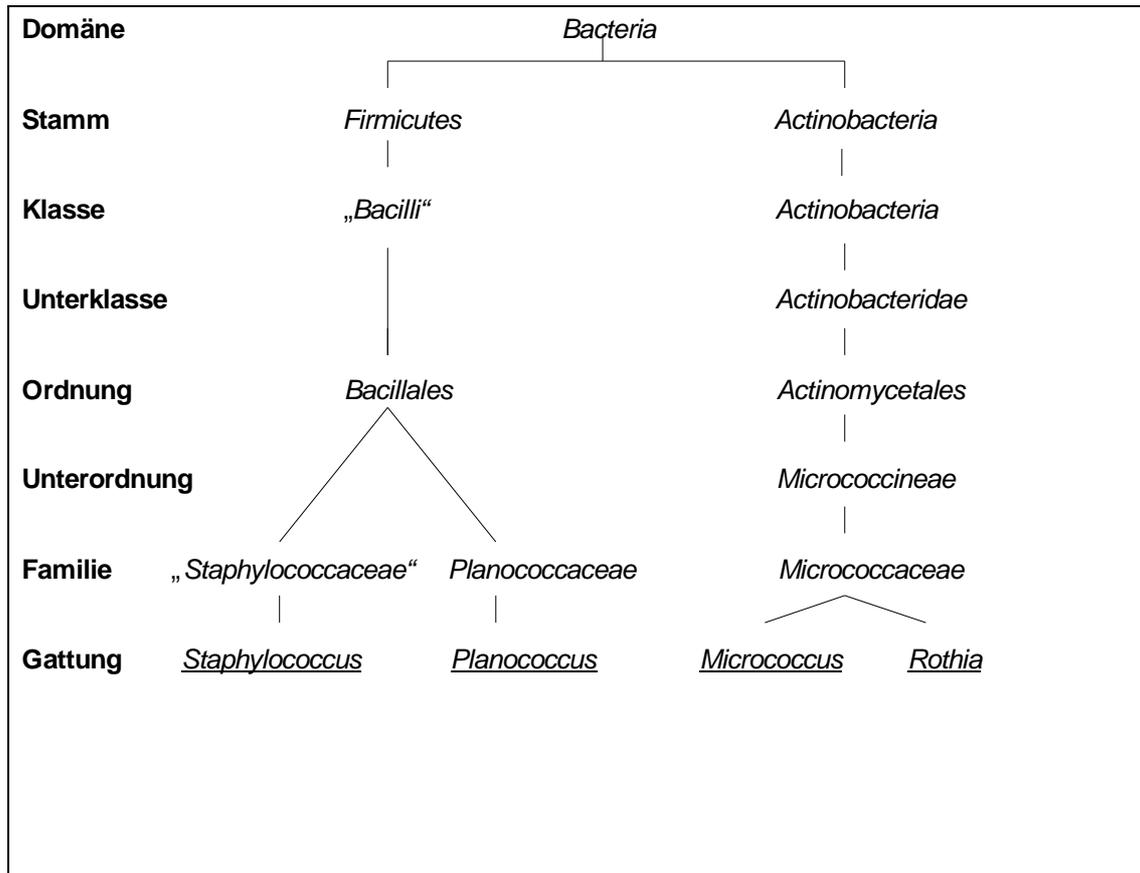
Der Bakteriologe Ferdinand Julius Cohn führte 1872 das Genus *Micrococcus* ein und fasste in diesem kleine, kugelförmige Bakterien zusammen, die nach heutiger Einteilung verschiedenen Genera, wie beispielsweise *Staphylococcus*, *Micrococcus* oder *Streptococcus*, zugeteilt sind. Seither wurde die Genusbeschreibung mehrere Male korrigiert, wobei besonders die Unterscheidung zwischen den Taxa *Micrococcus* und *Staphylococcus* eine große Rolle gespielt hat.

1965 teilte Anthony C. Baird-Parker die aeroben, Katalase- und Gram-positiven Kokken in zwei Gruppen ein. Stämme, die Glucose fermentieren, wurden in Gruppe 1

zusammengefasst und später als Spezies des Genus *Staphylococcus* beschrieben. Die Gruppe 2 beinhaltete Stämme, die Glucose oxidativ oder gar nicht verstoffwechseln, und umfasste das Genus *Micrococcus*. Ein Jahr später erlangte eine Klassifikation Bedeutung, die auf der DNA-Basenzusammensetzung beruhte [79]. Arten mit einem C+G-Gehalt im Rahmen von 30.7-36.4 mol% wurden dem Genus *Staphylococcus* zugeteilt, während Stämme mit einem C+G-Wert zwischen 66.3-73.3 mol% als dem Genus *Micrococcus* zugehörig angesehen wurden. Diese Wertegrenzen wurden später angepasst, die Untersuchung der DNA-Basenzusammensetzung blieb aber bis heute ein wichtiges Mittel in der Klassifikation von Organismen und hatte großen Anteil an der Gliederung des Genus *Micrococcus*.

Lange Zeit wurden die Genera *Staphylococcus* und *Micrococcus* aufgrund von morphologischen und phänotypischen Merkmalen mit den Genera *Stomatococcus* und *Planococcus* in der Familie *Micrococcaceae* zusammengefasst. Durch neuere phylogenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese vier Genera nicht engverwandte sind und nicht einer Familie zugehörig sein konnten. Während Staphylokokken zu der großen *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe gehören, ist das Genus *Micrococcus* am nächsten mit dem Genus *Arthrobacter* verwandt. Die beiden letzteren Genera gehören Familien der Unterordnung *Micrococcineae* an, die der Ordnung *Acinomyetales* zugeordnet wird [89]. Die Unterordnung *Micrococcineae* beinhaltet momentan neben den bereits erwähnten Familien *Micrococcaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Dermacoccaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Dermabacteraceae* und *Microbacteriaceae* weitere Familien und umfasst alle im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Spezies. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die aktuellen verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Genera *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* und *Rothia* (mittlerweile auch die ehemalige Spezies *Stomatococcus mucilaginosus* enthaltend).

**Abb. 1** Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Genera *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* und *Rothia*



\*Die in Anführungszeichen gesetzten Taxa sind noch nicht valide beschrieben.

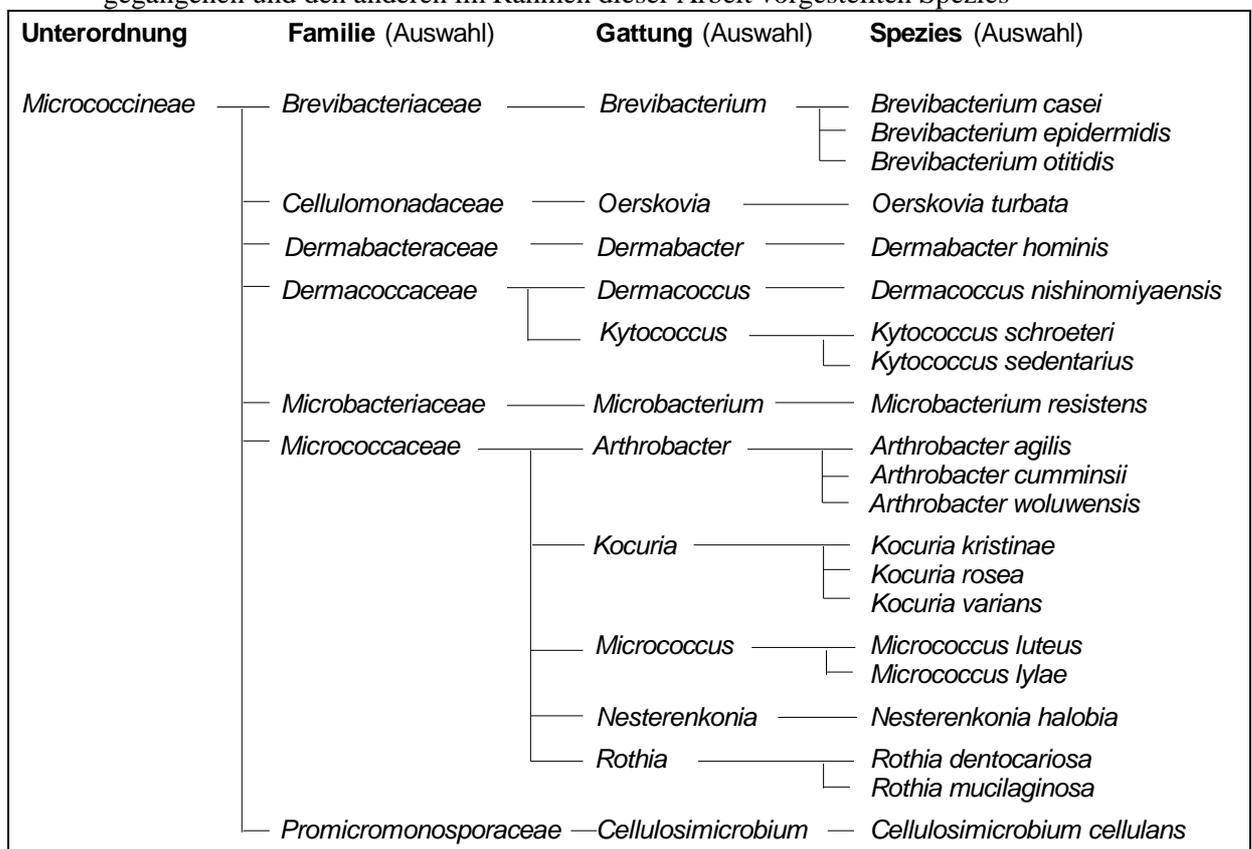
Untersuchungen, basierend auf Analysen der 16S-rDNA-Sequenzen und der chemotaxonomischen Eigenschaften, lieferten zudem Hinweise auf eine Heterogenität innerhalb des Genus *Micrococcus*. Es zeigte sich, dass die Spezies *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae* und *Micrococcus agilis* enger mit dem Genus *Arthrobacter* verwandt waren als die anderen Spezies, die wiederum eine heterogene Gruppe bildeten, was dazu führte, dass 1995 viele Spezies des damaligen Genus *Micrococcus* neu positioniert wurden.

*Micrococcus agilis* wurde als *Arthrobacter agilis* in das Genus *Arthrobacter* reklassifiziert [51]. Sechs weitere Spezies wurden in vier neue Genera eingeteilt [88]. *Micrococcus kristinae*, *Micrococcus roseus* und *Micrococcus varians* wurden als *Kocuria kristinae*, *Kocuria roseus* und *Kocuria varians* im Genus *Kocuria* zusammengefasst, *Micrococcus halobius* wurde in *Nesterenkonia halobia* umbenannt und dem neu etablierten Genus *Nesterenkonia* zugewiesen. *Micrococcus sedentarius*

wurde als *Kytococcus sedentarius* die Typspezies des Genus *Kytococcus*. Schließlich wurde *Micrococcus nishinomiyaensis* als *Dermacoccus nishinomiyaensis* in das Genus *Dermacoccus* reklassifiziert.

Lediglich *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae* blieben Spezies des Genus *Micrococcus*, dem im Jahre 2000 eine dritte Spezies zugeteilt wurde [58]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den aus dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen und den anderen im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Spezies.

**Abb. 2** Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den aus dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen und den anderen im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Spezies



### 1.5.2 Anmerkungen zur taxonomischen Entwicklung weiterer Spezies

*Rothia dentocariosa* wurde zuerst 1949 von Onishi als *Actinomyces dentocariosus* beschrieben. Es folgte die Einordnung in das Genus *Nocardia*. 1967 führten Georg und Brown das Genus *Rothia* mit der Typspezies *Rothia dentocariosa* ein, um Organismen

gerecht zu werden, die bis zu diesem Zeitpunkt zu den Nocardien gezählt wurden, sich aber dennoch deutlich von diesen unterschieden.

Im Jahre 2000 wurde auch *Stomatococcus mucilaginosus* unter der neuen Bezeichnung *Rothia mucilaginosus* diesem Genus zugewiesen [23]. Die ursprüngliche Bezeichnung dieser Spezies lautet *Micrococcus mucilaginosus*, deren Erstbeschreiber Migula im Jahre 1900 war. 1982 benannten Bergan und Kocur mit der Typspezies *Stomatococcus mucilaginosus* ein neues Genus *Stomatococcus* [15], das mit der Eingliederung dieser Spezies in das Genus *Rothia* wieder verschwand.

*Cellulosimicrobium cellulans* wurde zuerst 1957 unter der Bezeichnung *Nocardia cellulans* von Metcalf und Brown erwähnt. Es folgten mehrere Veröffentlichungen scheinbar neuer Spezies verschiedener Genera. 1982 fassten Stackebrandt, Seiler und Schleifer unter anderem die Spezies *Nocardia cellulans*, *Brevibacterium fermentans*, *Brevibacterium liticum*, *Oerskovia xantineolytica* und *Cellulomonas cartae* in der neubeschriebenen Spezies *Cellulomonas cartae* zusammen [91]. 1988 wurde diese Spezies von Stackebrandt und Keddie in *Cellulomonas cellulans* umbenannt und 2001 folgte durch Schumann, Weiss und Stackebrandt die Reklassifikation als *Cellulosimicrobium cellulans* in das neue Genus *Cellulosimicrobium* [82].

Zusammen mit der erwähnten Neubeschreibung des Genus *Cellulomonas cartae* wurde von Stackebrandt, Seiler und Schleifer auch die Zusammenlegung der Genera *Cellulomonas* und *Oerskovia* propagiert, so dass *Oerskovia turbata* in *Cellulomonas turbata* umbenannt wurde. Die Erstbeschreibung dieser Spezies unter der Bezeichnung *Nocardia turbata* stammt von Erikson aus dem Jahre 1954. 1970 führten Prauser, M.P. Lechevalier und H. Lechevalier das neue Genus *Oerskovia* mit der Typspezies *Oerskovia turbata* ein [74], das, nach der Zusammenlegung mit dem Genus *Cellulomonas*, im Jahre 2002 Neubewertet und wieder eingeführt wurde [86].

1998 führten taxonomische Studien von Takeuchi und Hatano zum Zusammenschluss der beiden Genera *Aureobacterium* und *Microbacterium* unter dem Namen *Microbacterium* [92]. Im selben Jahr wurde eine neue *Aureobacterium*-Spezies entdeckt [36], die nicht Teil dieser Studien war und deshalb als *Aureobacterium resistens* klassifiziert wurde. Im Jahre 2001 wurde diese Spezies unter der Bezeichnung *Microbacterium resistens* in das Genus *Microbacterium* aufgenommen [12].

*Kytococcus schroeteri* wurde 2002 das erste Mal beschrieben [11] und als zweite Spezies nach *Kytococcus sedentarius* in das Genus *Kytococcus* aufgenommen, das nach der Aufteilung des damaligen Genus *Micrococcus* entstand.

Das Genus *Arthrobacter* wurde 1947 von Conn und Dimmick eingeführt und beschreibt eine Gruppe Gram- und Katalase-positiver, aerober, coryneformer Bakterien, darunter auch *Arthrobacter cumminsii* und *Arthrobacter woluwensis*, die 1996 zuerst beschrieben wurden [35].

Das Genus *Brevibacterium* umfasst eine Gruppe Gram-positiver, stäbchenförmiger Bakterien. Es wurde 1953 von Breed eingeführt. *Brevibacterium casei* und *Brevibacterium epidermidis* wurden 1983 diesem Genus zugeordnet [22], 1996 kam *Brevibacterium otitidis* dazu [69].

*Dermabacter hominis* wurde zuerst 1988 von Jones und Collins als Typspezies des neuen Genus *Dermabacter* beschrieben [49].

### **1.5.3 Natürliches Vorkommen der *Micrococcineae***

Mikrokokken sind wie die Vertreter der aus diesem Genus hervorgegangenen Genera *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Kytococcus* und *Nesterenkonia* Bestandteil der aeroben Mikroflora der Haut von Säugetieren, die als primärer Lebensraum dieser Bakterien gilt. Sie werden gewöhnlich als transiente Bewohner angesehen und werden beim Menschen besonders oft an den exponierten Körperteilen wie Gesicht, Beine, Arme und Hände gefunden. In einer Studie von Kloos und Musselwhite [50] machten Mikrokokken, worunter unter der damaligen Klassifikation auch die obengenannten Genera zusammengefasst sind, bis zu 20% der aeroben Bakterien aus, die in der Studie von Hautpartien an Stirn, Backe, Armen und Beinen isoliert wurden, wobei die *Micrococcus luteus*-Population mit 20-80% einen Großteil der dort isolierten Mikrokokken darstellte. *Micrococcus luteus* war mit gewöhnlich über 90% die am häufigsten von Achsel- und Nasenvorhofhaut isolierte *Micrococcus*-Spezies. Allerdings machten Mikrokokken weniger als 1% der von diesen Stellen gewonnenen Isolate aus.

Darüberhinaus sind die Vertreter der *Micrococcineae* in der Natur weitverbreitet und können an Pflanzenteilen sowie in der unbelebten Umwelt wie Erde und Wasser gefunden werden. Auch Milch- und Fleischprodukte zählen zu den Lebensräumen dieser Bakterien.

Spezies der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Celulosimicrobium*, *Dermabacter*, *Microbacterium*, *Oerskovia* und *Rothia* sind ubiquitär verbreitet und sind ebenfalls Bestandteil der aeroben Mikroflora der menschlichen Haut. Arthrobakterien finden sich besonders in Erde, sind aber weitverbreitet. Brevibakterien können ähnlich den Mikrokokken aus Milch- und Fleischprodukten isoliert werden und sind Bestandteil der Hautflora. *Celulosimicrobium celulans* und *Oerskovia turbata* finden sich unter anderem in Erde, Abwasser und Proben verfaulender Vegetation. Für *Microbacterium resistens* sind Fleischprodukte, Abwasser und Erde als Lebensräume beschrieben. Es ist weitverbreitet und wurde auch aus Insekten- und Pflanzenproben isoliert. *Rothia dentocariosa* und *Rothia mucilaginosa* sind Bestandteil der Schleimhautflora des Mund- und Rachenraumes und der oberen Atemwege. *Dermabacter hominis* wurde im Rahmen der Erstbeschreibung von menschlicher Haut isoliert.

#### **1.5.4 Pathogenität und Krankheitsspektrum der *Micrococcineae***

Sowohl Mikrokokken und die Vertreter der aus dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen Genera *Dermacoccus*, *Kocuria* und *Kytococcus* als auch die anderen in dieser Arbeit vorgestellten Spezies der Unterordnung *Micrococcineae* sind Bestandteil der Mikroflora der menschlichen Haut und Schleimhaut. Deshalb wurde ihr Nachweis in klinischem Untersuchungsmaterial in der Vergangenheit meist als Kontamination gewertet. In den letzten Jahren hat sich die Zahl der Veröffentlichungen bezüglich der Pathogenität dieser Bakterien stark erhöht. Ein Grund dafür sind die verbesserten Nachweismethoden, die zu einer genaueren Identifizierung und Beschreibung der jeweiligen Spezies geführt haben. Einige Spezies wurden reklassifiziert, vorher nicht zuordbare Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial konnten nunmehr zugeordnet werden [25,40]. Es hat sich gezeigt, dass das pathogene Potential dieser Bakterien lange Zeit unterschätzt worden ist.

Ein weiterer Grund ist die steigende Zahl der immunsupprimierten Patienten, deren diagnostische Begleitung und Behandlung zunehmend intensiver und invasiver wird, was zur wachsenden klinischen Bedeutung von opportunistischen Pathogenen führt.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über Infektionen, die im Rahmen von Fallberichten mit den in dieser Arbeit vorgestellten Bakterien assoziiert worden sind.

**Tab. 3** Fallberichte und klinische Studien zu Infektionen mit *Micrococcineae*- Verdacht

Spezies	Beschriebene Infektionen (Auswahl)
<i>Arthrobacter agilis</i> <sup>a</sup>	
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	Harnwegsinfektion [37], Urosepsis, chronische Zervizitis
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	Endokarditis [16], Port-A-Cath-Infektion
<i>Brevibacterium casei</i>	Sepsis [17], Bakteriämie [78], Meningitis, Cholangitis, Peritonitis
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	Zentralvenenkatheterinfektion [60]
<i>Brevibacterium otitidis</i>	Endokarditis [26], Peritonitis [99]
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	Chronisches Zungenulkus [46]
<i>Dermabacter hominis</i>	Bakteriämie [39], zerebraler Abszess, Peritonitis [75]
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> <sup>a</sup>	
<i>Kocuria kristinae</i>	Bakteriämie [9], akute Cholezystitis
<i>Kocuria rosea</i>	Bakteriämie [3]
<i>Kocuria varians</i>	Cerebrospinal Fluid-Shuntinfektion
<i>Kytococcus schroeteri</i>	Endokarditis [54], Pneumonie [64]
<i>Kytococcus sedentarius</i>	Endokarditis [67], hämorrhagische Pneumonie, Keratolysis sulcata
<i>Microbacterium resistens</i>	Bakteriämie [36,66]
<i>Micrococcus luteus</i>	Bakteriämie [71], septische Arthritis [100], Meningitis [32], Endokarditis [29]
<i>Micrococcus lylae</i>	Bakteriämie
<i>Nesterenkonia halobia</i> <sup>a</sup>	
<i>Oerskovia turbata</i>	Bakteriämie [55], Endokarditis [61], axillarer Abszess, Tosillitis, Sepsis, Pneumonie
<i>Rothia dentocariosa</i>	Sepsis [83], Endokarditis [5,53], Pneumonie, Endophtalmitis [59], Peritonitis
<i>Rothia mucilaginoso</i>	Sepsis [73], Endokarditis [72], Peritonitis, Meningitis, Infektion des Plexus choroideus [41]

<sup>a</sup> Es wurden keine veröffentlichten Fallberichte oder Erwähnungen gefunden, die einen klinischen Zusammenhang mit den jeweiligen Bakterien herstellen.

Neben den in der Tabelle aufgezählten Infektionen gibt es eine Reihe von Publikationen, in denen der Erreger bislang nur bis zum Genuslevel identifiziert werden konnte. So sind *Arthrobacter*-Spezies unter anderem in Fällen von Endophtalmitis [47] und Sepsis [30] isoliert worden. Osteomyelitis [65] und Bakteriämie [57] wurden *Brevibacterium*-

Spezies zugeschrieben und Mikrokokken konnten beispielsweise mit Pneumonie [1], Endophthalmitis [18] und Endokarditis [21] in Zusammenhang gebracht werden.

### 1.5.5 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der besprochenen Bakterien beruht nach wie vor größtenteils auf einer Vielzahl an morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmalen, auch wenn die Bedeutung molekularer Nachweismethoden zunimmt. Die Ähnlichkeit dieser phänotypischen Merkmale zwischen Mikrokokken und Staphylokokken macht eine Differenzierung der beiden Genera mittels traditioneller Methoden unter Umständen schwierig, die allerdings von hoher Bedeutung ist, um die im Allgemeinen mit einem geringen Arsenal an Virulenzfaktoren ausgestatteten Mikrokokken von den regelmäßig als Krankheitserreger in Erscheinung tretenden Staphylokokken abzugrenzen. Beide gehören zur Gruppe Gram- und Katalase-positiver Kokken und besitzen ähnliche morphologische Strukturen. Während der Nachweis ersterer aus klinischem Untersuchungsmaterial vorwiegend als Kontamination oder Kolonisation gewertet wird, spielen Staphylokokken in der Infektiologie eine größere Rolle. Sie sind ursächlich für einen Großteil an Wundinfektionen, Osteomyelitiden, Pneumonien, Sepsis- und Endokarditisfällen und stellen aufgrund ihres Antibiotikaresistenzprofils ein großes Problem als Erreger nosokomialer Infektionen dar. Mittlerweile ist eine Reihe von Unterscheidungsmerkmalen bekannt, die auch die aus dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen Genera miteinbezieht. Diese Gruppe lässt sich neben aufwendigeren Untersuchungen, wie beispielsweise die Analyse der DNA- oder der Zellwandzusammensetzung, durch ihre Resistenz gegenüber Furazolidon und Lysostaphin sowie ihre Bacitracinempfindlichkeit von Staphylokokken unterscheiden [6,7]. Zudem sind Staphylokokken bis auf wenige Ausnahmen Oxidase-negativ.

Innerhalb dieser Gruppe können Mikrokokken, bei denen sich *Micrococcus lylae* aufgrund seiner Lysozymresistenz und des fehlenden Wachstums auf inorganischem Nitrogenagar von *Micrococcus luteus* unterscheiden lässt, durch ihre Unfähigkeit, aus D-Glucose und  $\beta$ -D-Fructose aerob Säure zu produzieren, vom Genus *Kocuria* abgegrenzt werden. Außerdem zeigen, im Gegensatz zu Mikrokokken, *Kocuria varians* und *Kocuria rosea* Nitratreduktion und *Kocuria kristinae* aerobe Säureproduktion aus

Glucose sowie Esculinhydrolyse. *Dermacoccus nishinomiyaensis* kann man anhand der orangenen Kolonien und des fehlenden Wachstums auf 7.5%igem NaCl-Agar von Mikrokokken unterscheiden, während *Kytococcus sedentarius* und *Kytococcus schroeteri* als prägende Merkmale Penicillin- und Methicillinresistenz sowie Argininhydrolyse aufweisen, sich aber unter anderem hinsichtlich der Tween 80-Hydrolysefähigkeit von *Kytococcus schroeteri* unterscheiden. Die halophile Spezies *Nesterenkonia halobia* wächst erst ab einem 5%igem NaCl-Gehalt auf künstlichen Nährmedien.

Spezies der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Dermabacter*, *Microbacterium* und *Oerskovia* sind erst in den letzten Jahren als bedeutende Krankheitserreger identifiziert worden [38]. Die Entwicklung molekularer Nachweismethoden hat entscheidend dazu beigetragen, viele dieser früher unter dem Begriff „coryneforme Bakterien“ zusammengefassten Organismen bis auf Speziesniveau sicher zu identifizieren, da die phänotypischen Merkmale nicht immer ausreichend und zuverlässig für eine Unterscheidung sind. Es ist möglich geworden, Spezies als Krankheitserreger zu beschreiben, die vorher als nicht pathogen galten. Zudem sind eine Reihe neuer Spezies entdeckt worden. Zu den angewandten Techniken gehören neben den phänotypischen Nachweismethoden beispielsweise die Analyse der 16S-rRNA-Gensequenz und Peptidoglykanstruktur, die DNA-DNA-Hybridisation und die Analyse zellulärer Fettsäuren. In vielen Fällen ist eine Kombination dieser Techniken, im englischen Sprachgebrauch auch als „polyphasic approach“ bezeichnet, für eine genaue Identifizierung hilfreich.

Mikrokokken und die Vertreter der aus dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen Genera sind gegenüber den meisten Antibiotika empfindlich [97,98]. Jedoch finden sich speziesspezifische Resistenzen bzw. Resistenzprofile gegenüber Antibiotika und zellwandaktive Enzyme, die teilweise auch als Unterscheidungsmerkmal dienen. *Kocuria rosea*, *Kocuria kristinae* und *Nesterenkonia halobia* sind Lysozym-resistent. Für *Kytococcus sedentarius* und *Kytococcus schroeteri* ist eine Resistenz gegenüber Penicillin G und Methicillin beschrieben.

Das pathogene Potential der Spezies der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Dermabacter*, *Microbacterium*, *Oerskovia* und *Rothia* wurde lange

Zeit unterschätzt und es fehlt an Richtlinien für einheitliche Antibiotikaempfindlichkeitstest [25] hinsichtlich dieser Bakterien. *Arthrobacter*-Spezies zeigen sich empfindlich gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Glycopeptidantibiotika. *Arthrobacter agilis* ist darüberhinaus empfindlich gegenüber Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclinen, Erythromycin, Novobiocin und Gentamicin und zeigt Lysozymresistenz. Viele Stämme der Spezies *Brevibacterium casei* sind resistent gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika, Ciprofloxacin, Clindamycin und Erythromycin und *Brevibacterium otitidis* zeigt Resistenzen gegenüber Ampicillin, Clindamycin, Oxacillin, Penicillin und Co-Trimoxazol. *Dermabacter hominis* ist empfindlich gegenüber Cephalosporinen, Glycopeptidantibiotika und Rifampicin, zeigt aber eine eingeschränkte Reaktion auf Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamicin und Tetracycline. Für *Rothia dentocariosa* ist eine Resistenz gegenüber Co-Trimoxazol beschrieben, während *Rothia mucilaginosa*-Stämme Resistenzen gegenüber Penicillin, Aminoglycosiden und Erythromycin sowie Lysozym und Lysostaphin zeigen können. *Microbacterium*-Spezies sind gegenüber den meisten Antibiotika empfindlich, zeigen aber Resistenzen gegenüber Penicillin G und Aminoglycosiden. Darüberhinaus ist *Microbacterium resistens* Vancomycin-resistent, was zu der Namensgebung führte.

## 1.6 Bearbeitete Fragestellung

Infektionen durch opportunistische Erreger, wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Vertreter der *Micrococccineae*, spielen in der Medizin eine immer größere Rolle. Durch die wachsende Zahl immunsupprimierter Patienten und verbesserte Nachweismethoden konnten in den letzten Jahren viele Organismen als potentielle Krankheitserreger identifiziert werden, die vorher als harmlos betrachtet wurden. Viele dieser opportunistischen Pathogene sind ubiquitär verbreitet und besiedeln auch die Haut und Schleimhaut des Menschen, weshalb ihr Nachweis in klinischem Untersuchungsmaterial sowohl als Kontamination bzw. Kolonisation als auch als klinisch signifikant bewertet werden kann. Für die Abschätzung des pathogenen Potentials und die gegebenenfalls nachfolgende Therapie ist deshalb eine exakte Identifizierung nötig.

Molekulare Techniken haben viel zur exakten Identifizierung von Bakterien beigetragen und sind mittlerweile eine wichtige Alternative und Ergänzung zu den traditionellen phänotypischen Nachweismethoden, die auf biochemischen und physiologischen Reaktionen und Merkmalen der jeweiligen Mikroorganismen basieren. Sie haben weiterhin auch für die Untersuchung der Mikroorganismen-Phylogenie eine große Bedeutung erlangt und haben zum besseren Verständnis der verwandtschaftlichen Beziehungen beigetragen. Viele Spezies sind reklassifiziert worden und im Zuge der molekularen Diagnostik wurden viele Arten neuentdeckt.

Eines der molekularen Verfahren ist die Sequenzierung von Genomabschnitten. Hierbei wird die Basenfolge eines definierten Genomabschnittes des zu identifizierenden Mikroorganismus ermittelt und anschließend mit Referenzsequenzen bekannter Organismen verglichen, wobei große Übereinstimmungen auf eine mögliche Identität hinweisen. Die 16S-rDNA-Sequenz ist einer der am häufigsten verwendeten Genomabschnitte und kodiert das 16S-rRNA-Molekül. Sie kommt ubiquitär in allen Zellen vor und eignet sich aufgrund ihrer strukturellen Merkmale besonders für die Identifizierung von Mikroorganismen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die 16S-rDNA-Sequenzierung mit zwei kommerziellen Identifizierungssystemen, dem API STAPH-System und dem VITEK 2-System, verglichen werden, die beide auf phänotypischen Merkmalen basieren. Einen

wesentlichen Teil dieser Arbeit stellt die qualitätskontrollierte Ermittlung von 16S-rDNA-Sequenzen der Unterordnung *Micrococcineae* dar, deren humanmedizinisch wichtigste Gruppe das Genus *Micrococcus* und die aus diesem hervorgegangenen Genera *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Kytococcus* und *Nesterenkonia* umfasst. Hinzu kommen weitere verwandte Spezies verschiedener Genera dieser Unterordnung. Viele dieser Arten sind in den letzten Jahren als opportunistische Pathogene beschrieben worden und besitzen klinische Relevanz. Die hier ermittelten Sequenzen dieser Bakteriengruppe sollen als Referenzsequenzen für 74 klinische Isolate dienen, die nach alter Nomenklatur phänotypisch als Mikrokokken identifiziert worden sind. Anhand der Sequenzanalyse und vergleichend mit den beiden kommerziellen, phänotypischen Identifizierungssystemen sollen diese Neubewertet werden. Die Referenzsequenzen sollen weiterhin die Datenbank des RIDOM-Projektes erweitern.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte**

- ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf AG, Hamburg)
- Gene Quant II Photometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Millipore Multiscreen® Separations Systems (Millipore, Billerica, USA)
- Techne Dri-Block DB-2P (Techne AG, Jahnsdorf)
- T1 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen) Software-Version 4.16
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
- VITEK® 2-Gerät

#### **2.1.2 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

- ABI Prism BigDye Terminator v3.0 Ready-Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- AmpliTaq DNA Polymerase (5U/μl; Applied Biosystems, Weiterstadt)
- API STAPH-System V 4.0 (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France)
  - API STAPH-Kit
  - Paraffinöl
  - Reagenzien (VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, ZYM A, ZYM B)
  - Analytischer-Profil-Index API STAPH (3. Auflage)
- Aqua dest.
- Centri-Sep Columns (Princeton Separations, Adelphia, N.J., USA)
- DNA-Marker: 1kb, 1000μg (1g/μl; Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 10mM; Eppendorf AG, Hamburg)
- Ethanol (96%)
- Ethidiumbromidlösung (1 l Aqua dest. mit einem Tropfen Ethidiumbromid, 10mg/ml; Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Formamid

- GeneAmp 10x PCR Puffer II (100mM Tris-HCl, 500mM KCl; pH 8,3) Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Lambda DNA-BstE II Digest (C=500 yg/ml)
- LE Agarose
- Lysozym (C=20mg/ml)
- Magnesiumchlorid (25mM; Applied Biosystems, Weiterstadt)
- NaCl-Lösung
- Probenpuffer: 6 fach konzentriert, für 100ml: 250 mg Bromphenolblau, 34 ml Glycerin, 66 ml Aqua dest.
- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- TBE-Puffer: 10xTris/Boric Acid/EDTA Buffer verdünnt mit Aqua dest. im Verhältnis 1:19
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA; pH 8.0)
- Tris-HCL
- VITEK® 2-System (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France)
  - VITEK 2 ID-GPC-Identifizierungskarte
  - VITEK 2-DensiChek-Kit
  - VITEK 2-Carrier

### 2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

- Primer SSU-pro-27f5: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (5pmol/µl, SIGMA-ARK GmbH, Steinheim)
- Primer SSU-pro-907r: 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3' (5pmol/µl, SIGMA-ARK GmbH, Steinheim)
- Primer SSU-pro-519r: 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3' (5pmol/ µl, SIGMA-ARK GmbH, Steinheim)

### 2.1.4 Nährmedien

- Columbia-Schafblutagar
- Brain-Heart-Infusion(BHI)-Bouillon

## 2.1.5 Bakterienstämme

Für die Sequenzdatenbank wurden 21 Typ- bzw. Referenzstämme verwendet. Tabelle 1 gibt diese Stämme zusammen mit der jeweiligen Stammsammlungsbezeichnung wieder. Die klinischen Stämme entstammen der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster und sind in Tabelle 2 zusammen mit ihrer institutsinternen Kennzeichnung und der Lokalisation ihrer Probenentnahme zusammengefasst.

**Tab. 1** Referenzstämme

Spezies	Stammsammlung <sup>a</sup>
<i>Arthrobacter agilis</i>	DSM 20550 (T)
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	DSM 10493 (T)
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	DSM 10495 (T)
<i>Brevibacterium casei</i>	DSM 20657 (T)
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	DSM 20660 (T)
<i>Brevibacterium otitidis</i>	DSM 10718 (T)
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	DSM 43879 (T)
<i>Dermabacter hominis</i>	DSM 7083 (T)
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	DSM 20448 (T)
<i>Kocuria kristinae</i>	DSM 20032 (T)
<i>Kocuria rosea</i>	DSM 20447 (T)
<i>Kocuria varians</i>	DSM 20033 (T)
<i>Kytococcus schroeteri</i>	DSM 13884 (T)
<i>Kytococcus sedentarius</i>	DSM 20547 (T)
<i>Microbacterium resistens</i>	DSM 11986 (T)
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030 (T)
<i>Micrococcus lylae</i>	DSM 20315 (T)
<i>Nesterenkonia halobia</i>	DSM 20541 (T)
<i>Oerskovia turbata</i>	DSM 20577 (T)
<i>Rothia dentocariosa</i>	DSM 43762 (T)
<i>Rothia mucilaginoso</i>	ATCC 25296 (T)

<sup>a</sup> DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig  
ATCC American Type Culture Collection, Manassas, USA  
(T) der verwendete Stamm ist der Typstamm der Spezies

**Tab. 2** Klinische Stämme

<b>Position</b>	<b>Kennzeichnung (institutsintern)</b>	<b>Lokalisation</b>
1	1	Leiste
2	3	Stirn
3	4	Leiste
4	5	Oberschenkel
5	6	Oberschenkel
6	7	Oberschenkel
7	10	Oberschenkel
8	12	Wange
9	13	Achsel
10	15	Achsel
11	17	Leiste
12	18	Oberschenkel
13	19	Achsel
14	23	Leiste
15	24	Leiste
16	26	Stirn
17	29	Achsel
18	37	Leiste
19	38	Unterarm
20	39	Unterarm
21	41	Unterarm
22	42	Leiste
23	48a	Oberschenkel
24	48b	Oberschenkel
25	54	Unterarm
26	57	Leiste
27	63	Oberschenkel
28	65	Unterarm
29	69	Unterarm
30	70	Unterarm
31	72	Leiste
32	73	Leiste
33	75	Oberschenkel

34	82	Unterarm
35	87	Oberschenkel
36	88	Stirn
37	91	Unterarm
38	95	Stirn
39	106	Achsel
40	110	Stirn
41	119	Unterarm
42	123	Oberschenkel
43	125	Oberschenkel
44	127	Stirn
45	146	Stirn
46	147	Achsel
47	149	Leiste
48	150	Oberschenkel
49	151	Stirn
50	153	Unterarm
51	154	Unterarm
52	155	Leiste
53	157	Leiste
54	159	Oberschenkel
55	171	Leiste
56	172	Stirn
57	173	Unterarm
58	175	Unterarm
59	177	Stirn
60	179	Achsel
61	193	Unterarm
62	198	Stirn
63	199	Unterarm
64	200	Oberschenkel
65	201	Leiste
66	205	Oberschenkel
67	206	Gingiva
68	211	Oberschenkel
69	212	Stirn

70	213	Unterarm
71	214	Oberschenkel
72	217	Stirn
73	218	Leiste
74	219	Oberschenkel

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorbereitende Arbeitsschritte

#### 2.2.1.1 Medien und Anzucht der Bakterien

Alle Bakterien wurden auf Blutagarplatten bei 37°C angezogen. Einzige Ausnahme bildet die Anzucht von *Arthrobacter agilis*, die in einer Brain-Heart-Infusion(BHI)-Bouillon bei gleicher Temperatur erfolgte.

#### 2.2.1.2 Extraktion chromosomaler DNA

Bei der Extraktion der chromosomalen DNA aus den Bakterien wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet.

Hierbei wurden zunächst 2-3 Ösen der Bakterienkultur in 180 µl TE-Puffer suspendiert und anschließend 15 µl Lysozym dazugegeben. Die Suspension wurde dann mindestens 30 min

bei 37 °C inkubiert. Um das gebildete Kondenswasser der Lösung zurückzuführen, wurde das Ganze kurz zentrifugiert und -nach Zugabe von 25 µl Proteinkinase K und 200 µl AL-Puffer- 30 min bei 56 °C (Thermomixer Comfort) sowie 5 min bei 95 °C (Techne Dri Block) inkubiert. Anschließend wurde der Suspension 200 µl Ethanol hinzugefügt und die entstandene Lösung sofort gevortext. Der Mix wurde dann auf die QIAamp-Säule gegeben und 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Untersatz gewechselt wurde, wurde 500 µl AW1-Puffer hinzugefügt und erneut 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Der Untersatz wurde dann ein zweites Mal gewechselt und die Suspension wurde nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer 3 min bei 13000 rpm

zentrifugiert. Nach erneutem Wechseln des Untersatzes wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues Gefäß gesetzt und, nachdem 200 µl AE-Puffer (56 °C) zugegeben wurden, 5 min bei 56 °C inkubiert. Abschließend wurde der Mix 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert und die Säule verworfen.

### **2.2.1.3 Photometrische Messung des DNA-Gehaltes**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm mit dem Gene Quant II Photometer. Hierbei wurden 10 µl des Extraktionsproduktes mit 90 µl Tris-HCL-Lösung verdünnt. Als Kontrolle dienten 10 µl Lambda DNA BstE II Digest, die ebenfalls mit 90 µl Tris-HCL verdünnt wurden. Die DNA-Konzentration ist der gemessenen Absorption proportional und errechnete sich folgendermaßen:

$$C_{\text{DNA}} = A_{260} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$C_{\text{DNA}}$ =DNA-Konzentration

$A_{260}$ =Absorption bei  $\lambda=260$  nm

Faktor= 50 µg/ml für dsDNA

Verdünnungsfaktor=10

Als unterer Grenzwert wurde für die gemessene Absorption 0,2 (AV) festgelegt. Zudem wurde für das Verhältnis von gemessener Absorption bei  $\lambda=260$  nm (Abs 1) zu gemessener Absorption bei  $\lambda=280$  nm (Abs 2) ein Grenzbereich von Abs 1/ Abs 2=1.7-2.1 definiert, da außerhalb liegende Werte auf eine Verunreinigung, beispielsweise durch Proteine, hinweisen können. In diesem Fall bzw. bei Unterschreitung des gemessenen Absorptionswertes wurden die jeweiligen Bakterienstämme erneut lysiert.

## 2.2.2 Arbeitsschritte der Sequenzierung

### 2.2.2.1 16S-PCR

Die PCR (polymerase chain reaction, dtsh. Polymerase-Kettenreaktion) ist ein Verfahren, mit dem definierte DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Hierbei kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung, bei der sowohl beide Stränge der Ausgangs-DNA als auch später deren Komplementprodukte als Vorlage dienen. Somit kommt es pro Zyklus zu einer Verdopplung des jeweiligen DNA-Abschnittes.

Bei der 16S-PCR wird der DNA-Abschnitt amplifiziert, der das 16S-rRNA-Molekül kodiert. Das 16S-rRNA-Molekül ist Bestandteil der ribosomalen Struktur und an der Proteinbiosynthese beteiligt.

Die PCR wurde mit einem 50 µl Mastermixansatz durchgeführt, bestehend aus

- 35,75 µl Aqua dest.,
- 1 µl dNTPs,
- 3 µl Magnesiumchlorid,
- 5 µl 10x PCR-Puffer,
- je 2 µl der beiden Primer (27f und 907r),
- 0,25 µl Taq-Polymerase und
- 1 µl DNA.

Um Fehlhybridisierungen zu vermeiden, wurde die DNA per „hotstart“ dazugegeben, der als solcher im Thermocycler vorprogrammiert war. Hierbei erhitze der Thermocycler den Mastermixansatz für 5 min auf 94°C, innerhalb derer man den DNA-Ansatz hinzufügte, um sicherzustellen, dass die Polymerasekettenreaktion erst startet, wenn die erforderliche Reaktionstemperatur erreicht ist und der Primer spezifisch an die DNA gebunden ist. Es folgten eine initiale Denaturierung von 10 sec bei 96°C und anschließend 27 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt (45 sec bei 94°C), einem Hybridisierungsschritt (1 min bei 53°C) und einem Elongationsschritt (1 min 30 bei 72°C). Ein abschließender Elongationsschritt von 10 min bei 72°C beendete den Vorgang und die Reaktion wurde auf 4°C gekühlt.

Ein DNA-Ansatz lief stets als Doppelkontrolle. Als Positivkontrolle diente eine bereits erfolgreich amplifizierte DNA ( $10^4$  Genomäquivalente von *Escherichia coli* 933, HYMS 001), als Negativkontrolle 1 µl Aqua dest..

Für folgende Bakterienstämme wurde aufgrund nicht zu verwertender Ergebnisse bzw. zu niedriger Werte hinsichtlich der nachfolgenden Gelelektrophorese und PCR-Produktkonzentrationsmessung die DNA-Menge auf 5 µl erhöht und dementsprechend die Menge an Aqua dest. auf 31,75 µl reduziert:

-*Micrococcus agilis*

-*Micrococcus halobius*

-*Cellulosimicrobium cellulans*

-*Rothia mucilaginosa* (ehemals *Stomatococcus mucilaginosus*)

-*Kytococcus schroeteri*

-*Micrococcus nishinomiyaensis*

-*Micrococcus sedentarius*

-Klinischer Stamm (KS) 1

-KS 5

-KS 48 b

-KS 69

-KS 82

### **2.2.2.2 PCR-Produktaufreinigung**

Zur Reinigung des PCR-Produktes wurde das Millipore Multiscreen Separations System verwendet.

Hierbei wurde zunächst die Mikrotiterplatte bis auf die zu benutzenden Kavitäten abgeklebt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Aqua dest. auf 100 µl Volumen aufgefüllt und in die Mikrotiterplatte überführt, welche dann auf den mitgelieferten Manifold, einem Filtrationsgerät mittels Vakuumsaugung, gestellt wurde. Im nächsten Schritt wurde der Manifold geschlossen, der Druckregler geöffnet und die Vakuumpumpe angestellt. Nachdem der Manifold geöffnet wurde, wurde die Mikrotiterplatte bis zum Aufbau des Vakuums fest angedrückt, wobei der Sog über den Druckregler reguliert wurde, so dass ein kontinuierlicher Druck von 20-25 mmHg

entstand. Die Proben wurden so 3 min über die Membran durchgesaugt. Anschließend wurde der Manifold wieder geschlossen, die Vakuumpumpe abgestellt und das Ventil mit dem Druckregler geöffnet. Es folgte ein Waschschrift, bei dem 100 µl Aqua dest. auf die Membran gegeben und der Filtrationsvorgang wiederholt wurden. Danach wurden 50 µl Aqua dest. auf die Membran gegeben und die Proben 5 min auf dem Schütteltisch bei höchster Geschwindigkeit eluiert. Abschließend wurden die 50 µl Lösungen in saubere Gefäße überführt.

### **2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer**

Um einen Aussagewert über den DNA-Gehalt der aufgereinigten PCR-Produkte zu erhalten, wurde dieser analog der bereits erwähnten DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer (siehe unter 2.2.1.3) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm gemessen, wobei 10 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 90 µl HPLC verdünnt wurden.

### **2.2.2.4 Gießen des Gels**

Bei der nachfolgende Gelelektrophorese wurden Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung dieses Gels wurden zunächst 1050 mg LE Agarose in 70 ml 0.5% TBE-Puffer-Lösung gegeben. Anschließend wurde das Gemisch mit Hilfe eines Magnetrührers bei 200 rpm und 200°C aufgeheizt und 30 sec sprudelnd gekocht, so dass die Agarose sich löste. Nachdem die Lösung 5 min stehengelassen wurde, um die richtige Gießtemperatur zu erhalten, wurde mit Hilfe eines Gelschlittens und zweier Laufkämme ein Gel mit Taschen gegossen, welches dann 30 min stehengelassen wurde.

### **2.2.2.5 Gelelektrophorese**

Nach Fertigstellung des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer gegeben und so viel TBE-Puffer-Lösung hinzugefügt, dass das Gel knapp bedeckt wurde. Anschließend wurden die DNA-Ansätze bestehend aus jeweils 8 µl der gereinigten PCR-Produkte und 2 µl Probenpuffer in die Geltaschen gegeben. Als Kontrolle diente ein Markeransatz aus 9,5 µl Aqua dest., 2 µl Probenpuffer und 0,5 µl DNA-Marker (1kb).

Die Proben wurden bei einer Spannung von 110 Volt 40 min laufengelassen.

### **2.2.2.6 Färben des Gels**

Nach Durchlauf der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in Ethidiumbromidlösung abgedeckt stehengelassen, da Ethidiumbromid lichtempfindlich ist, kurz mit demineralisiertem Wasser abgespült und anschließend 20 min in demineralisiertem Wasser abgedeckt stehengelassen.

Unter UV-Licht wurden die Banden dargestellt und fotografiert.

### **2.2.2.7 Sequenzierungs-PCR**

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit dem ABI Prism BigDye Terminator v3.0 24RR Cycle Sequencing Kit erneut amplifiziert. Bei dieser linearen Amplifizierung wurde im Gegensatz zum oben beschriebenen PCR-Verfahren nur ein Primer eingesetzt. Die Didesoxynukleotide (ddNTPs) sind entsprechend den unterschiedlichen Nukleotiden mit verschiedenen Farbstoffen markiert und verursachen eine vorzeitige Strangterminierung. Die Amplifikation wurde für jede Probe mit jeweils einem forward und einem reverse Primer durchgeführt. Zur Anwendung kamen die Primer 16S-27f und 16S-519r.

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit einem 10 µl Ansatz bestehend aus

- 0,5 µl Premix
- 1,8 µl 5x Puffer
- 2,0 µl Primer (5 pmol/µl)
- PCR-Produkt (100 ng DNA, je nach gemessener DNA-Konzentration)
- evtl. Aqua dest. (bei Unterschreiten von 10 µl Ansatz)

durchgeführt. Bei niedriger DNA-Konzentration konnte es zu einem Überschreiten von 10 µl Ansatz kommen. In diesem Fall wurde das erforderliche Volumen des PCR-Produktes (100 ng DNA) im Eppendorf Concentrator bei 45°C (Richtwert 15 min/10 µl) konzentriert, die Probe anschliessend mit 5,7 µl Aqua dest. aufgefüllt und den oben genannten Mengen an Premix, Puffer und Primer hinzugefügt.

Die PCR erfolgte im Thermocycler in 24 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt von 10 sec bei 94°C, einem Hybridisierungsschritt von 5 sec bei 33°C und einem Elongationsschritt von 4 min bei 60°C. Abschließend wurden die Proben auf 10°C heruntergekühlt.

### **2.2.2.8 Aufreinigung der Sequenzierproben**

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR wurden die erhaltenen PCR-Produkte mittels Centri-Sep Columns von nicht-inkorporierten ddNTPs gereinigt.

Zunächst wurde für jede Probe eine Säule mit jeweils 800 µl HPLC angesetzt, kurz anzentrifugiert und dann für 2 h ruhig stehengelassen. Anschließend wurden die Säulen in die Waschtubes gestellt, so dass überschüssige Flüssigkeit abtropfen konnte. Diese Flüssigkeit wurde verworfen und die Säulen in den Waschtubes 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Waschtubes entfernt und die Säulen auf die Sample Collection Tubes gesetzt. Nachdem das Sequenzierungs-PCR-Produkt mittig auf die Säulen gegeben wurde, wurden die Proben erneut 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Abschließend wurden die Säulen verworfen und das erhaltene Produkt im Eppendorf Concentrator 15 min bei 45°C konzentriert.

Vor der automatisierten Sequenzierung im ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer wurden die Proben in jeweils 20 µl Formamid gelöst.

### **2.2.2.9 Auswertung der Sequenzdaten**

Für die Sequenzanalyse war die 16S-rDNA-Region zwischen und einschließlich den Basenpositionen 54 und 510, entsprechend den 16S-rDNA-Positionen bei *Escherichia coli*, maßgebend.

Zur Berechnung der paarweisen Sequenzabstände und Alignments wurde das Clustal W-Programm [95] verwendet, welches über die Website des European Bioinformatics Institute (EBI) unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> freizugänglich ist. Um einen Hinweis über die Qualität der Sequenzen der Datenbank zu erhalten, wurden diese über die Homepage des National Center for Biotechnology Information mit Sequenzen aus der GenBank-Datenbank [14] durch das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [2] verglichen (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). Anschließend wurden die Sequenzen

der klinischen Stämme mit denen der erhaltenen Datenbank kontrolliert. Die Datenbank wurde als Teil des Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM)-Projektes [44] angelegt.

Das phylogenetische Dendrogramm wurde mit dem Programm QAlign [80] erstellt, welches zu diesem Zeitpunkt (08/2003) im Internet über <http://www.ridom.de/qalign/> feizugänglich war.

### **2.2.3 Biochemische Identifizierungssysteme von Bakterien**

Um eine Vergleichsmöglichkeit über die Qualität und die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhalten, wurden diese mit den Ergebnissen zweier kommerziell verfügbarer Identifizierungssysteme verglichen, die auf biochemischen Testmethoden und einer Datenbasis zur Auswertung beruhen. Es handelte sich hierbei zum einen um das API STAPH-System und zum anderen um das VITEK 2-System.

#### **2.2.3.1 API STAPH**

Beim API STAPH-System der Firma bioMérieux handelt es sich um ein System zur Identifizierung von Vertretern der Gattungen *Staphylococcus* und *Micrococcus* anhand von standardisierten und miniaturisierten, biochemischen Tests und einer spezifischen Datenbasis zur Auswertung der biochemischen Reaktionen.

Zunächst wurden zur Herstellung einer feuchten Kammer 5 ml Aqua dest. in die Inkubationswanne gegeben und dann ein Teststreifen in die Wanne gelegt. Die für den Test benötigten Bakterienkolonien wurden auf Blutagar kultiviert und in den API STAPH-Mediumampullen suspendiert. Die Trübung der Suspension wurde mit Hilfe eines Densitometers auf 0,5 nach McFarland eingestellt. Anschließend wurden die Röhrchen des Teststreifens mit der Suspension mittels Pipette beimpft. Die Tests Urea (URE, dtsh. Harnstoff) und Arginine Dihydrolase (ADH) wurden jeweils mit 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Daraufhin wurden die Teststreifen 24 Std. bei 37°C inkubiert.

Die Ablesung der Reaktionsergebnisse des Teststreifens erfolgte visuell anhand der Ablesetabelle. Wie vorgegeben wurde für den Nachweis der folgenden Reaktionen jeweils 1 Tropfen der folgenden Reagenzien zugegeben:

- Voges-Proskauer(VP)-Test: VP 1 und VP 2
- Nitratreduktions(NIT)-Test: NIT 1 und NIT 2
- Alkalische Phosphatase(PAL)-Test: Enzym (ZYM) A und Enzym B

Die Identifizierung erfolgte nach der visuellen Ablesung anhand des Analytischen-Profil-Indexes für API STAPH (3. Auflage), wobei die Reaktionen in Form eines numerischen Profils kodiert wurden. Dieses Profil wird von zwei Indices begleitet, zum einen dem Prozentwert der Identifizierung (%ID), der die relative Wahrscheinlichkeit des Profils verglichen mit allen Taxa der Datenbasis anzeigt und zum anderen dem T-Index, der die relative Wahrscheinlichkeit des Profils innerhalb eines Taxons ausdrückt. Die erhaltenen Werte wurden anschließend in folgende Kategorien eingeteilt:

-ausgezeichnete Identifizierung	(%ID $\geq$ 99.9 und T $\geq$ 0.75)
-sehr gute Identifizierung	(%ID $\geq$ 99.0 und T $\geq$ 0.5)
-gute Identifizierung	(%ID $\geq$ 90.0 und T $\geq$ 0.25)
-akzeptierte Identifizierung	(%ID $\geq$ 80.0 und T $\geq$ 0)

Resultate unterhalb dieser Werte wurden als unakzeptabel eingestuft.

### **2.2.3.2 VITEK 2 ID-GPC**

Beim VITEK 2-System, ebenfalls von der Firma bioMérieux hergestellt, handelt es sich um ein Verfahren zur automatischen Identifizierung und Resistenz-Testung grampositiver Keime. Wie auch das API STAPH-System basiert es auf biochemischen Testmethoden und einer spezifischen Datenbasis zur Auswertung der Ergebnisse der biochemischen Reaktionen.

Die auf Blutagar kultivierten Bakterienkolonien wurden in 3 ml einer sterilen Kochsalzlösung (laut Anleitung 0,45-0,5 % NaCl, pH 5,0-7,2) suspendiert und die Dichte der Suspension mittels DensiChek auf 0,5 nach McFarland eingestellt. Anschließend wurde das Suspensionsröhrchen mit der ID-GPC-Karte in den Carrier gestellt, welcher dann in das VITEK 2-Gerät überführt wurde.

Die Identifizierung erfolgte automatisch anhand der Vitek 2-Software (Version 3.01). Auch hier wurden die Ergebnisse mittels des Prozentwertes der Identifizierung und des T-Indexes sowie der obengenannten Kategorisierung angegeben.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM)-Projektes für 21 Typ- und Referenzstämme verschiedener Familien der Unterordnung *Micrococcineae* sowie 74, nach alter Nomenklatur phänotypisch als Mikrokokken identifizierte, klinische Isolate eine 5'-16S-rDNA-Sequenzierung durchgeführt.

Anhand der Typ- und Referenzsequenzen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Referenzsequenzdatenbank erstellt. Um einen Hinweis auf die Qualität der Typ- und Referenzsequenzen zu erhalten, wurden diese mit Sequenzen aus der GenBank-Datenbank verglichen (Stand 08/2003).

Die Sequenzen der klinischen Isolate wurden anschließend anhand der Referenzsequenzdatenbank kontrolliert und ausgewertet, wobei für die Sequenzanalyse die 16S-rDNA-Region zwischen und einschließlich den Basenpositionen 54 und 510, entsprechend den 16S-rDNA-Positionen bei *Escherichia coli*, maßgebend war.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden mit denen zweier kommerziell verfügbarer Identifizierungssysteme verglichen, die auf biochemischen Testmethoden und einer Datenbasis zur Auswertung beruhen. Es handelte sich hierbei um das API STAPH- und das VITEK 2-System.

#### 3.1 Vergleich der Referenzsequenzen mit GenBankeinträgen

Um einen Hinweis auf die Qualität der Typ- und Referenzsequenzen zu erhalten, wurden diese mit Sequenzen aus der GenBank-Datenbank verglichen (Stand 08/2003). Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Sequenzvergleichs, wobei nur die Suchergebnisse ab 99%iger Übereinstimmung berücksichtigt wurden. Diese Grenze wurde später auch für den Vergleich zwischen den Sequenzen der klinischen Isolate und den Referenzsequenzen festgelegt und umfasst den Toleranzbereich, innerhalb dessen in der vorliegenden Arbeit von einer Identifizierung auf Spezieslevel ausgegangen wurde.

11 der 21 Referenzsequenzen (52,4%) wurden in der GenBank-Datenbank mit 100%iger Übereinstimmung nach aktueller Nomenklatur identifiziert. Es handelt sich hierbei um folgende Spezies: *Arthrobacter cummingsii*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brevibacterium otitidis*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria*

*varians*, *Kytococcus schroeteri*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Oerskovia turbata* und *Rothia dentocariosa*. Weitere drei Spezies (14,3%) - *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium epidermidis* und *Dermabacter hominis* - wurden mit 99%iger Übereinstimmung nach aktueller Nomenklatur identifiziert. Insgesamt wurden sieben Referenzsequenzen nach alter Nomenklatur richtig erkannt (33,3%). Mit 100%iger Übereinstimmung wurden *Arthrobacter agilis* als *Micrococcus agilis*, *Nesterenkonia halobia* als *Micrococcus halobius* und *Kocuria rosea* als *Kocuria erythromyxa* identifiziert (14,3%). Die ehemals dem Genus *Deinococcus* angehörige Spezies *Kocuria erythromyxa* [76] gehört mittlerweile der Spezies *Kocuria rosea* an [81]. Mit 99%iger Übereinstimmung wurden *Dermacoccus nishinomiyaensis* als *Micrococcus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius* als *Micrococcus sedentarius*, *Microbacterium resistens* als *Aureobacterium resistens* und *Rothia mucilaginosus* als *Stomatococcus mucilaginosus* richtig bestimmt (19,0%).

*Oerskovia turbata* wurde sowohl nach aktueller Nomenklatur als auch als *Cellulomonas turbata* mit 100%iger Übereinstimmung und als *Cellulomonas*-Spezies mit 99%iger Übereinstimmung identifiziert. *Brevibacterium otitidis* wurde zusätzlich zur exakten Identifizierung mit 100%iger Übereinstimmung als *Brevibacterium*-Spezies bestimmt. Zehn Suchergebnisse beinhalteten als zusätzliche Information die jeweilige Stammsammlungsbezeichnung. Neun dieser Stämme stimmten mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämmen überein, wobei die für *Kocuria varians* angegebene Bezeichnung ATCC 15306 der American Type Culture Collection denselben Stamm beschreibt wie den in der vorliegenden Arbeit unter der Bezeichnung DSM 20033 der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH verwendeten. Von diesen neun Stämmen wurden sechs mit 100%iger Übereinstimmung richtig identifiziert. *Kocuria varians* (DSM 20033 und ATCC 15306), *Micrococcus luteus* (DSM 20030) und *Micrococcus lylae* (DSM 20315) wurden nach aktueller Nomenklatur, *Arthrobacter agilis* (DSM 20550) als *Micrococcus agilis*, *Nesterenkonia halobia* (DSM 20541) als *Micrococcus halobius* und *Oerskovia turbata* (DSM 20577) als *Cellulomonas turbata* wurden nach alter Nomenklatur richtig bestimmt. Drei weitere Stämme wurden unter gleicher Stammsammlungsbezeichnung mit 99%iger Übereinstimmung identifiziert: *Brevibacterium epidermidis* (DSM 20657), *Kocuria kristinae* (DSM 20032) und *Kocuria varians* (DSM 20033).

Das Suchergebnis für *Cellulosimicrobium cellulans* (DSM 43879) beinhaltete die Stammsammlungsbezeichnung in der GenBank-Eintragsnummer. Die Sequenzanalyse erbrachte eine Übereinstimmung von 100%.

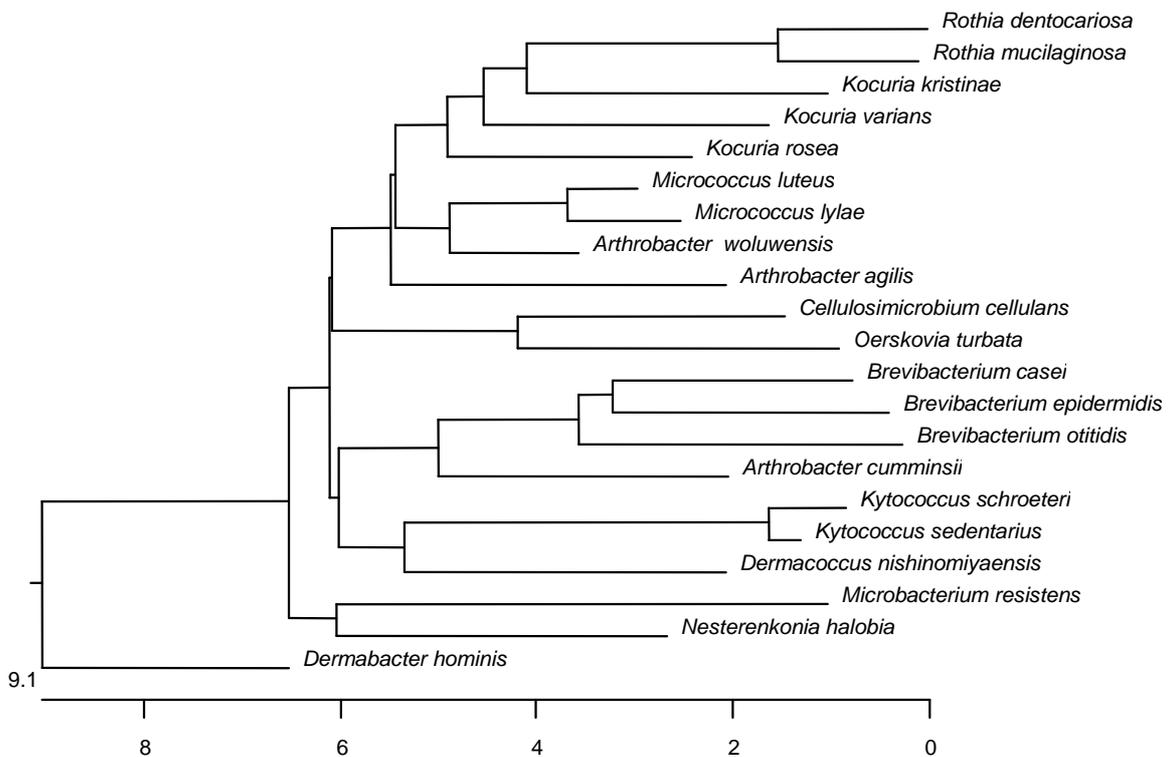
**Tab. 4** GenBank-Suchergebnisse

Spezies	Stamm-sammlungs-nummer	GenBank-Suchergebnisse mit Accession-Number	Stamm-sammlungs-bezeichnung
<i>Arthrobacter agilis</i>	DSM 20550	<i>Micrococcus agilis</i> 100% X80748	DSM 2550
<i>Arthrobacter cummingsii</i>	DSM 10493	<i>Arthrobacter cummingsii</i> 100% X93354	
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	DSM 10495	<i>Arthrobacter woluwensis</i> 100% X93353	
		<i>Arthrobacter woluwensis</i> 100% AY112986	
<i>Brevibacterium casei</i>	DSM 20657	<i>Brevibacterium casei</i> 99% AF510045	
		<i>Brevibacterium casei</i> 99% X76564	
		<i>Brevibacterium casei</i> 99% AJ251418	DSM 20657
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	DSM 20660	<i>Brevibacterium epidermidis</i> 99% X76565	
<i>Brevibacterium otitidis</i>	DSM 10718	<i>Brevibacterium otitidis</i> 100% AF133534	
		<i>Brevibacterium</i> sp. 100% D88212	
		<i>Brevibacterium otitidis</i> 99% X93593	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	DSM 43879	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 100% DSM 43879	
<i>Dermabacter hominis</i>	DSM 7083	<i>Dermabacter hominis</i> 99% X76728	
		<i>Dermabacter hominis</i> 99% AF343728	
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	DSM 20448	<i>Micrococcus nishinomiyaensis</i> 99% X87757.1	
<i>Kocuria kristinae</i>	DSM 20032	<i>Kocuria kristinae</i> 100% AF501368	
		<i>Kocuria kristinae</i> 100% AJ316579	
		<i>Kocuria kristinae</i> 99% X80749	DSM 20032
<i>Kocuria rosea</i>	DSM 20447	<i>Kocuria erythromyxa</i> 100% Y11330	ATCC 187T
		<i>Micrococcus roseus</i> 99% X87756	
<i>Kocuria varians</i>	DSM 20033	<i>Kocuria varians</i> 100% AF542074	ATCC 15306
		<i>Micrococcus varians</i> 99% X87754	DSM 20033
<i>Kytococcus schroeteri</i>	DSM 13884	<i>Kytococcus schroeteri</i> 100% AJ297722.1	
<i>Kytococcus sedentarius</i>	DSM 20547	<i>Micrococcus sedentarius</i> 99% X87755	
<i>Microbacterium resistens</i>	DSM 11986	<i>Aureobacterium resistens</i> 99% Y14699	
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030	<i>Micrococcus luteus</i> 100% AJ536198	DSM 20030
		<i>Micrococcus luteus</i> 99% AJ309917	

<i>Micrococcus lylae</i>	DSM 20315	<i>Micrococcus lylae</i> 100% X80750	DSM 20315
<i>Nesterenkonia halobia</i>	DSM 20541	<i>Micrococcus halobius</i> 100% X80747	DSM 20541
<i>Oerskovia turbata</i>	DSM 20577	<i>Oerskovia turbata</i> 100% X79454	
		<i>Cellulomonas turbata</i> 100% X83806	DSM 20577
		<i>Cellulomonas</i> sp. 99% AF237956	
<i>Rothia dentocariosa</i>	DSM 43762	<i>Rothia dentocariosa</i> 100% AF543284	
		<i>Rothia dentocariosa</i> 100% AF543278	
		<i>Rothia dentocariosa</i> 100% AF543277	
		<i>Rothia dentocariosa</i> 100% AF543276	
<i>Rothia mucilaginoso</i>	ATCC 25296	<i>Stomatococcus mucilaginosus</i> 99% X95483.1	

Abbildung 3 zeigt anhand eines Dendrogramms, basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten 16S-rDNA-Sequenzen, die phylogenetischen Positionen und Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den verwendeten Referenz- und Typstämmen.

**Abb. 3** Phylogenetisches Dendrogramm basierend auf den im Rahmen des RIDOM-Projektes ermittelten 16S-rDNA-Sequenzen. Als Outgroup wurde *Dermabacter hominis* verwendet. Die Skala bezieht sich auf die jeweiligen Basenunterschiede in Prozent.



### 3.2 Sequenzanalyse der klinischen Isolate anhand der Referenzsequenzen

Die Sequenzen der klinischen Isolate wurden anhand der Referenzsequenzen analysiert und ausgewertet.

Die klinischen Isolate entstammen der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster. Sie wurden aus Haut- und Schleimhautabstrichen gewonnen und nach alter Nomenklatur phänotypisch als Mikrokokken identifiziert. Die Identifizierung als *Micrococcus*-Spezies basierte auf morphologischen Merkmalen nach Gramfärbung mit großen grampositiven Kokken in Tetraden oder in Traubenlagerung sowie aerobem Wachstum von katalasepositiven, gewöhnlich runden, glatt begrenzten, pigmentierten Kolonien auf Furazolidonagar. Zur Differenzierung gegenüber Staphylokokken wurde das Resistenzverhalten gegenüber Lysostaphin, Bacitracin und gegenüber Lysozym getestet.

Für die Identifizierung auf Spezieslevel wurde hinsichtlich der Sequenzanalyse der klinischen Isolate die Grenze bei 99% festgelegt, da alle im Rahmen dieser Arbeit qualitätskontrolliert getesteten Typ- und Referenzstämme mindestens eine 99%ige Übereinstimmung zu den GenBank-Datenbankeinträgen aufwiesen. 38 der 74 klinischen Isolate (51,4%) wurden anhand der Referenzsequenzen innerhalb dieses Grenzbereiches identifiziert, wobei für drei dieser Isolate (4,1%) das Ergebnis bei 100% lag. Für 14 weitere Stämme (18,9%) lag das Sequenzanalyseergebnis innerhalb einer Grenze von 98%, so dass insgesamt 52 der 74 klinischen Isolate (70,3%) in diesem Bereich identifiziert werden konnten. Zwei Stämme (2,7%) kamen hinzu, wenn man eine 97%ige Übereinstimmung zugrunde legte. Insgesamt 54 der 74 klinischen Isolate (73,0%) konnten innerhalb eines Wertebereichs von 97-100% identifiziert werden. Insgesamt lag der Mittelwert bei 97,8%. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzanalyse.

Von den 74 klinischen Isolaten wurden mit jeweils höchster Ähnlichkeit (Übereinstimmung 86,46-100%) insgesamt 38 der Spezies *Micrococcus luteus* (51,4%), 16 der Spezies *Kocuria varians* (21,6%) und 15 der Spezies *Kocuria rosea* (20,3%) zugeordnet. Für jeweils zwei Stämme (2,7%) hatten die Sequenzen der Spezies *Kocuria*

*kristinae* und *Dermabacter hominis* den höchsten Übereinstimmungswert. Ein Stamm wurde der Spezies *Rothia mucilaginosa* zugeordnet (1,4%).

36 der 38 der Spezies *Micrococcus luteus* zugeordneten Isolate (94,7%) hatten Ergebnisse oberhalb der festgelegten Grenze von 99%, wobei für zwei Stämme eine Übereinstimmung von 100% gefunden wurde (5,3%). Die Ergebnisse der beiden übrigen Stämme lagen oberhalb eines Übereinstimmungswertes von 98%. Von den 16 der Spezies *Kocuria varians* zugeordneten Stämmen lag kein Ergebnis innerhalb eines Grenzwertes von 99%. 12 dieser Stämme (75,0%) wurden mit einem Ergebnis oberhalb von 98% zugeordnet, zwei weitere (12,5%) mit einem Ergebnis oberhalb von 97%. Einer der 15 der Spezies *Kocuria rosea* zugeordneten Stämme wurde mit einer Übereinstimmung von mehr als 99% bestimmt. Die Werte der 14 übrigen Stämme lagen in einem Intervall zwischen 94,98 und 95,08%. *Kocuria kristinae* wurde für einen Stamm mit einer Übereinstimmung von 100% identifiziert, ein weiterer hatte ein Ergebnis von 86,46%. Die Werte der beiden als *Dermabacter hominis* bestimmten Stämme lagen bei 91,38%. *Rothia mucilaginosa* wurde mit einer Übereinstimmung von 94,53% zugeordnet.

**Tab. 5** Ergebnisse der Sequenzanalyse der klinischen Isolate (n=74) anhand der Referenzsequenzen\*

Isolatsbezeichnung	Höchste Sequenzübereinstimmung	Übereinstimmung (in %)
1	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
3	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
4	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,54
5	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
6	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,54
7	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
10	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
12	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
13	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
15	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
17	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
18	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,07
19	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31

23	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
24	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
26	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>95,06</b>
29	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
37	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
38	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
39	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>97,29</b>
41	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
42	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
48a	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
48b	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
54	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
57	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
63	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,08
65	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
69	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
70	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
72	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
73	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
75	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
82	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,63</b>
87	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
88	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	99,77
91	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
95	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
106	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
110	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,31
119	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	100,00
123	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
125	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
127	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
146	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,64</b>
147	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
149	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,41</b>
150	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,64</b>
151	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,18</b>

153	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,18</b>
154	<i>Kocuria kristinae</i> D 20032	100,00
155	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,13</b>
157	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
159	<i>Rothia mucilaginosa</i> A 25296	<b>94,53</b>
171	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
172	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,63</b>
173	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,63</b>
175	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>94,77</b>
177	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,54
179	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	<b>98,85</b>
193	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	100,00
198	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	<b>98,36</b>
199	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>96,36</b>
200	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,08
201	<i>Micrococcus luteus</i> D 20030	99,77
205	<i>Kocuria kristinae</i> D 20032	<b>86,46</b>
206	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,41</b>
211	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>97,28</b>
212	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,63</b>
213	<i>Kocuria varians</i> D 20033	<b>98,63</b>
214	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
217	<i>Kocuria rosea</i> D 20447	<b>94,98</b>
218	<i>Dermabacter hominis</i> D 7083	<b>91,38</b>
219	<i>Dermabacter hominis</i> D 7083	<b>91,38</b>

\*Übereinstimmung unterhalb des Grenzwertes von 99% in Fett

### 3.3 Identifizierung der klinischen Isolate anhand des API STAPH-Systems

Die klinischen Isolate wurden anhand des API STAPH-Systems V 4.0 (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein System zur Identifizierung von Vertretern der Gattungen *Staphylococcus* und *Micrococcus*, basierend auf standardisierten und miniaturisierten, biochemischen Tests und einer spezifischen Datenbasis zur Auswertung der biochemischen Reaktionen. Neben den verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies beinhaltet die Datenbank hinsichtlich der aus

dem Genus *Micrococcus* hervorgegangenen Gattungen nach aktueller Nomenklatur die Spezies *Kocuria kristinae* und als Spezies-Gruppierung zusammengefasst die Spezies *Kocuria varians* und *Kocuria rosea*. Als weitere Spezies-Gruppierung umfasst die Bezeichnung *Micrococcus* spp. nach aktueller Nomenklatur die Spezies *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius*, *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae*. Für die Identifizierung mit dem API STAPH-System werden die biochemischen Reaktionen in ein siebenstelliges, numerisches Profil umgewandelt, welches dann in der Datenbank, dem sogenannten Analytischen Profil Index, nachgeschlagen werden kann. Die biochemischen Reaktionen sind in sieben Gruppen unterteilt. Die Kombination der biochemischen Reaktionen einer Gruppe codiert für eine bestimmte Ziffer innerhalb des siebenstelligen Profils. Zusammen ergeben die Ziffern der sieben Gruppen dann das Profil. Das jeweilige Ergebnis drückt sich in zwei Indices aus, zum einen im Prozentwert der Identifizierung und zum anderen im T-Index. Der Prozentwert der Identifizierung (%ID) zeigt die relative Wahrscheinlichkeit des Profils, verglichen mit allen Taxa der Datenbasis, an. Der T-Index drückt die relative Wahrscheinlichkeit des Profils innerhalb eines Taxons aus. Abhängig von den Indices werden die Ergebnisse in verschiedene Kategorien eingeteilt:

-ausgezeichnete Identifizierung	(%ID $\geq$ 99.9 und T $\geq$ 0.75)
-sehr gute Identifizierung	(%ID $\geq$ 99.0 und T $\geq$ 0.5)
-gute Identifizierung	(%ID $\geq$ 90.0 und T $\geq$ 0.25)
-akzeptierte Identifizierung	(%ID $\geq$ 80.0 und T $\geq$ 0)

Ergebnisse unterhalb dieser Werte werden als unakzeptabel eingestuft. Wenn ein Profil zwei oder mehr Taxa verschiedener Genera zugeordnet werden kann, wird es als Ergebnis mit „geringer Selektivität“ bewertet. Ist ein Profil sehr atypisch bzw. sehr selten wird es als „unzuverlässig“ oder „zweifelhaft“ eingestuft. Kann ein Profil eher einem Genus als einer Spezies zugeordnet werden, folgt auf die Bewertung des Profils der Zusatz „auf Genusebene“.

Die Auswertung der Reaktionsergebnisse der API-Teststreifen erfolgte visuell anhand der mitgelieferten Ablesetabelle. Tabelle 6 gibt einen Gesamtüberblick über die Ergebnisse der API STAPH-Identifizierung.

Für 36 der 74 klinischen Isolate (48,6%) konnte den biochemischen Reaktionen kein eindeutiges Profil zugewiesen werden, da die Reaktionsergebnisse anhand der Ablesetabelle mehrdeutig waren und nicht sicher ausgewertet werden konnten. Bei 27 der 74 Stämme (36,5%) mussten zwei Profile in Betracht gezogen werden. Acht Stämme (10,8%) konnten aufgrund der Mehrdeutigkeit der Reaktionsergebnisse und der resultierenden vier Profile nicht eindeutig identifiziert werden. Für einen Stamm (1,6%) kamen acht Profile in Betracht. 15 Stämme mit zweideutigem Profil wurden dabei innerhalb der Wertegrenzen übereinstimmend identifiziert, wobei zehn als *Micrococcus* spp., vier als *Kocuria varians/Kocuria rosea* und einer als *Kocuria kristinae* bestimmt wurden. Für weitere sechs der 27 klinischen Isolate, die anhand von zwei Profilen bestimmt werden mussten, brachte die Auswertung der Profile ein übereinstimmendes Identifizierungsergebnis, sofern man bei Profilen „geringer Selektivität“ das Taxon mit der höchsten Wahrscheinlichkeit berücksichtigte. Hierbei wurden fünf Stämme als *Kocuria varians/Kocuria rosea* und ein Stamm als *Micrococcus* spp. identifiziert. Der Stamm mit der Kennzeichnung 219 wurde über beide Profile als *Staphylococcus lentus* identifiziert, die Ergebnisse wurden allerdings mit „zweifelhaft“ bzw. „unakzeptable“ bewertet. Die fünf anderen Stämme, bei denen zwei Profile in Betracht gezogen werden mussten, brachten mehrdeutige Ergebnisse, wenn man bei mehreren Vorschlägen für ein Profil lediglich das Taxon mit der höchsten Wahrscheinlichkeit berücksichtigte. Der Stamm mit der Kennzeichnung 155 wurde sowohl als *Staphylococcus capitis* als auch der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea* zugehörig identifiziert. Die Stämme mit den Kennzeichnungen 159 und 175 wurden als *Staphylococcus lugdunensis* und *Kocuria kristinae* bestimmt. Für den Stamm 205 kam sowohl *Staphylococcus epidermidis* als auch *Kocuria kristinae* als Ergebnis in Betracht. Der Stamm 218 wurde als *Staphylococcus capitis* und als *Kocuria kristinae* identifiziert. Drei der acht Stämme (Kennzeichnung 1, 87, 154), für die vier Profile berücksichtigt werden mussten, brachten ein übereinstimmendes Identifizierungsergebnis, sofern man bei Ergebnissen außerhalb der akzeptierten Wertegrenzen das Resultat mit der höchsten Wahrscheinlichkeit berücksichtigte. Die

Ergebnisse der übrigen Isolate mit mehr als zwei Profilen waren mehrdeutig, so dass insgesamt elf Stämme aufgrund mehrdeutiger API STAPH-Profile bei nicht übereinstimmenden Identifizierungsergebnissen nicht weiter bestimmt werden konnten. Für 38 der 74 klinischen Isolate (51,4%) konnte den biochemischen Reaktionen ein eindeutiges Profil zugewiesen werden, von denen 31 (41,9%) ein eindeutiges Ergebnis lieferten. Die Identifizierung von sechs dieser Stämme (8,1%) wurden als „ausgezeichnet“ bewertet. 16 Stämme (21,6%) wurden in der Kategorie „sehr gut“ bestimmt, acht (10,8%) in der Kategorie „gut“. Für einen Stamm (1,4%) wurde das Profil mit „akzeptabel“ bewertet. Die Profile von sieben Stämmen (9,5%) zeigten eine niedrige Selektivität und lieferten mehrdeutige Ergebnisse. Insgesamt wurden 24 Stämme mit einem eindeutigen Ergebnis als *Micrococcus* spp., sechs Stämme als *Kocuria varians/Kocuria rosea* und ein Stamm als *Kocuria kristinae* identifiziert. Alle sechs der als „ausgezeichnet“ bewerteten Stämme wurden als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. zugehörig identifiziert, die die Spezies *Dermaococcus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius*, *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae* umfasst. Mit „sehr gut“ wurden 11 Vertreter der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. und fünf Vertreter der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea* bestimmt. Sieben Stämme wurden mit „gut“ als *Micrococcus* spp. identifiziert und einer mit „gut“ als der *Kocuria varians/Kocuria rosea*-Gruppe zugehörig. Ein klinisches Isolat wurde mit der Bewertung „akzeptabel“ als *Kocuria kristinae* bestimmt. Von den sieben Profilen, dem zwei oder mehr Taxa verschiedener Genera zugeordnet wurden und deren Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ zeigten, hatten vier die Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. als wahrscheinlichstes Ergebnis, drei die Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea*. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Verteilung der Identifizierungsergebnisse.

**Tab. 6** Ergebnisse der Identifizierung der klinischen Isolate anhand des API STAPH-Systems

Isolatsbezeichnung	API-Code <sup>a</sup>	Bewertung	Prozentwert der Identifizierung/ T-Index <sup>b</sup>
1	6002002	gut	Koc.varians/rosea 98% T=0.73
	6002006	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.94
	6006002	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 87% T=0.51
			Staph.capitis 10.8% T=0.50
6006006	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.71	
3	0004002	sehr gut	M.spp 99.9% T=0.56
	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
4	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
5	0004106	gut	M.spp 98.8% T=0.40
6	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
7	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
10	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
	0004106	gut	M.spp 98.8% T=0.40
12	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
13	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
15	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
17	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
18	0006004	gut	M.spp 98.5% T=0.70
19	0006104	geringe Selektivität	M.spp 89.5% T=0.37
			Koc.varians/rosea 10.4% T=0.27
23	0000004	sehr gut	M.spp 99.8% T=1.00
24	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
26	6006110	gut	Staph.capitis 95.4% T=0.69
	6006114	gut	Koc.varians/rosea 97.6% T=0.37
	6106110	gut	Staph.capitis 97.9% T=0.79
	6106114	akzeptabel	Koc.kristinae 78.2% T=0.28
			Koc.varians/rosea 13.7% T=0.19
	6206110	gut	Staph.epidermidis 53.7% T=0.63
			Staph.capitis 30.1% T=0.67
			Staph.hominis 14.9% T=0.68
	6206114	unzuverlässig	Koc.kristinae 65.7% T=0.15
			Staph.epidermidis 13.7% T=0.13
			Koc.varians/rosea 8.7% T=0.04
			Staph.capitis 7.6% T=0.17
			Staph.hominis 3.8% T=0.18
6306110	gut auf Genusebene	Staph.epidermidis 47.9% T=0.69	
		Staph.capitis 45.2% T=0.77	
6306114	gut	Koc.kristinae 98% T=0.44	

29	6006000	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57
			Staph.capitis 08.6% T=0.54
	6006004	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77
37	0004106	gut	M.spp 98.8% T=0.40
38	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
39	6006000	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57
			Staph.capitis 08.6% T=0.54
	6006004	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77
	6006100	geringe Selektivität	Staph.capitis 73.5% T=0.69
			Staph.caprae 17.3% T=0.48
6006104	sehr gut	Koc.varians/rosea 8.2% T=0.4	
41	0004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.60
42	0000104	gut	M.spp 99.6% T=0.55
	0004104	sehr gut	M.spp 98.5% T=0.67
48a	0210002	unakzeptabel	M.spp 99.6% T=0.55
	0210006	geringe Selektivität	M.spp 99.6% T=0.55
			Koc.varians/rosea 4.5% T=0.03
	0210012	gut	Staph.hominis 81.9% T=0.39
			Staph.warneri 16.6% T=0.13
0210016	unakzeptabel	M.spp	
48b	0002102	geringe Selektivität	M.spp 95.4% T=0.2
			Koc.varians/rosea 4.5% T=0.03
	0002106	geringe Selektivität	Staph.hominis 81.9% T=0.39
			Staph.warneri 16.6% T=0.13
	0002112	unakzeptabel	M.spp
0002116	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 85.8% T=0.2	
		M.spp 14% T=0.02	
54	0004104	sehr gut	M.spp 51.4% T=0.19
57	6002002	gut	Koc.varians/rosea 46.9% T=0.23
	6002006	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 61.3% T=0.43
63	0004004	ausgezeichnet	M.spp 38.6% T=0.35
65	6006000	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea/Staph.hominis/capitis
			Koc.varians/rosea 85.8% T=0.2
	6006004	ausgezeichnet	M.spp 14% T=0.02
	6006010	geringe Selektivität	M.spp 51.4% T=0.19
			Koc.varians/rosea 46.9% T=0.23
			Koc.varians/rosea 61.3% T=0.43
6006014	sehr gut	M.spp 38.6% T=0.35	
69	0004004	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea/Staph.hominis/capitis

	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
70	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
	0004106	gut	M.spp 98.8% T=0.40
72	0000004	sehr gut	M.spp 99.8% T=1.00
73	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
75	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.9% T=0.88
82	6000100	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 60.2% T=0.55
			Staph.capitis 38.6% T=0.65
	6000104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.6% T=0.75
	6004100	geringe Selektivität	Staph.capitis 73.4% T=0.57
			Koc.varians/rosea 16.3% T=0.32
			Staph.cohnii cohnii 7.7% T=0.3
6004104	sehr gut	Staph.caprae 2% T=0.19	
6004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52	
87	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
	0004114	akzeptabel	M.spp 98.6% T=0.23
	0204104	akzeptabel	M.spp 99.5% T=0.23
	0204114	unakzeptabel	M.spp/Koc.kristinae
88	0002004	geringe Selektivität	M.spp 94.2% T=0.82
			Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67
	0006004	gut	M.spp 98.5% T=0.70
91	6006114	gut	Koc.varians/rosea 97.6% T=0.37
95	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
106	0004104	sehr gut	M.spp 99.6% T=0.55
110	0000104	gut	M.spp 98.5% T=0.67
119	0200004	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.67
	0204004	sehr gut	M.spp 99.9% T=0.55
123	6006104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.60
	6006114	gut	Koc.varians/rosea 97.6% T=0.37
125	6006000	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57
			Staph.capitis 08.6% T=0.54
	6006004	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77
127	6006002	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 87% T=0.51
			Staph.capitis 10.8% T=0.5
	6006006	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.71
146	6004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52
147	6006106	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.8% T=0.53
	6006116	gut	Koc.varians/rosea 97.5% T=0.3
149	6004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52
150	6204104	akzeptabel	Koc.kristinae 60.1% T=0.2
			Koc.varians/rosea 34.4% T=0.19
151	6310110	gut	Koc.kristinae 90.9% T=0.77

	6310114	ausgezeichnet	Koc.kristinae 99.9% T=1.00
153	6004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52
154	6310110	gut	Koc.kristinae 90.9% T=0.77
	6310114	ausgezeichnet	Koc.kristinae 99.9% T=1.00
	6314110	unzuverlässig	Koc.kristinae 36.5% T=0.52
			Staph.cohnii cohnii 33% T=0.58
			Staph.hominis 12.4% T=0.68
			Staph.warneri 7.7% T=0.5
6314114	ausgezeichnet	Koc.kristinae 99.9% T=0.75	
155	6004100	geringe Selektivität	Staph.capitis 73.4% T=0.57
			Koc.varians/rosea 16.3% T=0.32
			Staph.cohnii cohnii 7.7% T=0.3
	6004104	sehr gut	Staph.caprae 2% T=0.19
157	4006004	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52
			Koc.varians/rosea 78.0% T=0.61
159	6312110	geringe Selektivität	M.spp 21.9% T=0.47
			Staph.lugdunensis 75.4% T=0.8
			Staph.hominis 13.6% T=0.86
	6312114	ausgezeichnet	Koc.kristinae 6.8% T=0.57
171	6006002	geringe Selektivität	Koc.kristinae 99.9% T=0.80
			Koc.varians/rosea 87% T=0.51
	6006006	sehr gut	Staph.capitis 10.8% T=0.5
172	6004104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.71
173	2004104	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52
			Koc.varians/rosea 60% T=0.35
175	6316110	unzuverlässig	M.spp 39.8% T=0.27
			Staph.lugdunensis 60.8% T=0.68
			Staph.hominis 21.2% T=0.79
			Staph.sciuri 08.8% T=0.57
			Staph.cohnii cohnii 03.4% T=0.49
	6316114	sehr gut	Staph.aureus 01.6% T=0.41
177	0004106	gut	Koc.kristinae 99.5% T=0.55
179	0004006	sehr gut	M.spp 98.8% T=0.4
193	0004006	sehr gut	M.spp 99.8% T=0.73
			M.spp 98.8% T=0.4
198	0004004	ausgezeichnet	M.spp 99.8% T=0.73
199	4006000	geringe Selektivität	M.spp 99.9% T=0.88
			Koc.varians/rosea 66.7% T=0.41
	4006004	geringe Selektivität	M.spp 32.6% T=0.31
			Koc.varians/rosea 78.0% T=0.61
			M.spp 21.9% T=0.47

200	0002004	geringe Selektivität	M.spp 94.2% T=0.82
			Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67
201	0006004	gut	M.spp 98.5% T=0.70
205	6304110	geringe Selektivität	Staph.epidermidis 49% T=0.59
			Staph.capitis 30.8% T=0.64
			Koc.kristinae 12.4% T=0.4
	6304114	sehr gut	Koc.kristinae 99.9% T=0.63
206	2000004	geringe Selektivität	M.spp 55.8% T=0.72
			Koc.varians/rosea 44.1% T=0.75
211	6002000	gut	Koc.varians/rosea 94.4% T=0.80
	6002004	ausgezeichnet	Koc.varians/rosea 99.9% T=1.00
212	2004104	geringe Selektivität	Koc.varians/rosea 60% T=0.35
			M.spp 39.8% T=0.27
213	6000104	sehr gut	Koc.varians/rosea 99.6% T=0.75
214	0006004	gut	M.spp 98.5% T=0.70
217	0002004	geringe Selektivität	M.spp 94.2% T=0.82
			Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67
218	6702000	akzeptabel	Staph.capitis 53.6% T=0.61
			Staph.auricularis 34.5% T=0.49
	6702004	akzeptabel	Koc.kristinae 63.8% T=0.19
			Koc.varians/rosea 32.3% T=0.17
219	6731610	unzuverlässig	Staph.lentus 99.5% T=0.48
	6731614	unakzeptabel	Staph.lentus

<sup>a</sup> Bei mehrdeutigen Profilen sind alle in Frage kommenden Profile aufgelistet.

<sup>b</sup> Koc. varians/rosea *Kocuria varians*/*Kocuria rosea*

Staph. *Staphylococcus*

M. spp. *Micrococcus*-Spezies

Koc. kristinae *Kocuria kristinae*

**Tab. 7** Verteilung der API STAPH-Identifizierungsergebnisse

	Anzahl der identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Micrococcus</i> spp. identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Kocuria varians/ Kocuria rosea</i> identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Kocuria kristinae</i> identifizierten Isolate
Ergebnisse mit eindeutigem Profil	38 (51,4%)	24 (32,4%)	6 (8,1%)	1 (1,4%)
davon mit:				
ausgezeichnet	6 (8,1%)	6 (8,1%)		
sehr gut	16 (21,6%)	11 (14,9%)	5 (6,8%)	
gut	8 (10,8%)	7 (9,5%)	1 (1,4%)	
akzeptabel	1 (1,4%)			1 (1,4%)
geringe Selektivität	7 (9,5%)			
Ergebnisse mit mehrdeutigem Profil	36 (48,6%)	12 (16,2%)	10 (13,5%)	2 (2,7%)
davon identifiziert:				
übereinstimmend innerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	15 (20,3%)	10 (13,5%)	4 (5,4%)	1 (1,4%)
übereinstimmend außerhalb der Wertegrenzen <sup>b</sup>	10 (13,5%)	2 (2,7%)	6 (8,1%)	1 (1,4%)
nicht übereinstimmend	11 (14,9%)			

<sup>a</sup> Die Grenzen basieren beim API STAPH-System auf Prozentwert (%ID  $\geq$  80) und T-Index (T  $\geq$  0).

<sup>b</sup> Bei einem oder mehreren Ergebnissen außerhalb der Wertegrenzen.

### 3.4 Identifizierung der klinischen Isolate anhand des VITEK 2-Systems

Beim VITEK 2-System (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) handelt es sich um ein Verfahren zur automatischen Identifizierung und Resistenztestung grampositiver Keime. Wie auch das API STAPH-System basiert es auf biochemischen Testmethoden und einer spezifischen Datenbasis zur Auswertung der Ergebnisse der biochemischen

Reaktionen. Die Identifizierung erfolgt automatisch durch die VITEK 2-Software (Version 3.01).

Neben verschiedenen *Staphylococcus*-, *Streptococcus*- und *Enterococcus*-Spezies beinhaltet die Datenbank auch die in der vorliegenden Arbeit behandelten Spezies *Kocuria rosea*, *Kocuria varians* und *Micrococcus luteus*.

Die Ergebnisse werden mittels T-Index angegeben und abhängig von diesem in folgende Kategorien eingeteilt:

-ausgezeichnete Identifizierung	( $T \geq 0.75$ )
-sehr gute Identifizierung	( $T \geq 0.5$ )
-gute Identifizierung	( $T \geq 0.25$ )
-akzeptierte Identifizierung	( $T \geq 0$ )

Ähnlich wie beim API STAPH-System werden bei zwei oder mehr in Frage kommenden Spezies die Ergebnisse als „niedrig selektiv“ beurteilt. Atypische Reaktionsmuster, die nicht näher zugeteilt werden können, werden mit „nicht identifizierbar“ deklariert.

Bei der Identifizierung der 74 klinischen Isolate wurden insgesamt 50 Ergebnisse (67,6%) mit „ausgezeichnet“, fünf (6,8%) mit „sehr gut“, drei (4,1%) mit „gut“ und zwei (2,7%) mit „akzeptierbar“ bewertet, so dass 60 Stämme (81,1%) einer Spezies zugeteilt werden konnten. Für 13 Stämme (17,6%) zeigten die Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ und waren einer Spezies nicht eindeutig zuzuordnen. Ein Stamm (1,4%) konnte nicht identifiziert werden. Tabelle 8 gibt einen Gesamtüberblick über die Ergebnisse der VITEK 2-Identifizierung.

Von den 60 Stämmen, die einer Spezies zugeordnet werden konnten, wurden 30 (50,0%) als *Micrococcus luteus* identifiziert, wobei die Ergebnisse 25mal mit „ausgezeichnet“, viermal mit „sehr gut“ und einmal mit „gut“ bewertet wurden. 25 Stämme (41,7%) – 23 mit „ausgezeichnet“, jeweils einmal mit „sehr gut“ und „gut“ – wurden als *Kocuria rosea* bestimmt. Zwei Isolate wurden mit einem als „ausgezeichnet“ bewerteten Ergebnis als *Kocuria varians* identifiziert. Ein Stamm mit einem „guten“ Ergebnis wurde als *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*) identifiziert. *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*)

und *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*) wurden jeweils einmal mit einem „akzeptierbaren“ Resultat bestimmt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Verteilung der VITEK 2-Ergebnisse.

**Tab. 8** Ergebnisse der Identifizierung der klinischen Isolate anhand des VITEK 2-Systems

Isolatsbezeichnung	Vitekbewertung	Vitekergebnis/ T-Index
1	geringe Selektivität	0.42 <i>Kocuria varians</i> /0.33 <i>Kocuria rosea</i>
3	geringe Selektivität	0.53 <i>Kocuria rosea</i> /0.52 <i>Micrococcus luteus</i>
4	ausgezeichnet	0.82 <i>Kocuria rosea</i>
5	geringe Selektivität	0.78 <i>Kocuria rosea</i> /0.76 <i>Micrococcus luteus</i>
6	geringe Selektivität	0.79 <i>Micrococcus luteus</i> /0.78 <i>Kocuria rosea</i>
7	sehr gut	0.72 <i>Micrococcus luteus</i>
10	ausgezeichnet	0.91 <i>Micrococcus luteus</i>
12	ausgezeichnet	0.96 <i>Micrococcus luteus</i>
13	geringe Selektivität	0.79 <i>Micrococcus luteus</i> /0.78 <i>Kocuria rosea</i>
15	geringe Selektivität	0.78 <i>Kocuria rosea</i> /0.76 <i>Micrococcus luteus</i>
17	ausgezeichnet	1.00 <i>Micrococcus luteus</i>
18	geringe Selektivität	0.78 <i>Kocuria rosea</i> /0.76 <i>Micrococcus luteus</i>
19	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
23	ausgezeichnet	0.94 <i>Micrococcus luteus</i>
24	ausgezeichnet	0.81 <i>Micrococcus luteus</i>
26	ausgezeichnet	0.85 <i>Kocuria rosea</i>
29	geringe Selektivität	0.56 <i>Kocuria rosea</i> /0.52 <i>Staphylococcus auricularis</i>
37	geringe Selektivität	0.61 <i>Kocuria rosea</i> /0.56 <i>Micrococcus luteus</i>
38	ausgezeichnet	1.00 <i>Micrococcus luteus</i>
39	ausgezeichnet	0.99 <i>Micrococcus luteus</i>
41	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
42	ausgezeichnet	1.00 <i>Micrococcus luteus</i>
48a	ausgezeichnet	0.82 <i>Micrococcus luteus</i>
48b	ausgezeichnet	0.97 <i>Micrococcus luteus</i>
54	sehr gut	0.61 <i>Micrococcus luteus</i>
57	geringe Selektivität	0.29 <i>Staphylococcus warnerii</i> /0.19 <i>Staphylococcus cohnii</i> ssp <i>cohnii</i>
63	ausgezeichnet	0.96 <i>Micrococcus luteus</i>
65	ausgezeichnet	1.00 <i>Kocuria rosea</i>
69	ausgezeichnet	0.92 <i>Micrococcus luteus</i>
70	sehr gut	0.73 <i>Micrococcus luteus</i>
72	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
73	geringe Selektivität	0.61 <i>Kocuria rosea</i> /0.56 <i>Micrococcus luteus</i>
75	ausgezeichnet	1.00 <i>Micrococcus luteus</i>
82	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>

87	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
88	ausgezeichnet	0.96 <i>Kocuria rosea</i>
91	ausgezeichnet	0.87 <i>Kocuria varians</i>
95	ausgezeichnet	0.97 <i>Micrococcus luteus</i>
106	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
110	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
119	ausgezeichnet	1.00 <i>Micrococcus luteus</i>
123	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
125	gut	0.33 <i>Kocuria rosea</i>
127	geringe Selektivität	0.52 <i>Kocuria varians</i> /0.50 <i>Kocuria rosea</i>
146	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
147	ausgezeichnet	1.00 <i>Kocuria rosea</i>
149	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
150	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
151	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
153	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
154	akzeptierbar	0.07 <i>Gemella</i> spp/( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
155	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
157	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
159	gut	0.41 <i>Streptococcus acidominimus</i> /( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
171	ausgezeichnet	0.87 <i>Kocuria varians</i>
172	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
173	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
175	geringe Selektivität	0.63 <i>Gemella</i> spp/0.60 <i>Streptococcus acidominimus</i> /( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
		0.55 <i>Micrococcus luteus</i>
177	ausgezeichnet	0.92 <i>Micrococcus luteus</i>
179	ausgezeichnet	0.97 <i>Micrococcus luteus</i>
193	ausgezeichnet	0.97 <i>Micrococcus luteus</i>
198	sehr gut	0.71 <i>Micrococcus luteus</i>
199	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
200	gut	0.42 <i>Micrococcus luteus</i>
201	ausgezeichnet	0.98 <i>Micrococcus luteus</i>
205	ausgezeichnet	0.87 <i>Kocuria rosea</i>
206	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
211	ausgezeichnet	0.90 <i>Kocuria rosea</i>
212	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
213	ausgezeichnet	0.99 <i>Kocuria rosea</i>
214	sehr gut	0.65 <i>Kocuria rosea</i>
217	ausgezeichnet	1.00 <i>Kocuria rosea</i>
218	akzeptierbar	0.22 <i>Streptococcus acidominimus</i> /( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
219	nicht identifizierbar	

**Tab. 9** Verteilung der VITEK 2-Identifizierungsergebnisse

	Anzahl der identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Micrococcus luteus</i> identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Kocuria rosea</i> identifizierten Isolate	Anzahl der als <i>Kocuria varians</i> identifizierten Isolate	Anzahl der übrigen Isolate
Eindeutige Ergebnisse	60 (81,1%)	30 (40,5%)	25 (33,8%)	2 (2,7%)	3 (4,1%)
davon mit:					
ausgezeichnet	50 (67,6%)	25 (33,8%)	23 (31,1%)	2 (2,7%)	
sehr gut	5 (6,8%)	4 (5,4%)	1 (1,4%)		
gut	3 (4,1%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)		1 (1,4%)
akzeptabel	2 (2,7%)				2 (2,7%)
Ergebnisse mit geringer Selektivität	13 (17,6%)				
Nicht identifizierbar	1 (1,4%)				

### 3.5 Vergleich der RIDOM-Ergebnisse mit den beiden biochemischen Identifizierungssystemen

38 der 74 klinischen Isolate (51,4%) konnten anhand der 16S-rDNA-Sequenzen innerhalb der festgelegten Grenzen von 99 bis 100% Übereinstimmung im Sequenzvergleich für den Nachweis auf Spezieslevel identifiziert werden. Zwei- bzw. Mehrdeutigkeiten traten dabei nicht auf. Für 36 Stämme (48,6%) lagen die Ergebnisse außerhalb dieser Grenzen und wurden daher als nicht sicher identifiziert bewertet. Das API STAPH-System identifizierte 31 Stämme (41,9%) eindeutig, von denen sechs Stämme (8,1%) Ergebnisse mit der Bewertung „ausgezeichnet“, 16 (21,6%) mit „sehr gut“ und acht (10,8%) mit „gut“ erhielten. Das Ergebnis eines Stammes (1,6%) wurde als „akzeptabel“ beurteilt. Sieben klinische Isolate (9,5%) konnten aufgrund der geringen Selektivität der Resultate und mehrerer in Frage kommender Spezies nicht eindeutig identifiziert werden. Für 36 der 74 klinischen Isolate (48,6%) konnte den biochemischen Reaktionen kein eindeutiges Profil zugewiesen werden, da die Reaktionsergebnisse anhand der Ablesetabelle mehrdeutig waren und nicht sicher ausgewertet werden konnten. Von diesen 36 Stämmen mit mehrdeutigen Profilen konnten 15 (20,3%) durch übereinstimmende Identifizierungsergebnisse bestimmt

werden. Das VITEK 2-System identifizierte insgesamt 60 Stämme (81,1%) eindeutig. Davon wurden 50 Ergebnisse (67,6%) mit „ausgezeichnet“, fünf (6,8%) mit „sehr gut“ und drei (4,1%) mit „gut“ bewertet. Zwei Stämme (2,7%) lieferten „akzeptierbare“ Ergebnisse. Insgesamt 14 Stämme (18,9%) hatten Ergebnisse außerhalb der festgelegten Wertegrenzen. Für 13 klinische Isolate (17,6%) besaßen die Resultate eine „geringe Selektivität“ und konnten nicht eindeutig ausgewertet werden. Ein Stamm (1,4%) erhielt die Bewertung „nicht identifizierbar“. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzanalyse und der beiden biochemischen Identifizierungssysteme im Vergleich.

**Tab. 10** Vergleich der Ergebnisse der 16S-rDNA-Sequenzanalyse, des API STAPH- und des VITEK 2-Systems

	RIDOM	API STAPH	VITEK 2
Ergebnisse innerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	38 (51,4%)	46 (62,2%)	60 (81,1%)
Ergebnisse außerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	36 (48,6%)	17 (23,0%)	13 (17,6%)
Nicht auswertbare Ergebnisse <sup>b</sup>		11 (14,7%)	1 (1,4%)
Übereinstimmende Ergebnisse			
davon:			
innerhalb der jeweiligen Wertegrenze <sup>a</sup>	22 (29,7%)		
außerhalb der jeweiligen Wertegrenze <sup>c</sup>	4 (5,4%)	3 (4,1%)	2 (2,7%)
außerhalb mehrerer Wertegrenzen <sup>d</sup>	3 (4,1%)		
Nicht übereinstimmende Ergebnisse <sup>e</sup>	40 (54,1%)		
Insgesamt nicht akzeptierte Ergebnisse <sup>f</sup>	52 (70,3%)		

<sup>a</sup> Die Grenzen basieren beim RIDOM-System auf der Übereinstimmung der Sequenzen in Prozent (%S  $\geq$  99), beim API STAPH-System auf Prozentwert (%ID  $\geq$  80) und T-Index (T  $\geq$  0) und beim VITEK 2-System auf dem T-Index (T  $\geq$  0).

<sup>b</sup> Als nicht auswertbar gelten Ergebnisse ohne eindeutiges Ergebnisprofil bei uneinheitlicher Identifizierung bzw. als nicht identifizierbar deklarierte Ergebnisse.

<sup>c</sup> Bei Berücksichtigung des wahrscheinlichsten Ergebnisses für Resultate geringer Selektivität.

<sup>d</sup> Bei Überschreiten von zwei oder mehr Wertegrenzen der drei Identifizierungssysteme.

<sup>e</sup> Beinhaltet die klinischen Isolate ohne eindeutiges Profil.

<sup>f</sup> Bei nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen.

Insgesamt gab es für 34 Stämme (46,0%) ein übereinstimmendes Ergebnis. Für 22 klinische Isolate (29,7%) lagen die Ergebnisse der 16S-rDNA-Sequenzanalyse als auch der beiden biochemischen Identifizierungssysteme innerhalb der jeweiligen

Wertegrenzen, wobei alle 22 Stämme als *Micrococcus luteus* bzw. im Falle des API STAPH-Systems als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp., die neben *Micrococcus luteus* die Spezies *Dermaococcus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius* und *Micrococcus lylae* umfasst, zugehörig identifiziert wurden. Die Ergebnisse von neun Stämmen (12,2%) überschritten einen der drei Wertebereiche, davon vier (5,4%) hinsichtlich des RIDOM-, drei (4,1%) hinsichtlich des API STAPH- und zwei (2,7%) hinsichtlich des VITEK 2-Ergebnisses, wenn man bei Ergebnissen mit „geringer Selektivität“ das wahrscheinlichste Resultat berücksichtigte. Sieben dieser Stämme wurden als *Micrococcus luteus* bzw. als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. zugehörig identifiziert, zwei als *Kocuria rosea* bzw. als der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea*. API STAPH-Ergebnisse mit mehrdeutigen Profilen und nicht übereinstimmendem Identifizierungsergebnis wurden hierbei nicht berücksichtigt und als nicht auswertbar beurteilt. Insgesamt wurden 52 Stämme (70,3%) aufgrund von mehrdeutigen und außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen als nicht eindeutig identifiziert gewertet. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die klinischen Isolate mit mehrdeutigen Profilen und nicht akzeptierten Ergebnissen.

**Tab. 11** Klinische Isolate mit mehrdeutigen Profilen und nicht akzeptierten Ergebnissen

Isolatsbezeichnung	API STAPH-Ergebnis/ Prozentwert und T-Index <sup>a</sup>	Vitek 2-Ergebnis/ T-Index <sup>a</sup>	RIDOM-Sequenzanalyse/ Prozentwert (%) <sup>a</sup>
1	Koc.varians/rosea 98% T=0.73	0.42 Koc. varians/0.33 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.94		
	Koc.varians/rosea 87% T=0.51/ Staph.capitis 10.8% T=0.50		
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.71		
3	M.spp 99.9% T=0.56	0.53 Koc. rosea/0.52 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 99.8% T=0.73		
4	M.spp 99.6% T=0.55	0.82 Koc. rosea	M. luteus D 20030 (99,54)
5	M.spp 98.8% T=0.40	0.78 Koc. rosea/0.76 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
6	M.spp 99.6% T=0.55	0.79 M. luteus/0.78 Koc. rosea	M. luteus D 20030 (99,54)
10	M.spp 99.6% T=0.55	0.91 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 98.8% T=0.40		
13	M.spp 99.9% T=0.88	0.79 M. luteus/0.78 Koc. rosea	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 99.8% T=0.73		
15	M.spp 99.9% T=0.88	0.78 Koc. rosea/0.76 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 99.6% T=0.55		
18	M.spp 98.5% T=0.70	0.78 Koc. rosea/0.76 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,07)

19	M.spp 89.5% T=0.37/ Koc.varians/rosea 10.4% T=0.27	0.98 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
26	Staph.capitis 95.4% T=0.69	0.85 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (95,06)
	Koc.varians/rosea 97.6% T=0.37		
	Staph.capitis 97.9% T=0.79		
	Koc.kristinae 78.2% T=0.28/ Koc.varians/rosea 13.7% T=0.19		
	Staph.epidermidis 53.7% T=0.63/ Staph.capitis 30.1% T=0.67/ Staph.hominis 14.9% T=0.68		
	Koc.kristinae 65.7% T=0.15/ Staph.epidermidis 13.7% T=0.13/ Koc.varians/rosea 8.7% T=0.04/ Staph.capitis 7.6% T=0.17/ Staph.hominis 3.8% T=0.18		
	Staph.epidermidis 47.9% T=0.69/ Staph.capitis 45.2% T=0.77		
	Koc.kristinae 98% T=0.44		
	29		
Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77			
37	M.spp 98.8% T=0.40	0.61 Koc. rosea/0.56 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
38	M.spp 99.9% T=0.88	1.00 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 99.6% T=0.55		
39	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57/ Staph.capitis 08.6% T=0.54	0.99 M. luteus	Koc. varians D 20033 (97,29)
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77		
	Staph.capitis 73.5% T=0.69/ Staph.caprae 17.3% T=0.48/ Koc.varians/rosea 8.2% T=0.4		
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.60		
42	M.spp 98.5% T=0.67	1.00 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 99.6% T=0.55		
48a	M.spp/Staph.hominis	0.82 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
	M.spp 95.4% T=0.2/ Koc.varians/rosea 4.5% T=0.03		
	Staph.hominis 81.9% T=0.39/ Staph.warneri 16.6% T=0.13		
	M.spp		
48b	M.spp 51.4% T=0.19/ Koc.varians/rosea 46.9% T=0.23	0.97 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)

	Koc.varians/rosea 61.3% T=0.43/ M.spp 38.6% T=0.35		
57	Koc.varians/rosea 98% T=0.73 Koc.varians/rosea 99.9% T=0.94	0.29 Staph.warneri/0.19 Staph.cohnii ssp cohnii	Koc. rosea D 20447 (94,98)
65	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57/ Staph.capitis 08.6% T=0.54 Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77 Staph.capitis 61.5% T=0.54/ Koc.varians/rosea 27.8% T=0.34/ Staph.epidermidis 6.5% T=0.29/ Staph.hominis 3.4% T=0.39 Koc.varians/rosea 99.9% T=0.54	1.00 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
69	M.spp 99.9% T=0.88 M.spp 99.6% T=0.55	0.92 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
70	M.spp 99.8% T=0.73 M.spp 98.8% T=0.40	0.73 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
73	M.spp 99.8% T=0.73	0.61 Koc. rosea/0.56 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,31)
82	Koc.varians/rosea 60.2% T=0.55/ Staph.capitis 38.6% T=0.65 Koc.varians/rosea 99.6% T=0.75 Staph.capitis 73.4% T=0.57/ Koc.varians/rosea 16.3% T=0.32/ Staph.cohnii cohnii 7.7% T=0.3/ Staph.caprae 2% T=0.19 Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,63)
87	M.spp 99.6% T=0.55 M.spp 98.6% T=0.23 M.spp 99.5% T=0.23 M.spp/Koc.kristinae	0.98 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,77)
88	M.spp 94.2% T=0.82/ Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67 M.spp 98.5% T=0.70	0.96 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (99,77)
91	Koc.varians/rosea 97.6% T=0.37	0.87 Koc. varians	Koc. rosea D 20447 (94,98)
119	M.spp 99.8% T=0.67 M.spp 99.9% T=0.55	1.00 M. luteus	M. luteus D 20030 (100,00)
123	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.60 Koc.var/ros 97.6% T=0.37	0.99 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)

125	Koc.varians/rosea 90.7% T=0.57/ Staph.capitis 08.6% T=0.54	0.33 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.77		
127	Koc.varians/rosea 87% T=0.51/ Staph.capitis 10.8% T=0.5	0.52 Koc. varians/0.50 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
	Koc.varians/rosea 99.9% T=0.71		
146	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,64)
147	Koc.varians/rosea 99.8% T=0.53	1.00 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
	Koc.varians/rosea 97.5% T=0.3		
149	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,41)
150	Koc.kristinae 60.1% T=0.2/ Koc.varians/rosea 34.4% T=0.19	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,64)
151	Koc.kristinae 90.9% T=0.77	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,18)
	Koc.kristinae 99.9% T=1.00		
153	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,18)
154	Koc.kristinae 90.9% T=0.77	0.07 Gemella spp/ (Streptococcus pneumoniae)	Koc. kristinae D 20032 (100,00)
	Koc.kristinae 99.9% T=1.00		
	Koc.kristinae 36.5% T=0.52/ Staph.cohnii cohnii 33% T=0.58/ Staph.hominis 12.4% T=0.68/ Staph.warneri 7.7% T=0.5/ Staph.sciuri 4.8% T=0.46		
	Koc.kristinae 99.9% T=0.75		
155	Staph.capitis 73.4% T=0.57/ Koc.varians/rosea 16.3% T=0.32/ Staph.cohnii cohnii 7.7% T=0.3/ Staph.caprae 2% T=0.19	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,13)
	Koc.varians/rosea 99.4% T=0.52		
157	Koc.varians/rosea 78.0% T=0.61/ M.spp 21.9% T=0.47	0.99 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
159	Staph.lugunensis 75.4% T=0.8/ Staph.hominis 13.6% T=0.86/ Koc.kristinae 6.8% T=0.57	0.41 Streptococcus acidominimus/ (Streptococcus pneumoniae)	Stomatococcus mucilaginosus A 25296 (94,53)
	Koc.kristinae 99.9% T=0.80		
171	Koc.varians/rosea 87% T=0.51/ Staph.capitis 10.8% T=0.5	0.87 Koc. varians	Koc. rosea D 20447 (94,98)
	Koc.var/ros 99.9% T=0.71		
172	Koc.var/ros 99.4% T=0.52	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,63)
173	Koc.varians/rosea 60% T=0.35/ M.spp 39.8% T=0.27	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,63)
175	Staph.lugdunensis 60.8% T=0.68/ Staph.hominis 21.2% T=0.79/ Staph.sciuri 08.8%	0.63 Gemella spp/0.60 Streptococcus acidominimus/ (Streptococcus pneumoniae)	Koc. varians D 20033 (94,77)

	T=0.57/ Staph.cohnii cohnii 03.4% T=0.49/ Staph.aureus 01.6% T=0.41	0.55 M. luteus	
	Koc.kristinae 99.5% T=0.55		
179	M.spp 99.8% T=0.73	0.97 M. luteus	M. luteus D 20030 (98,85)
193	M.spp 99.8% T=0.73	0.97 M. luteus	M. luteus D 20030 (100,00)
	M.spp 98.8% T=0.4		
198	M.spp 99.9% T=0.88	0.71 M. luteus	M. luteus D 20030 (98,36)
199	Koc.varians/rosea 66.7% T=0.41/ M.spp 32.6% T=0.31	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (96,36)
	Koc.varians/rosea 78.0% T=0.61/ M.spp 21.9% T=0.47		
200	M.spp 94.2% T=0.82/ Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67	0.42 M. luteus	M. luteus D 20030 (99,08)
205	Staph.epidermidis 49% T=0.59/ Staph.capitis 30.8% T=0.64/ Koc.kristinae 12.4% T=0.4	0.87 Koc. rosea	Koc. kristinae D 20032 (86,46)
	Koc.kristinae 99.9% T=0.63		
206	M.spp 55.8% T=0.72/ Koc.var/ros 44.1% T=0.75	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,41)
211	Koc.varians/rosea 94.4% T=0.80	0.90 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (97,28)
	Koc.varians/rosea 99.9% T=1.00		
212	Koc.varians/rosea 60% T=0.35/ M.spp 39.8% T=0.27	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,63)
213	Koc.varians/rosea 99.6% T=0.75	0.99 Koc. rosea	Koc. varians D 20033 (98,63)
214	M.spp 98.5% T=0.70	0.65 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
217	M.spp 94.2% T=0.82/ Koc.varians/rosea 05.7% T=0.67	1.00 Koc. rosea	Koc. rosea D 20447 (94,98)
218	Staph.capitis 53.6% T=0.61/ Staph.auricularis 34.5% T=0.49	0.22 Streptococcus acidominimus/ (Streptococcus pneumoniae)	Dermabacter hominis D 7083 (91,38)
	Koc.kristinae 63.8% T=0.19/ Koc.varians/rosea 32.3% T=0.17		
219	Staph.lentus 99.5% T=0.48	Nicht identifizierbar	Dermabacter hominis D 7083 (91,38)
	Staph.lentus		

<sup>a</sup> Koc. *Kocuria*  
Staph. *Staphylococcus*  
M. *Micrococcus*  
M. spp. *Micrococcus*-Spezies

Vergleicht man die Ergebnisse der 16S-rDNA-Sequenzanalyse mit denen des API STAPH-Systems, so finden sich 31 Stämme (41,9%), die innerhalb der beiden Wertegrenzen übereinstimmend identifiziert worden sind, wobei alle 31 Stämme als

*Micrococcus luteus* bzw. als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. zugehörig identifiziert wurden. Für weitere 16 Stämme (21,6%) lagen die Ergebnisse für eines dieser beiden Identifizierungssysteme bei übereinstimmender Identifizierung außerhalb der Wertegrenzen. Von diesen 16 Stämmen wurden sechs als *Kocuria varians* bzw. als der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea* angehörig, fünf als *Micrococcus luteus* bzw. *Micrococcus* spp., vier als *Kocuria rosea* bzw. *Kocuria varians/Kocuria rosea* und ein Stamm als *Kocuria kristinae* identifiziert. Neun Stämme (12,2%) wurden übereinstimmend bestimmt, die Ergebnisse lagen aber sowohl bei RIDOM als auch beim API STAPH-System außerhalb der festgesetzten Grenzen. Bei 18 klinischen Isolaten (24,3%) kam es zu nicht übereinstimmenden Ergebnissen, von denen elf (14,9%) bei mehrdeutigen API STAPH-Profilen uneinheitliche Identifizierungsergebnisse lieferten und daher nicht auswertbar waren.

Das API STAPH-System zeigte bei zehn klinischen Isolaten mit eindeutigem Profil ein tolerierbares Identifizierungsergebnis, die hinsichtlich des RIDOM-Systems Resultate zwischen 94,98% und 98,85% und einen entsprechenden Mittelwert von 97,83% und damit Ergebnisse außerhalb der Akzeptanzgrenze lieferten. Davon wurden fünf Stämme mit „sehr gut“ als der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians/Kocuria rosea* angehörig identifiziert, die von RIDOM mit Werte zwischen 98,18% und 98,64% als *Kocuria varians* bestimmt wurden. Zwei mit „sehr gut“ bzw. „ausgezeichnet“ der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. zugehörig identifizierte Stämme wurden mit 98,85% und 98,36% Übereinstimmung als *Micrococcus luteus* bestimmt. „Gut“ und mit einer Sequenzübereinstimmung von 94,98% wurde ein Stamm als *Kocuria varians/Kocuria rosea* bzw. *Kocuria rosea* bestimmt. Daneben wurden zwei von API STAPH als *Kocuria kristinae* mit „akzeptierbar“ und *Micrococcus* spp. mit „gut“ identifizierte Stämme durch RIDOM als *Kocuria varians* und *Kocuria rosea* bestimmt.

Ein Stamm, der bei zwei Profilen von API STAPH übereinstimmend als *Kocuria kristinae* identifiziert wurde, wurde von RIDOM mit einer Wahrscheinlichkeit von 98,18% als *Kocuria varians* bestimmt. Die Identifizierung von vier Stämmen mit mehr als einem Profil bei übereinstimmendem Identifizierungsergebnis wurde durch RIDOM, jedoch außerhalb der RIDOM-Wertegrenzen, bestätigt.

Die Identifizierung von sieben durch RIDOM innerhalb der Wertegrenzen bestimmte Stämme konnten durch API STAPH nicht bestätigt werden, wobei zwei Ergebnisse eine

„geringe Selektivität“ zeigten, zwei aufgrund mehrdeutiger Profile bei nicht übereinstimmender Identifizierung durch API STAPH nicht ausgewertet werden konnten und drei bei mehrdeutigen Profilen für mindestens ein Profil außerhalb der Wertegrenzen lagen.

Insgesamt wurden für 43 Stämme (58,1%) die Ergebnisse als nicht auswertbar oder unakzeptabel bewertet. Tabelle 12 gibt einen Überblick über den Vergleich der RIDOM- und der API STAPH-Ergebnisse.

**Tab. 12** Vergleich der RIDOM- und API STAPH-Ergebnisse

	RIDOM	API STAPH
Übereinstimmende Ergebnisse	56 (75,7%)	
davon:		
innerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	31 (41,9%)	
außerhalb der jeweiligen Wertegrenze <sup>b</sup>	12 (16,2%)	4 (5,4%)
außerhalb beider Wertegrenzen <sup>c</sup>	9 (12,2%)	
Nicht übereinstimmende Ergebnisse	18 (24,3%)	
Insgesamt nicht akzeptierte Ergebnisse <sup>d</sup>	43 (58,1%)	

<sup>a</sup> Die Grenzen basieren beim RIDOM-System auf der Übereinstimmung der Sequenzen in Prozent (%S ≥ 99), beim API STAPH-System auf Prozentwert (%ID ≥ 80) und T-Index (T ≥ 0).

<sup>b</sup> Bei Berücksichtigung des wahrscheinlichsten Ergebnisses für Resultate geringer Selektivität, auch im Falle mehrdeutiger Profile.

<sup>c</sup> Bei Überschreiten der Wertegrenzen beider Identifizierungssysteme.

<sup>d</sup> Bei nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen.

RIDOM und VITEK 2 hatten insgesamt 28 übereinstimmende Identifizierungsergebnisse (37,8%) innerhalb beider Wertegrenzen. 27 Stämme (36,5%) wurden hierbei als *Micrococcus luteus* und ein Stamm (1,4%) als *Kocuria rosea* identifiziert. Für acht als *Kocuria rosea* und zwei als *Micrococcus luteus* bestimmte klinische Isolate (13,5%) mit übereinstimmender Identifizierung lagen die Ergebnisse bei der RIDOM-Sequenzanalyse unter der festgelegten Grenze, wobei für *Kocuria rosea* die Übereinstimmungswerte zwischen 94,98% und 95,06% und für *Micrococcus luteus* bei 98,85% und 98,36% lagen. Zwei Stämme (2,7%) hatten bei Resultaten geringer Selektivität hinsichtlich VITEK 2 mit den RIDOM-Ergebnissen vereinbare Identifizierungen, wenn man das wahrscheinlichste Resultat berücksichtigte. Beide wurden als *Micrococcus luteus* bestimmt. Für einen Stamm mit übereinstimmendem

Identifizierungsergebnis lagen die Ergebnisse beider Systeme unter den festgelegten Wertegrenzen.

Insgesamt lieferten 46 Stämme (62,2%) Ergebnisse, die als unakzeptabel bewertet wurden. Davon hatten 33 Stämme (44,6%) für RIDOM und VITEK nicht übereinstimmende Identifizierungen. Zwei Stämme (2,7%) lieferten Ergebnisse, die für beide Identifizierungssysteme innerhalb der Wertegrenzen lagen, aber nicht vereinbar waren. Die Identifizierung von 20 Stämmen (27,0%), von denen nach VITEK 2 18 mit „ausgezeichnet“ und jeweils einer mit „gut“ bzw. „akzeptabel“ bestimmt wurden und deren RIDOM-Ergebnisse außerhalb der Wertegrenzen lagen, war nicht übereinstimmend. Bei sechs Stämmen (8,1%) mit VITEK 2-Ergebnissen geringer Selektivität waren diese, unter Berücksichtigung des Ergebnisses mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, nicht mit validen RIDOM-Resultaten vereinbar. Die Identifizierungsergebnisse von vier klinischer Isolate (5,4%), deren Werte für beide Systeme außerhalb der festgelegten Wertegrenzen lagen, waren ebenfalls widersprüchlich. Ein Stamm (1,4%) wurde vom VITEK 2-System als nicht identifizierbar eingestuft.

Die Identifizierung von zehn Stämmen mit RIDOM-Ergebnissen im Toleranzbereich konnte durch VITEK 2 nicht bestätigt werden, wobei in acht Fällen die VITEK 2-Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ zeigten und für zwei Stämme eine andere Spezies bestimmt wurde. Ein Stamm wurde bei einem RIDOM-Ergebnis von 99,54% für *Micrococcus luteus* durch VITEK 2 „ausgezeichnet“ als *Kocuria rosea* identifiziert, ein weiterer Stamm wurde bei einem RIDOM-Ergebnis von 100% für *Kocuria kristinae* durch VITEK 2 mit einem als „akzeptierbar“ bewerteten Ergebnis als *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*) bestimmt.

Die Identifizierung von 32 Stämmen mit vertretbaren VITEK 2-Ergebnissen konnte durch RIDOM nicht bestätigt werden. Neben den zwei klinischen Isolaten mit abweichenden Identifizierungsergebnissen innerhalb der beiden Toleranzbereiche zeigten 30 Stämme mit Werten zwischen 86,46% und 98,85% und einem resultierenden Mittelwert von 96,4% ein unzureichendes RIDOM-Ergebnis. Davon wurden 23 Stämme als *Kocuria rosea* bestimmt, wobei 21 Ergebnisse mit „ausgezeichnet“ und jeweils einer mit „sehr gut“ bzw. „gut“ bewertet wurden. Zwei Stämme wurden mit „ausgezeichnet“ und einer mit „sehr gut“ als *Micrococcus luteus* identifiziert. *Kocuria*

*varians* wurden zweimal „ausgezeichnet“ bestimmt und mit „gut“ und „akzeptierbar“ wurden zwei Stämme als *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*) identifiziert. Für 20 dieser 30 Stämme kamen RIDOM und VITEK 2 zu nicht übereinstimmenden Identifizierungen. Tabelle 13 gibt einen Überblick über den Vergleich der RIDOM- und VITEK 2-Ergebnisse.

**Tab. 13** Vergleich der RIDOM- und VITEK 2-Ergebnisse

	RIDOM	VITEK 2
Übereinstimmende Ergebnisse	41 (55,4%)	
davon:		
innerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	28 (37,8%)	
außerhalb der jeweiligen Wertegrenze <sup>b</sup>	10 (13,5%)	2 (2,7%)
außerhalb beider Wertegrenzen <sup>c</sup>	1 (1,4%)	
Nicht übereinstimmende Ergebnisse	33 (44,6%)	
Insgesamt nicht akzeptierte Ergebnisse <sup>d</sup>	46 (62,2%)	

<sup>a</sup> Die Grenzen basieren beim RIDOM-System auf der Übereinstimmung der Sequenzen in Prozent (%S ≥ 99), beim VITEK 2-System auf dem T-Index (T ≥ 0).

<sup>b</sup> Bei Berücksichtigung des wahrscheinlichsten Ergebnisses für Resultate geringer Selektivität.

<sup>c</sup> Bei Überschreiten der Wertegrenzen beider Identifizierungssysteme.

<sup>d</sup> Bei nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen.

API STAPH und VITEK 2 kommen auf 33 übereinstimmende Identifizierungsergebnisse (44,6%) innerhalb beider Wertegrenzen. Hierbei wurden 24 Stämme als *Micrococcus luteus* bzw. *Micrococcus* spp., acht Stämme als *Kocuria rosea* bzw. der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* zugehörig und ein Stamm als *Kocuria varians* und entsprechend als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* identifiziert. 14 Stämme konnten bei Überschreiten einer oder beider Wertegrenzen übereinstimmend identifiziert werden. Für zwei durch API STAPH als *Micrococcus luteus* bzw. *Micrococcus* spp. identifizierte Stämme (2,7%) zeigte das VITEK 2-Ergebnis eine „geringe Selektivität“. Die Identifizierungen weiterer neun Stämme (12,2%) waren, bei API STAPH-Ergebnissen niedriger Selektivität und Berücksichtigung der Ergebnisse mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, übereinstimmend. Drei klinische Isolate (4,1%) wurden bei Überschreitung der Wertegrenzen beider Systeme übereinstimmend identifiziert.

Insgesamt lieferten das API STAPH- und das VITEK 2-System für 41 der 74 klinischen Isolate (55,4%) Ergebnisse außerhalb der Akzeptanzwerte, wobei die Identifizierung von 27 Stämmen (36,5%) nicht einheitlich war. Von diesen 27 Stämmen hatten vier Stämme Ergebnisse innerhalb beider Wertegrenzen (5,4%). Einen von API STAPH „sehr gut“ als *Micrococcus* spp. bestimmten Stamm identifizierte VITEK 2 „ausgezeichnet“ als *Kocuria rosea*. Zwei weitere Stämme identifizierte API STAPH „akzeptierbar“ bzw. bei zwei Profilen „gut“ und „ausgezeichnet“ als *Kocuria kristinae*, während VITEK 2 diese Stämme „ausgezeichnet“ als *Kocuria rosea* identifizierte. Ein Stamm wurde von API STAPH mit „gut“ als *Micrococcus* spp. und von VITEK 2 mit „sehr gut“ als *Kocuria rosea* bestimmt.

Elf Stämme konnten aufgrund mehrdeutiger API STAPH-Profile bei nicht übereinstimmenden Identifizierungsergebnissen nicht ausgewertet werden. Sieben weitere Isolate mit mehrdeutigen API STAPH-Profilen zeigten keine übereinstimmende Identifizierung mit den VITEK 2-Ergebnissen.

Für sieben klinische Isolate zeigten die VITEK 2-Ergebnisse und für weitere vier die API STAPH-Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ für mindestens ein Profil bei nicht übereinstimmender Identifizierung. Die Ergebnisse für zwei Stämme lagen sowohl für API STAPH als auch für VITEK 2 außerhalb der Wertegrenzen.

Die Identifizierung von 23 Stämmen mit tolerierbaren VITEK 2-Ergebnissen konnte durch API STAPH nicht bestätigt werden. 17 dieser Stämme konnten aufgrund mehrdeutiger Profile bei uneinheitlicher Identifizierung bzw. Überschreiten der Wertegrenzen für mindestens ein Profil, sechs aufgrund von Ergebnissen „geringer Selektivität“ durch API STAPH nicht eindeutig identifiziert werden. Die Identifizierung von neun Stämmen mit tolerierbaren API-STAPH-Ergebnissen konnte infolge niedrig selektiver Ergebnisse durch VITEK 2 nicht bestätigt werden.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über den Vergleich der API STAPH- und VITEK 2-Ergebnisse.

**Tab. 14** Vergleich der API STAPH- und VITEK 2-Ergebnisse

	<b>API STAPH</b>	<b>VITEK 2</b>
Übereinstimmende Ergebnisse	47 (63,5%)	
davon:		
innerhalb der Wertegrenzen <sup>a</sup>	33 (44,6%)	
außerhalb der jeweiligen Wertegrenze <sup>b</sup>	9 (12,2%)	2 (2,7%)
außerhalb beider Wertegrenzen <sup>c</sup>	3 (4,1%)	
Nicht übereinstimmende Ergebnisse	27 (36,5%)	
Insgesamt nicht akzeptierte Ergebnisse	41 (55,4%)	

<sup>a</sup> Die Grenzen basieren beim API STAPH-System auf Prozentwert (%ID  $\geq$  80) und T-Index (T  $\geq$  0), beim VITEK 2-System auf dem T-Index (T  $\geq$  0).

<sup>b</sup> Bei Berücksichtigung des wahrscheinlichsten Ergebnisses für Resultate geringer Selektivität.

<sup>c</sup> Bei Überschreiten der Wertegrenzen beider Identifizierungssysteme.

<sup>d</sup> Bei nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen.

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Bakterien als potentielle Pathogene entdeckt worden, von denen man bislang annahm, dass sie harmlos sind. Viele dieser Bakterien, zu denen auch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Vertreter der Unterordnung *Micrococcineae* gehören, kommen ubiquitär vor und sind Bestandteil der Mikroflora der menschlichen Haut und Schleimhaut, was dazu führte, dass ihr Nachweis in klinischem Untersuchungsmaterial in der Vergangenheit oft als Kontamination bzw. Kolonisation gewertet wurde. Durch die Entwicklung verbesserter Nachweismethoden ist es möglich geworden, Bakterien genauer zu identifizieren und Infektionen sicherer den jeweiligen Krankheitserregern zuzuordnen.

Besonders die Entwicklung molekularer Techniken als Ergänzung oder Alternative zu herkömmlichen, phänotypischen Nachweismethoden hat viel zur genaueren Identifizierung von Bakterien beigetragen. Gegenstand der Untersuchung mittels molekularer Techniken sind genomische Strukturen, deren Zusammensetzung und strukturelle Merkmale ermittelt werden und die spezifisch für die jeweiligen Taxa sind. Mittlerweile ist eine Reihe solcher genomischer Zielregionen bekannt.

Von den genomischen Zielregionen hat das 16S-rRNA-Gen bisher die größte Bedeutung erlangt. Es findet sich im Gegensatz zu anderen genomischen Markern in allen lebenden Organismen und eignet sich daher sehr gut für Identifizierungszwecke. Aufgrund ihrer strukturellen Zusammensetzung aus konservierten, variablen und hochvariablen Regionen ist die Einstellung eines gewünschten Spezifitätsgrades und die Differenzierung von Mikroorganismen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen möglich. Als „multicopy“-Gen ist ihr Nachweis relativ einfach [45]. Neben ihren hervorragenden Eigenschaften als Werkzeug beim Nachweis und Differenzieren von Mikroorganismen hat die vergleichende Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens auch für die Klassifikation von Prokaryoten und die Untersuchung phylogenetischer Beziehungen unter denselben eine große Bedeutung erlangt [68]. Sie erlaubt zudem die sofortige Einteilung und Klassifikation bisher unbekannter Spezies in phylogenetische Linien auf verschiedenen taxonomischen Ebenen, während die Interpretation ungewöhnlicher, phänotypischer Reaktionsprofile eventuell unbekannter Spezies sehr schwierig, oft unmöglich ist. Viele neue Genera und Spezies konnten

durch sie entdeckt werden. Andere, bekannte Taxa wurden reklassifiziert. Es hat sich gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Taxa mittels herkömmlicher, phänotypischer Methoden nicht immer möglich ist. Dies hat viel zu einem besseren Verständnis über Bakterien, auch bzw. insbesondere hinsichtlich ihres pathogenen Potentials, beigetragen.

Die Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens ist im Moment das am weitesten verbreitete Mittel hinsichtlich der Untersuchung phylogenetischer Beziehungen unter Bakterien und wird in diesem Zusammenhang auch als „gold standard“ in der Identifizierung und Klassifikation derselbigen bezeichnet.

Bei der vergleichenden Sequenzanalyse wird die Basenfolge eines bestimmten Genomabschnittes bestimmt und analysiert. Im Falle der 16S-rDNA-Sequenzanalyse ist dies die Region, die das 16S-rRNA-Molekül kodiert. Die bestimmte Basenfolge der jeweiligen Sequenz wird dann mit Sequenzen bereits bekannter Mikroorganismen verglichen. Für eine möglichst genaue Identifizierung ist daher eine umfassende Datenbank korrekter Sequenzen nötig. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe verschiedener Datenbanken, von denen einige kommerziell und andere öffentlich und freizugänglich sind. Viele dieser Datenbanken sind in ihrer Konzeption und in ihrem Aufbau unterschiedlich und haben verschiedene Vor- und Nachteile.

„GenBank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) [14] ist die bekannteste öffentliche Datenbank und findet aufgrund ihrer offenen Struktur eine weitverbreitete Anwendung. Die Datenbankeinträge entstammen größtenteils wissenschaftlichen und kommerziellen Arbeitsgruppen, sind aber prinzipiell durch alle Anwender möglich, was das schnelle Wachstum dieser Datenbank erklärt. Das National Center for Biotechnology Information erhebt keine Beschränkungen hinsichtlich des Gebrauchs und der Verbreitung der verfügbaren Informationen. Diese offene Struktur hat maßgeblich zur umfassenden Größe und der Popularität von GenBank beigetragen. Allerdings resultieren hieraus eine Vielzahl an Problemen [96]: Aufgrund der fehlenden Kontrolle und Überprüfung beinhaltet sie eine Reihe fehlerhafter Einträge, zumal ein erheblicher Teil der Datenbank aus den frühen neunziger Jahren stammt, in denen Sequenzen nicht mit dem Qualitätsstandard heutiger technischer Mittel bestimmt werden konnten. So können Sequenzeinträge Basenfehler, Lücken innerhalb der

Sequenzen oder auch vermeintliche Lücken, sogenannte Pseudogaps, enthalten, die die exakte Identifizierung von Mikroorganismen mittels GenBank behindern. Hinzu kommen zwei- und mehrdeutige Basenbenennungen und inkomplette Sequenzen sowie uneinheitliche Längen der Sequenzenden. Es gibt darüberhinaus Hinweise, dass GenBank eine Reihe chimärischer, fehlerhafter Sequenzen enthält [48]. Chimäre sind in diesem Zusammenhang Sequenzen, die aus zwei oder mehreren, phylogenetisch separaten Ursprungssequenzen entstehen. Gewöhnlich entstehen sie durch Verunreinigungen während des PCR-Vorganges und suggerieren das Vorhandensein eines neuen, bisher unbeschriebenen Taxons.

Ein weiteres Problem ist die Nomenklatur der Einträge, die fehlerhaft, veraltet oder auch bisher nicht validiert sein können. Ebenso sind unbenannte und nicht näher gekennzeichnete Einträge möglich. Die Einträge sind nicht standardisiert und es fehlt sowohl an Richt- und Leitlinien als auch an einer notwendigen Qualitätskontrolle. Dies führt dazu, dass bei Anwendung der Datenbank zu Identifizierungszwecken eine absolute Übereinstimmung von 100% nicht vorausgesetzt werden kann und eher eine Seltenheit darstellt [84]. Andererseits lässt sich ein Ergebnis unterhalb dieses Wertes nur schwer interpretieren. Ergebnisse des Sequenzvergleichs im Bereich von 97% bis 99% können sowohl durch fehlerhafte Einträge innerhalb der Datenbank bei richtiger Identifizierung erklärt werden, als auch die Übereinstimmung zweier korrekter, nicht identischer Sequenzen unabhängiger Spezies beschreiben.

Hinzu kommt, dass bisher keine Grenzen festgelegt sind, die eine Identifizierung auf Spezies- und Genuslevel definieren. In der Vergangenheit wurden einige Male Grenzen vorgeschlagen [87, 33], die sich aber nicht durchsetzen konnten. Es hat sich gezeigt, dass sich verschiedene Genera mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entwickeln und verändern, so dass diese Grenzen voraussichtlich abhängig vom zu untersuchenden Genus festzulegen sind. Besonders die Klassifikation von Vertretern neuerer, erst kürzlich entstandener Spezies, wie beispielsweise einige *Bacillus*- und *Neisseria*-Stämme, ist durch die Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens nicht immer möglich und es sind weitere molekulare Verfahren, wie die DNA-DNA-Hybridisierung nötig, um diese einordnen zu können. Innerhalb eines Genus können erhebliche Werteschwankungen hinsichtlich des Sequenzvergleichs zwischen den diesem Genus zugehörigen Spezies auftreten. In der Datenbank des Microseq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing System

der Firma Applied Biosystems, einem kompletten, kommerziellen Identifizierungssystem zum Amplifizieren, Sequenzieren und anschließendem Sequenzvergleich von bakteriellen 16S-rDNA-Abschnitten, reichen die Übereinstimmungsunterschiede innerhalb des Genus *Mycobacterium* von 0,40% zwischen den Spezies *Mycobacterium mucogenicum* und *Mycobacterium farcinogenes* bis 4,36% zwischen den Spezies *Mycobacterium xenopi* und *Mycobacterium shimoidei* [70]. Verglichen wird hierbei ein Genomabschnitt mit einer Länge von annähernd 500 Basen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Identität der Typ- und Referenzsequenzen anhand der GenBank-Datenbank (Stand 08/2003) überprüft bzw. bestätigt. Als Grenze wurde eine Übereinstimmung im Sequenzvergleich ab 99% festgelegt, innerhalb derer in der vorliegenden Arbeit von einer Identifizierung auf Spezieslevel ausgegangen wurde.

Ein korrektes Ergebnis mit 100%iger Übereinstimmung nach aktueller Nomenklatur lieferte die Identifizierung von 11 der 21 Referenzsequenzen (52,4%). Weitere drei Spezies (14,3%) zeigten, ebenfalls nach aktueller Nomenklatur, eine Übereinstimmung von 99% mit Sequenzen der GenBank-Datenbank. Insgesamt wurden sieben Referenzsequenzen nach alter Nomenklatur richtig erkannt (33,3%), wobei drei (14,3%) mit 100%iger Übereinstimmung und vier (19,0%) mit 99%iger Übereinstimmung richtig bestimmt wurden. *Oerskovia turbata* wurde sowohl nach aktueller Nomenklatur als auch als *Cellulomonas turbata* nach alter Nomenklatur mit 100%iger Übereinstimmung und als nicht näher beschriebene *Cellulomonas*-Spezies mit 99%iger Übereinstimmung identifiziert. *Brevibacterium otitidis* wurde neben der korrekten Identifizierung auch als nicht näher beschriebene *Brevibacterium*-Spezies mit 100%iger Übereinstimmung bestimmt.

Insgesamt wurden alle Referenzsequenzen nach aktueller und alter Nomenklatur richtig bestimmt (100%), wenn man das Suchergebnis mit der höchsten Übereinstimmung berücksichtigte. Es wurden aber auch einige erwähnte Schwächen dieser Datenbank deutlich. Aufgrund der Fülle der Einträge liefert der Sequenzvergleich eine Reihe von Ergebnissen, deren Prozentwerte identisch sind bzw. eng beieinanderliegen. Es kann sich hierbei um identische, nach unterschiedlicher Nomenklatur benannte Stämme oder aber zwei differente Spezies handeln, so dass die Ergebnisse weiter analysiert und interpretiert werden müssen. Die fehlende Aktualisierung der Einträge und

unzureichende Beschreibungen der jeweiligen Sequenzen tragen zu Unübersichtlichkeit bei und erschweren die Auswertung der Ergebnisse. Selten finden sich übereinstimmende Resultate mit hohen Übereinstimmungswerten und einheitlicher, aktueller Nomenklatur, die eine schnelle und exakte Bearbeitung der Ergebnisse begünstigen und zu einer verlässlichen Identifizierung führen, die in der klinischen Mikrobiologie hinsichtlich der weiteren Diagnostik und möglicher therapeutischer Schritte nötig ist.

Angesichts der Probleme, mit denen die Benutzung öffentlicher Datenbanken wie GenBank behaftet ist, haben sich qualitätskontrollierte Datenbanken von zumeist kommerziellen Anbietern zu einer wichtigen Alternative entwickelt. Hierzu gehört die angesprochene Datenbank des Microseq 500 16S Bacterial System der Firma Applied Biosystems, welches ein komplettes System zur Amplifikation, Sequenzierung und Analyse eines definierten Abschnittes des bakteriellen 16S-rRNA-Gens darstellt. Bei diesem Abschnitt handelt es sich um eine Region am 5'-Ende der 16S-rDNA mit einer Länge von annäherungsweise 500 Basenpaaren, die sich hinsichtlich der Identifizierung und Klassifikation von Bakterien als ähnlich aussagekräftig herausgestellt hat wie der komplette 16S-rDNA-Abschnitt mit einer Länge von etwa 1500 Basenpaaren. Bei den Einträgen der Datenbank handelt es sich um Neubestimmte, einheitliche, d.h. in ihrer Länge, Anfangs- und Endposition genormte Sequenzen von Stämmen aus der American Type Culture Collection (ATCC). Diese Stämme beinhalten neben Referenzstämmen den jeweiligen Typstamm. Letzterer stellt gemeinhin den Prototyp einer Spezies dar, der bei Erstbeschreibung dieser Spezies definiert werden muss. Viele der Probleme öffentlicher, freizugänglicher Datenbanken können dadurch vermieden werden. Die Identifizierung von Mikroorganismen durch das Microseq 500-System hat sich als für den klinisch-mikrobiologischen Alltag tauglich erwiesen und sich im Vergleich zu herkömmlichen, phänotypischen Nachweismethoden als schnellere und genauere Alternative durchgesetzt, was beispielsweise bei der Identifizierung coryneformer Bakterien [94] oder auch von klinischen Isolaten, die durch konventionelle Methoden nicht bestimmbar waren [31], gezeigt werden konnte.

Die Datenbank dieses Identifizierungssystems hat allerdings auch einige Schwächen. Zum einen sind mit ihrer Nutzung zusätzliche Kosten verbunden, da jede Abfrage dieser

Datenbank kostenpflichtig ist. Zum anderen hat sich gezeigt, dass sie keine umfassende Datenbank darstellt und einige, teils klinisch bedeutsame Spezies fehlen, was zu uneindeutigen bzw. falschen Identifizierungsergebnissen führt, so dass man auf andere Datenbanken, wie beispielsweise GenBank, zurückgreifen muss [103]. Ein weiterer Nachteil der Microseq-Datenbank ist die Nichtberücksichtigung von Mikroheterogenitäten innerhalb eines Taxons. Für jede Spezies findet sich lediglich ein Eintrag in der Datenbank. Lange Zeit fanden intraspezifische Sequenzvariabilitäten wenig Beachtung und wurden als eher selten und gering, auf einige wenige Basen innerhalb des 16S-rRNA-Gens beschränkt, eingeschätzt. Unterschiede zweier Sequenzen des gleichen Taxons wurden oft auf fehlerhafte Einträge zurückgeführt. Es hat sich aber gezeigt, dass ihre Zahl weit unterschätzt wurde und dass es große Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der variablen Basen zwischen verschiedenen Spezies gibt. Clayton et al. konnten anhand von rRNA-Gensequenzen der GenBank-Datenbank zeigen, dass die Anzahl der Taxa mit variablen Basenpositionen größer ist, als gemeinhin durch Sequenzfehler erklärt werden könnte und dass die Annahme, dass eine Sequenz eines Isolates ein Taxon adäquat repräsentiert, gerade im Bezug auf phylogenetische Untersuchungen falsch sein kann [19]. Für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Spezies *Micrococcus luteus* konnten beispielsweise 16S-rDNA-Sequenzunterschiede von bis zu 2,1% bei einer Länge von knapp 1430 Basenpaaren zwischen den proklamierten, verschiedenen Biovaren dieses Taxons festgestellt werden [101].

Um die Existenz von Mikroheterogenitäten innerhalb der jeweiligen Spezies zu verifizieren oder zu widerlegen und ihre eventuelle Größe zu quantifizieren, ist eine umfassende Datenbank von Sequenzen verschiedener Isolate einer Spezies nötig. Diese Datenbank würde das jeweilige Taxon mitsamt seiner heterogenen Merkmale hinreichend repräsentieren. Die Microseq-Datenbank erfüllt dieses Kriterium bisher nicht.

Das Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM)-Projekt [44] wurde als Hilfsmittel zur Identifizierung von klinisch relevanten Mikroorganismen entwickelt. Einen wesentlichen Teil dieses Projektes stellt die diagnostikorientierte Datenbank dar, die Merkmale sowohl öffentlicher als auch kommerzieller Datenbanken

enthält und eine Alternative zu diesen ist. Ähnlich wie beim Microseq-System beinhaltet die Datenbank, deren Nutzung freizugänglich und gebührenfrei ist, neubestimmte, genormte 16S-rDNA-Sequenzen einheitlicher Länge, Anfangs- und Endposition, wobei beim RIDOM-Projekt die Sequenz zwischen und einschließlich den Basenpositionen 54 und 510 am 5'-Ende, entsprechend den Positionen bei *Escherichia coli*, maßgeblich ist. Dieser Sequenzabschnitt ist aufgrund struktureller Merkmale hinsichtlich Identifikation und Klassifikation von Mikroorganismen ähnlich aussagekräftig wie die vollständige 16S-rDNA-Sequenz, aber weniger aufwendig, kostspielig und zeitintensiv zu bestimmen und ähnelt in Länge und Lokalisation dem Sequenzabschnitt, der für die Microseq-Datenbank verwendet wird. Um einen hohen Qualitätsstandard zu halten, werden nur Stämme aus bekannten Stammsammlungen berücksichtigt, allerdings ist die Datenbank wegen des Problems der intraspezifischen Variabilität nicht auf einen einzelnen Eintrag pro Spezies beschränkt.

Ist das Ergebnis mehrdeutig oder nicht bis auf Spezies- bzw. Subspeziesniveau bestimmbar, werden in einem polyphasischen Ansatz Hinweise zu weiteren Identifizierungsschritten gegeben, die sowohl auf weiteren molekularen als auch auf konventionellen, phänotypischen Techniken basieren können. Es hat sich gezeigt, dass, obwohl die beim RIDOM-Projekt verwendete 16S-rDNA-Sequenz für die genaue Identifizierung und Klassifikation der meisten Spezies ausreichend ist, einige Taxa erst durch weitere Nachweismethoden bestimmt werden können. Beispielsweise konnten Harmsen et al. [43] in einer Studie zeigen, dass von 89 zu diesem Zeitpunkt (Stand 03/2000) valide beschriebenen Spezies und Subspezies des Genus *Mycobacterium* 64 durch 16S-rDNA-Sequenzierung identifiziert werden konnten. 16 weitere Stämme konnten durch die Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer (ITS)-Region, einem DNA-Abschnitt zwischen der 16S- und der 23S-rDNA-Sequenz, bestimmt werden. Neun Stämme, darunter vier Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* und drei *Mycobacterium avium*-Subspezies, konnten weder durch ihre 16S-rDNA- noch durch die ITS-Sequenzen differenziert werden und mussten durch weitere molekulare und phänotypische Nachweismethoden bestimmt werden.

In einer weiteren Studie wurden im Rahmen des RIDOM-Projektes 55 klinische Staphylokokkenisolate anhand der 16S-rDNA-Sequenzanalyse bestimmt [10], wobei

die Referenzdatenbank die Sequenzen aller 81 zu der Zeit valide beschriebenen *Staphylococcus*-Spezies und –Subspezies beinhaltet. 54 Stämme (98,2%) konnten innerhalb der vorgeschlagenen Übereinstimmungsgrenzen identifiziert werden, davon 48 Stämme (87,3%) mit einer Übereinstimmung von 100%. Die Sequenzanalyse lieferte insgesamt vier mehrdeutige Ergebnisse auf Speziesniveau, so dass weitere Identifizierungsschritte nötig waren. Insgesamt zeigte sich die Sequenzanalyse anhand der RIDOM-Datenbank sowohl der GenBank-Sequenzanalyse als auch phänotypischen Methoden überlegen.

Neben dem Suchergebnis liefert die RIDOM-Datenbank Spezies- und Genusbeschreibungen hinsichtlich Morphologie, Physiologie, Pathogenität und Verbreitung des jeweiligen Mikroorganismus und stellt Informationen über differentialdiagnostische Kriterien bereit. Ebenso enthält sie taxonomische Informationen, deren Aktualität mit Hilfe der Bacterial Nomenclature up-to-date-Datenbank der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) geprüft wird, welche auf Veröffentlichungen im „International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology“ basiert. Im Gegensatz zum Microseq-System ist es beim RIDOM-System aufgrund seiner Hypertext-Struktur möglich, über Links weitere Informationen aus hilfreichen Internetquellen zu erhalten und miteinzubeziehen. Neue Einträge werden entsprechend den „Guidelines and Conventions for the purpose of Biological classification“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) klassifiziert. Um detaillierte Sequenzvergleiche zu ermöglichen, werden, zusätzlich zu den Sequenzen der Datenbank, die jeweiligen Elektropherogramme zur Verfügung gestellt.

Der Datenbestand der Datenbank des RIDOM-Projektes ist hinsichtlich des Umfangs und der Breite der aufgeführten Mikroorganismen nicht mit umfassenden Datenbanken wie beispielsweise GenBank zu vergleichen, wird jedoch weiter ausgebaut. Bezüglich der beinhalteten Bakteriengruppen bietet sie eine umfangreiche Sequenzsammlung und stellt eine Alternative zu anderen Datenbanken dar. Cloud et al. [20] konnten zeigen, dass die RIDOM-Datenbank hinsichtlich Mykobakterienspezies umfangreicher ist als die Microseq-Datenbank, was zu einer höheren Nachweisquote und genaueren Identifizierung klinischer Isolate gegenüber phänotypischen Nachweismethoden und dem Microseq-System führte. In einer weiteren Studie [63] bezüglich der Gattung

*Nocardia* wurden 71,4% der klinischen Isolate mit einer Sequenzübereinstimmung von 100% durch RIDOM identifiziert, während Microseq 26,4% und GenBank 59,3% der Isolate exakt bestimmten, wobei 70,4% der von GenBank mit 100%iger Sequenzübereinstimmung bestimmten Resultate sich auf mehr als eine *Nocardia*-Spezies bezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden als Teil des Ribosomal Differentiation of Microorganisms-Projektes die partielle 16S-rDNA-Sequenz einer heterogenen Bakteriengruppe ermittelt, deren Kern das Genus *Micrococcus* bildet, wie es im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 von 1986 [52] dargestellt ist. Dieser Kern wurde durch einige verwandte Spezies ergänzt, die, ebenso wie das Genus *Micrococcus*, Familien der Unterordnung *Micrococccineae* angehören [89]. Diese Sequenzen sollen als Typ- und Referenzsequenzen die Datenbank des RIDOM-Projektes erweitern. Um einen Hinweis auf die Vollständigkeit und Qualität dieser Gruppe von Sequenzen bezüglich der durch sie repräsentierten Bakterien zu bekommen, wurden 74 klinische Isolate, die nach alter Nomenklatur aufgrund phänotypischer Merkmale als Mikrokokken identifiziert wurden, entsprechend des RIDOM-Ansatzes sequenziert und anhand der Typ- und Referenzsequenzen analysiert. Die klinischen Isolate entstammen der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster und wurden aus Haut- und Schleimhautabstrichen gewonnen. Die Ergebnisse wurden anschließend mit denen zweier kommerziell verfügbarer Identifizierungssysteme verglichen, die auf biochemischen Testmethoden und einer spezifischen Datenbasis zur Auswertung der Reaktionsergebnisse beruhen. Es handelte sich hierbei zum einen um das API STAPH-System (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) und zum anderen um das VITEK 2-System (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France).

Für die Identifizierung auf Spezieslevel wurde hinsichtlich der Sequenzanalyse die Grenze bei 99% festgelegt. Diese Grenze wurde, zusammen mit einer Grenze für die Identifizierung auf Genuslevel bei 97%, unter anderem auch in einer Studie über die Identifizierung konventionell nicht identifizierbarer, bakterieller Isolate durch annähernd vollständige 16S-rDNA-Sequenzierung vorgeschlagen [28] und erscheint

aufgrund der Heterogenität der in dieser Arbeit behandelten Bakteriengruppe angemessen.

Von den 74 klinischen Isolaten konnten 38 (51,4%) anhand der Referenzsequenzen innerhalb des Grenzbereiches identifiziert werden. Dabei lag für drei dieser Isolate (4,1%) die Übereinstimmung der Sequenzen bei 100%. Es wurden 36 Stämme als *Micrococcus luteus* und jeweils ein Stamm als *Kocuria rosea* bzw. *Kocuria kristinae* identifiziert. Innerhalb einer Grenze von 98% wurden 52 (70,3%) und innerhalb einer Grenze von 97% 54 der 74 klinischen Isolate (73,0%) bestimmt. Die Ergebnisse der nicht bis auf Spezieslevel bestimmten Stämme reichten bis 86,46% für einen als *Kocuria kristinae* identifizierten Stamm, wobei von diesen 36 Isolaten zwei mit *Micrococcus luteus*, 16 mit *Kocuria varians*, 14 mit *Kocuria rosea*, zwei mit *Dermabacter hominis* und jeweils einer mit *Kocuria kristinae* bzw. *Rothia mucilaginosa* die höchste Übereinstimmung zeigten. Insgesamt lag der Mittelwert der Identifizierungsergebnisse bei 97,8%.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 21 in dieser Arbeit verwendeten Typ- und Referenzsequenzen die Gruppe der klinischen Isolate nicht ausreichend widerspiegelt. Diese Isolate entstammen Haut- und Schleimhautabstrichen und wurden vormals aufgrund morphologischer Merkmale nach Gramfärbung mit großen grampositiven Kokken in Tetraden oder in Traubenlagerung sowie aeroben Wachstum von katalasepositiven, gewöhnlich runden, glatt begrenzten, pigmentierten Kolonien auf Furazolidonagar vorläufig als Mikrokokken identifiziert. Zur Differenzierung gegenüber Staphylokokken wurde das Resistenzverhalten gegenüber Lysostaphin, Bacitracin sowie Lysozym getestet. Die nach damaliger Klassifikation dem Genus *Micrococcus* zugeteilten Taxa sind mittlerweile reklassifiziert worden und wurden in insgesamt sechs Genera, davon vier Neubestimmte, eingeteilt [51,88], die auf die beiden Familien *Micrococcaceae* und *Dermacoccaceae* der Unterordnung *Micrococcineae* verteilt sind. Lediglich *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae* gehören von den damaligen Vertretern noch diesem Genus an. Diese Umgliederung basierte, neben Untersuchungen der chemotaxonomischen Eigenschaften, auf Analysen der 16S-rDNA-Sequenzen dieser Bakteriengruppe. Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse hat zur Beschreibung vieler neuer Taxa beigetragen und zur taxonomischen Trennung von Stämmen geführt, die mit herkömmlichen, phänotypischen Untersuchungstechniken nicht zu unterscheiden waren.

Es lässt sich vermuten, dass es sich bei der in der vorliegenden Arbeit behandelten Gruppe klinischer Isolate um eine heterogene Bakteriensammlung handelt, deren Stämme nicht auf die neun, nach alter Klassifikation dem Genus *Micrococcus* zugeteilten Spezies, die unter neuer Nomenklatur als Teil der Typ- und Referenzsequenzen vertreten waren, begrenzt waren und deren anderweitige Zugehörigkeit sich durch die obengenannten, phänotypischen Tests nicht nachweisen ließ.

Die Ergebnisse verdeutlichen zudem ein Problem der 16S-rDNA-Sequenzanalyse, da sie Raum für Interpretationen lassen. Noch gibt es keine allgemein gültigen Nachweisgrenzen für Identifizierungen auf Spezies- und Genusniveau und es hat sich gezeigt, dass sich nach aktueller Klassifikation die Wertebereiche der inter- und intraspezifischen Sequenzdifferenzen überlagern. Viele Grenzen, darunter auch eine Sequenzdifferenz von 0,5% für separate Spezies innerhalb eines Genus [68], wurden vorgeschlagen, doch aufgrund der unterschiedlichen Entwicklungs- und Veränderungsrate der verschiedenen Taxa scheint eine genus- und speziesspezifische Beurteilung der Übereinstimmungswerte sinnvoll. Viele Vertreter der in dieser Arbeit vorgestellten Unterordnung *Micrococcineae* sind erst in den letzten Jahren als potentielle Pathogene identifiziert und untersucht worden, weswegen die phänotypischen, chemotaxonomischen und genomischen Eigenschaften dieser Bakteriengruppe noch nicht hinreichend bekannt sind.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden anschließend mit denen der kommerziellen, auf biochemischen Testmethoden beruhenden Identifizierungssysteme API-STAPH und VITEK 2 verglichen. Insgesamt gab es bei 22 der 74 klinischen Isolate (29,7%) für alle drei Identifizierungssysteme ein übereinstimmendes Ergebnis innerhalb der jeweiligen Akzeptanzgrenzen, wobei alle 22 Stämme als *Micrococcus luteus* bzw. im Falle des API-STAPH-Systems als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp., die neben *Micrococcus luteus* die Spezies *Dermaococcus nishinomiyaensis*, *Kytococcus sedentarius* und *Micrococcus lylae* umfasst, zugehörig identifiziert wurden. 52 Stämme (70,3%) wurden aufgrund von mehrdeutigen bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen nicht eindeutig identifiziert.

Das API STAPH-System lieferte für 36 der 74 klinischen Isolate (48,6%) mehrdeutige Profile, von denen 15 einheitlich und innerhalb der angegebenen Wertegrenzen identifiziert wurden, wobei zehn als *Micrococcus* spp., vier als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* und einer als *Kocuria kristinae* bestimmt wurden. Von den Identifizierungsergebnissen der 38 Stämmen mit eindeutigem Profil (51,4%) wurden sechs als „ausgezeichnet“, 16 als „sehr gut“, acht als „gut“ und eins als „akzeptabel“ bewertet, so dass insgesamt 31 Stämme (41,9%) zufriedenstellend identifiziert werden konnten. Dabei wurden 24 Stämme als *Micrococcus* spp., sechs als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* und einer als *Kocuria kristinae* identifiziert. Die Profile von sieben Stämmen (9,5%) zeigten eine „geringe Selektivität“ und lieferten mehrdeutige Ergebnisse.

Die Ergebnisse des API STAPH-Systems und der 16S-rDNA-Sequenzanalyse kamen im Vergleich zu 31 übereinstimmenden Identifizierungen (41,9%) innerhalb der Wertegrenzen, wobei alle 31 Stämme als *Micrococcus luteus* bzw. als der Spezies-Gruppierung *Micrococcus* spp. zugehörig identifiziert wurden. Für weitere 25 Stämme (33,8%) lagen die Ergebnisse für eines oder beide dieser Identifizierungssysteme bei übereinstimmender Identifizierung außerhalb der Wertegrenzen, davon in zwölf Fällen bezüglich des RIDOM-Systems und in vier Fällen bezüglich des API STAPH-Systems. Neun Stämme konnten bei Überschreitung der Wertegrenzen beider Systeme übereinstimmend identifiziert werden. Insgesamt kam es bei 43 Stämmen (58,1%) zu nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Toleranzgrenzen liegenden Ergebnissen.

VITEK 2 konnte 60 der 74 Stämme (81,1%) mit tolerierbaren Ergebnissen einer Spezies der Datenbank zuteilen. Für 13 klinische Isolate (17,6%) zeigten die Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ und waren einer Spezies nicht eindeutig zuzuordnen. Ein Stamm (1,4%) konnte durch VITEK 2 nicht identifiziert werden. Von den Ergebnissen der identifizierten 60 Stämme wurden 50 mit „ausgezeichnet“, fünf mit „sehr gut“, drei mit „gut“ und zwei mit „akzeptierbar“ bewertet. 30 Stämme wurden dabei als *Micrococcus luteus*, 25 als *Kocuria rosea* und zwei als *Kocuria varians* identifiziert. Daneben wurden zwei klinische Isolate als *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*) und ein Stamm als *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*) identifiziert. RIDOM und VITEK 2 hatten insgesamt 28 übereinstimmende Identifizierungsergebnisse (37,8%). Hierbei wurden 27 Stämme als *Micrococcus luteus*

und ein Stamm als *Kocuria rosea* identifiziert. Bei 13 klinischen Isolaten (17,6%) lag das Ergebnis für eines oder beide dieser Identifizierungssysteme außerhalb der tolerierten Wertegrenzen, davon in 10 Fällen hinsichtlich des RIDOM- und in zwei Fällen hinsichtlich des VITEK 2-Systems. Ein Stamm wurde bei Überschreitung beider Toleranzgrenzen übereinstimmend bestimmt. Insgesamt kam es für 46 Stämme zu nicht übereinstimmenden bzw. außerhalb der Wertegrenzen liegenden Ergebnissen (62,2%). Diese API STAPH- und VITEK 2-Ergebnisse und ihre große Diskrepanz zu den Ergebnissen des 16S-rDNA-Sequenzvergleichs des RIDOM-Systems zeigen einige Probleme der auf phänotypischen, biochemischen Testmethoden basierenden Identifizierung von Mikroorganismen auf. Das API STAPH-System konnte sieben der 74 klinischen Isolate (9,5%) aufgrund „geringer Selektivität“ der Ergebnisse nicht eindeutig bestimmen. Im Falle des VITEK 2-Systems betraf dies 13 Stämme (17,6%), während ein weiterer Stamm als nicht identifizierbar deklariert wurde. Beide Systeme gaben bei Ergebnissen mit niedriger Selektivität einige in Frage kommende Taxa aus ihrer Datenbank an. Die Aussagekraft dieser Identifizierungen bleibt allerdings beschränkt und die Ergebnisse wurden als nicht akzeptierbar bzw. auswertbar eingestuft, während die 16S-rDNA-Sequenzen auch im Falle nicht eindeutiger Identifizierungen eine gewisse Aussagekraft hinsichtlich der taxonomischen und phylogenetischen Einstufung des jeweiligen Stammes besitzen und die Eingliederung in Datenbanken erlauben, die eine nachträgliche Identifizierung oder Zuordnung durch weitere Einträge ermöglichen. 21 der 74 klinischen Isolate (28,4%) konnten bei mehrdeutigen Profilen aufgrund nicht übereinstimmender Identifizierungsergebnisse bzw. Ergebnissen niedriger Selektivität nicht eindeutig durch API STAPH identifiziert werden. Die Auswertung der Testreaktionen erfolgte manuell bzw. visuell anhand einer Ablesetabelle und verdeutlicht die Schwierigkeiten, die mit der Interpretation solcher Reaktionen verbunden sind. Für 27 der 36 Stämme mussten zwei Profile in Betracht gezogen werden. Die Auswertung der Testreaktionen für weitere acht Stämme führte zu vier möglichen Profilen und für einen Stamm kamen acht Profile in Betracht. Die Auswertung phänotypischer bzw. biochemischer Testreaktionen erfordert viel Erfahrung seitens der Untersucher und lässt Raum für Interpretationen. Es hat sich gezeigt, dass diese Reaktionen nicht zuletzt von der Stoffwechselaktivität des untersuchten Stammes abhängen und die Ergebnisse in einem gewissen Rahmen

variieren. Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Spezies und intraspezifische Unterschiede können zu Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Mikroorganismen führen. Für API STAPH ist auch eine automatisierte Auswertung der Reaktionsergebnisse durch einen Computer möglich. Dieses Verfahren kam in der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung und kann daher nicht beurteilt werden.

Ein weitere potentielle Schwachstelle bei der Identifizierung der in dieser Arbeit verwendeten klinischen Isolate durch API STAPH und VITEK 2 liegt in der unzureichenden Datenbasis dieser beiden Systeme zur Auswertung der Testergebnisse. Die Datenbank des API STAPH-Systems, einem System zur Identifizierung von Staphylokokken und Mikrokokken, enthielt neben 19 Staphylokokkenspezies die hier vorgestellten und nach alter Nomenklatur benannten Taxa *Micrococcus kristinae* und, als Spezies-Gruppierung zusammengefasst, *Micrococcus varians* und *Micrococcus roseus*. Als weitere Spezies-Gruppierung wurden nach alter Nomenklatur die Spezies *Micrococcus nishinomiyaensis*, *Micrococcus sedentarius*, *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae* unter der Bezeichnung *Micrococcus* spp. zusammengefasst. Die Datenbank des VITEK 2-Systems, einem System zur Identifizierung wichtiger, grampositiver Keime, enthielt neben verschiedenen Staphylokokken-, Streptokokken- und Enterokokkenspezies die Taxa *Aerococcus viridans* und *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*) sowie die in der vorliegenden Arbeit behandelten Spezies *Kocuria rosea*, *Kocuria varians* und *Micrococcus luteus*. Ob hinsichtlich der klinischen Mikrobiologie die Beschränkung auf diese Taxa und ihre Einteilung in Spezies-Gruppierungen ausreichend ist, bleibt in Anbetracht der wachsenden klinischen Bedeutung dieser Bakteriengruppe fragwürdig.

Alle von API STAPH mit eindeutigen Ergebnis identifizierten klinischen Isolate konnten den Spezies bzw. Spezies-Gruppierungen *Kocuria kristinae*, *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* und *Micrococcus* spp. zugeordnet werden. Allerdings zeigten zehn Stämme, deren Identifizierungen bei eindeutigen Profilen von API STAPH von „ausgezeichnet“ bis „akzeptierbar“ bewertet wurden, für RIDOM, mit Werten zwischen 94,98% und 98,85% und einem Mittelwert von 97,83%, Ergebnisse außerhalb der tolerierten Wertegrenzen. Hierbei wurden von API STAPH sechs Stämme als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea*, drei als *Micrococcus* spp. und einer als *Kocuria kristinae*. Fünf der als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* bestimmten klinischen Isolate wurden von

RIDOM mit Sequenzübereinstimmungswerten zwischen 98,18% und 98,64% als *Kocuria varians* identifiziert. Ein Stamm, der bei zwei Profilen von API STAPH übereinstimmend als *Kocuria kristinae* identifiziert wurde, wurde von RIDOM mit einer Wahrscheinlichkeit von 98,18% als *Kocuria varians* bestimmt. Die Identifizierung von vier Stämmen mit mehr als einem Profil bei übereinstimmendem Identifizierungsergebnis wurde durch RIDOM, jedoch außerhalb der RIDOM-Wertegrenzen, bestätigt.

Die Identifizierung von sieben durch RIDOM innerhalb der Wertegrenzen bestimmte Stämme konnten durch API STAPH nicht bestätigt werden.

57 der 60 durch VITEK 2 eindeutig identifizierten Stämme konnten den Spezies *Micrococcus luteus*, *Kocuria rosea* und *Kocuria varians* zugeordnet werden. Daneben wurden zwei klinische Isolate als *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*) und ein Stamm als *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*) identifiziert. 30 VITEK 2-Identifizierungen konnten aufgrund von RIDOM-Werten zwischen 86,46% und 98,85% und einem entsprechenden Mittelwert von 96,4% nicht bestätigt werden. Hierbei wurden von VITEK 2, neben den zwei als *Streptococcus acidominimus*/(*Streptococcus pneumoniae*) identifizierten Stämmen, 23 Stämme als *Kocuria rosea*, drei als *Micrococcus luteus* und zwei als *Kocuria varians* bestimmt. Für acht durch RIDOM innerhalb der Wertegrenzen bestimmte Stämme zeigten die VITEK 2-Ergebnisse eine „geringe Selektivität“. Zwei weitere durch RIDOM als *Micrococcus luteus* und, mit einer Sequenzübereinstimmung von 100%, *Kocuria rosea* bestimmte Stämme identifizierte VITEK 2 als *Kocuria rosea* bzw. *Gemella* spp./(*Streptococcus pneumoniae*). Sechs Stämme zeigten sowohl für VITEK 2 als auch für RIDOM Ergebnisse außerhalb der festgesetzten Wertegrenzen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten klinischen Isolate um eine heterogene Gruppe von Bakterien handeln könnte, die phänotypisch durch die Identifizierungssysteme API STAPH und VITEK 2 nicht zu unterscheiden sind und den angegebenen Taxa der Genera *Micrococcus* und *Kocuria* ähneln. Zusätzlich liegt die Vermutung nahe, dass bei validen und tolerierbaren RIDOM-Ergebnissen diese beiden Systeme, im Falle nicht übereinstimmender Identifizierungen, den jeweiligen Stamm nicht korrekt bestimmt haben.

Vergleicht man die API STAPH-Ergebnisse mit den VITEK 2-Ergebnissen, so gibt es für 33 Stämme (44,6%) ein übereinstimmendes Identifizierungsergebnis innerhalb beider Wertegrenzen, wobei 24 Stämme als *Micrococcus luteus* bzw. *Micrococcus* spp., acht Stämme als *Kocuria rosea* bzw. der Spezies-Gruppierung *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* zugehörig und einer als *Kocuria varians* und entsprechend als *Kocuria varians*/*Kocuria rosea* identifiziert wurden. Für elf bei Berücksichtigung des Identifizierungsergebnisses mit der höchsten Wahrscheinlichkeit übereinstimmend identifizierte Isolate lagen die Ergebnisse für eines der beiden Identifizierungssysteme außerhalb der Toleranzgrenzen und zeigten eine niedrige Selektivität, davon in zwei Fällen VITEK 2 und in neun Fällen API STAPH betreffend. Insgesamt lagen die Ergebnisse bei 14 der 74 klinischen Isolate (5,4%) für eines oder für beide Identifizierungssysteme außerhalb der Wertegrenzen. Die Identifizierung von 41 Isolaten (55,4%) kam nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen, wobei die Identifizierung von 27 Stämmen (36,5%) nicht übereinstimmend war. Elf Stämme konnten aufgrund von mehrdeutigen API STAPH-Profilen bei nicht übereinstimmender Identifizierung nicht weiter ausgewertet werden. Für sieben klinische Isolate zeigten die VITEK 2-Ergebnisse und für weitere vier die API STAPH-Ergebnisse eine „geringe Selektivität“ für mindestens ein Profil bei nicht übereinstimmender Identifizierung. Zwei Isolate zeigten bei Überschreiten beider Wertegrenzen eine uneinheitliche Identifizierung.

Die Identifizierung von 23 Stämmen mit tolerierbaren VITEK 2-Ergebnissen konnte durch API STAPH nicht bestätigt werden, wobei 17 Stämme mehrdeutige API STAPH-Profile bei uneinheitlicher Identifizierung und sechs Stämme eine „geringe Selektivität“ zeigten. Die Identifizierung von neun Stämmen mit tolerierten API STAPH-Ergebnissen konnte aufgrund niedrig selektiver VITEK 2-Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in diesem Fall zwei auf biochemischen Testmethoden basierende Identifizierungssysteme auf uneinheitliche Resultate kommen, wobei die Vielzahl der mehrdeutigen API STAPH-Profile berücksichtigt werden muss, die nicht weiter ausgewertet wurden. In einer ähnlichen Studie hinsichtlich der Identifizierung von Staphylokokken durch RIDOM und die zwei auf biochemischen Testmethoden basierende Identifizierungssysteme ID 32 Staph (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France)

und VITEK 2 [10] wurden 54 von 55 (98,2%) der klinischen Isolate durch RIDOM identifiziert, während ID 32 STAPH 13 (23,6%) und VITEK 2 19 (34,5%) der Isolate aufgrund inkorrekt identifizierter und unakzeptabler Ergebnisse nicht bestimmen konnte. In anderen Studien identifizierte VITEK 2 387 von 405 klinischen Staphylokokkenisolate (95,6%) [85], wobei übereinstimmende Ergebnisse mit ID 32 STAPH als korrekte Identifikation betrachtet wurden, und 351 von 384 klinisch relevante, grampositive Kokkenisolate (91,4%) [56], wobei für die Staphylokokkenisolate, von denen 185 von 200 korrekt identifiziert wurden (92,5%) das API STAPH-System als Bestätigungstest diente. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass VITEK 2 in einigen Fällen koagulase-negative Staphylokokken (CoNS) fälschlicherweise als *Kocuria*-Spezies identifiziert [13] und es lässt sich vermuten, dass koagulase-negative Staphylokokken, die ähnlich wie die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Vertreter der Unterordnung *Micrococcineae* Teil der menschlichen Haut- und Schleimhautflora sind, oder andere, phänotypisch nur schwer von Mikrokokken zu unterscheidende Taxa jenseits der in dieser Arbeit verwendeten Referenz- und Typspezies ursächlich für die hohe Anzahl an divergierenden Identifizierungen der beiden biochemischen Identifizierungssysteme und RIDOM sind. Dies würde die relativ hohe Anzahl an *Kocuria*-Spezies von 27 bei 60 Identifizierungen (45,0%) erklären, die durch VITEK 2 bestimmt wurden, während durch RIDOM zwei von 38 Stämmen (5,3%) und durch API STAPH zwölf von 46 Stämmen (26,1%) als *Kocuria*-Spezies identifiziert wurden. Diese Vermutung wird durch die relativ großen Sequenzunterschiede der klinischen Isolate unterstützt. Um eine genauere Aussage über die Identität der uneinheitlich identifizierten Stämme und die Ursache der divergierenden Ergebnisse machen zu können, wäre eine weitere Analyse und Bestätigung des jeweiligen biochemischen und genomischen Profils nötig. Es hat sich gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenz- und Typsequenzen für die vollständige Identifizierung der klinischen Isolate nicht ausreichend waren und die Datenbank hinsichtlich dieser Bakteriengruppe ausgeweitet und ergänzt werden muss.

Die Bedenken, die oft gegenüber DNA-Sequenzierung als diagnostisches Mittel angeführt werden, richten sich in erster Linie gegen die hohen Kosten, die mit der

Anschaffung der nötigen Geräte und der weiteren Ausrüstung verbunden sind. Allerdings sind die Kosten mit der zunehmenden Verbreitung dieser Technologie in der klinischen Mikrobiologie gesunken und es kann mit einer weiteren Reduzierung der Kosten gerechnet werden, da sich die DNA-Sequenzierung mehr und mehr neben phänotypischen Identifizierungssystemen etabliert. Für nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) konnte bereits gezeigt werden, dass die 16S-rDNA-Sequenzierung mit 47,91\$ günstiger sein kann als herkömmliche, phänotypische Nachweismethoden, die in dieser Studie, abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit und biochemischer Aktivität, zwischen 80,93\$ und 173,23\$ kosteten [24]. Die DNA-Sequenzierung hat sich als genauere und schnellere Identifizierungsmethode erwiesen und ist im Falle der 16S-rDNA-Region aufgrund ihres ubiquitären Auftretens zur Identifizierung aller Mikroorganismen geeignet, wohingegen die phänotypische Identifizierung eine Vielzahl an teils spezifischen Reaktionen voraussetzt, die sehr aufwendig und zeitintensiv sein können. Während die Identifizierung eines Taxons durch Sequenzierung ein bis zwei Tage in Anspruch nimmt, kann der Nachweis durch herkömmliche, phänotypische Methoden, abhängig von Genus und Spezies, mehrere Wochen dauern. Die schnellere Identifizierung bedeutet Arbeitszeiteinsparung und ermöglicht ein schnelleres Ansetzen einer adäquaten Antibiotikatherapie. Die Auswirkungen einer schnelleren mikrobiologischen Diagnostik durch Änderungen einiger Arbeitsabläufe sind in einigen Studien untersucht worden. Doern et al. [27] konnten zeigen, dass eine schnellere mikrobiologische Diagnostik bei unveränderter Länge des Krankenhausaufenthaltes dessen Kosten durch Einsparungen hinsichtlich nachfolgender diagnostischer Verfahren erheblich senkt. Zudem wurde eine niedrigere Mortalitätsrate festgestellt. In einer anderen Studie [8] wurde die Mortalitätsrate durch schnellere mikrobiologische Diagnostik ebenfalls gesenkt und sowohl die Länge der Krankenhausaufenthalte als auch die damit verbundenen Kosten konnten verkürzt bzw. gesenkt werden.

Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse hat sich als diagnostisches Mittel in der klinischen Mikrobiologie bewährt und gewinnt als Alternative oder Ergänzung zu phänotypischen Nachweismethoden immer mehr an Bedeutung. Anhand der 16S-rDNA-Sequenzanalyse ist es möglich, die meisten Taxa zu identifizieren und sie hat sich als die schnellere und genauere Nachweismethode etabliert. Hinsichtlich der Identifikation sequenzgleicher

Organismen ist die Sequenzanalyse als Basisuntersuchung denkbar, auf die weitere diagnostische Untersuchungen, sowohl molekularer als auch phänotypischer Art, nachfolgen.

Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse ist mittlerweile das am weitesten verbreitete Mittel hinsichtlich der Untersuchung phylogenetischer Beziehungen unter Bakterien und hat viel zu deren Verständnis beigetragen. Bei der Identifizierung von Mikroorganismen durch die 16S-rDNA-Sequenzanalyse spielt die Sequenzdatenbank eine wesentliche Rolle. Einige Probleme der am häufigsten benutzten Datenbanken wurden in der vorliegenden Arbeit dargelegt und es konnte gezeigt werden, dass für eine genaue Identifizierung durch Sequenzanalyse eine umfassende Sammlung qualitativ hochwertiger Sequenzen unumgänglich ist, zumal die genomischen Eigenschaften und Merkmale vieler Taxa noch nicht hinreichend bekannt sind und sowohl Richtlinien als auch Grenzwerte bezüglich der Identifizierung von Mikroorganismen auf Genus- und Spezieslevel fehlen. Die RIDOM-Datenbank stellt, als eine sich im Aufbau befindende Sequenzsammlung, noch keine umfassende Datenbank dar und wird durch weitere Einträge und Aktualisierungen erweitert.

## 5 Literaturverzeichnis

1. **Adang RP, Schouten HC, Van Tiel FH, Blijham GH** (1992) Pneumonia due to *Micrococcus* spp. in a patient with acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 6:224-226
2. **Altschul SF, Madden TL, Schäfer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
3. **Altuntas F, Yildiz O, Eser B, Gündogan K, Sumerkan B, Cetin M** (2004) Catheter-related bacteremia due to *Kocuria rosea* in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *BMC Infect. Dis.* 4:62
4. **Amann R, Ludwig W, Schleifer KH** (1994) Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60:360-365
5. **Anderson MD, Kennedy CA, Walsh TP, Bowler WA** (1993) Prosthetic valve endocarditis due to *Rothia dentocariosa*. *Clin. Infect. Dis.* 17:945-946
6. **Baker JS** (1984) Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J. Clin. Microbiol.* 19:875-879
7. **Baker JS, Hackett MF, Simard DJ** (1986) Variations in bacitracin susceptibility observed in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 23:963-964
8. **Barenfanger J, Drake C, Kacich G** (1999) Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 37:1415-1418

9. **Basaglia G, Carretto E, Barbarini D, Moras L, Scalone S, Marone P, De Paoli P** (2002) Catheter-related bacteremia due to *Kocuria kristinae* in a patient with ovarian cancer. *J. Clin. Microbiol.* 40:311-313
10. **Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C** (2004) Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42:4988-4995
11. **Becker K, Schumann P, Wüllenweber J, Schulte M, Weil HP, Stackebrandt E, Peters G, Von Eiff C** (2002) *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel gram-positive *Actinobacterium* isolated from a human clinical source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1609-1614
12. **Behrendt U, Ulrich A, Schumann P** (2001) Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1267-1276
13. **Ben-Ami R, Navon-Venezia S, Schwartz D, Schlezinger Y, Mekuzas Y, Carmeli Y** (2005) Erroneous reporting of coagulase-negative staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. *J. Clin. Microbiol.* 43:1448-1450
14. **Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL** (2006) GenBank. *Nucleic Acids Res.* 30:17-20
15. **Bergan T, Kocur M** (1982) *Stomatococcus mucilaginosus* gen.nov., sp.nov., ep. rev., a member of the family *Micrococcaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:374-377

16. **Bernasconi E, Valsangiacomo C, Peduzzi R, Carota A, Moccetti T, Funke G** (2004) *Arthrobacter woluwensis* subacute infective endocarditis: case report and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 38:e27-e31
17. **Brazzola P, Zbinden R, Rudin C, Schaad UB, Heininger U** (2000) *Brevibacterium casei* sepsis in an 18-year-old female with AIDS. J. Clin. Microbiol. 38:3513-3514
18. **Cartwright MJ, King MH, Weinberg RS, Guerry RK** (1990) *Micrococcus* endophthalmitis (letter). Arch. Ophthalmol. 108:1523-1524
19. **Clayton RA, Sutton G, Hinkle PS Jr, 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
20. **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
21. **Colebunders R, Ursi JP, Pattyn S, Snoeck J** (1985) Prosthetic valve endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus* species successfully treated with rifampicin combined with other antibiotics. J. Infect. 11:35-39
22. **Collins MD, Farrow JAE, Goodfellow M, Minnikin DE** (1983) *Brevibacterium casei* sp. nov. and *Brevibacterium epidermidis* sp. nov.. Syst. Appl. Microbiol. 4:388-395
23. **Collins MD, Hutson RA, Baverud V, Falsen E** (2000) Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov.

and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosus* comb. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1247-1251

24. **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
25. **Daneshvar MI, Hollis DG, Weyant RS, Jordan JG, MacGregor JP, Morey RE, Whitney AM, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Helsel LO, Raney PM, Patel JB, Levett PN, Brown JM** (2004) Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synon. *Corynebacterium aurimucosum*. J. Clin. Microbiol. 42:4189-4198
26. **Dass KN, Smith MA, Gill VJ, Goldstein SA, Lucey DR** (2002) *Brevibacterium* endocarditis: a first report. Clin. Infect. Dis. 35:e20-e21
27. **Doern G, Vautour R, Gaudet M, Levy B** (1994) Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J. Clin. Microbiol. 32:1757-1762
28. **Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, 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. **Durst UN, Bruder E, Egloff L, Wust J, Schneider J, Hirzel HO** (1991) *Micrococcus luteus*: a rare pathogen of valve prosthesis endocarditis. Z. Kardiol. 80:294-298

30. **Esteban J, Bueno J, Perez-Santonja JJ, Soriano F** (1996) Endophthalmitis involving an *Arthrobacter*-like organism following intraocular lens implantation. Clin. Infect. Dis. 23:1180-1181
31. **Fontana C, Favaro M, Pelliccion M, Pistoia ES, Favalli C** (2005) Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. J. Clin. Microbiol. 43:615-619
32. **Fosse T, Peloux Y, Granthil C, Toga B, Bertrando J, Sethian M** (1985) Meningitis due to *Micrococcus luteus*. Infection 13:280-281
33. **Fox GE, Wisotzkey D, 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
34. **Fredericks DN, Relman DA** (1996) Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin. Microbiol. Rev. 9:18-33
35. **Funke G, Hutson RA, Bernard KA, Pfyffer GE, Wauters G, Collins MD** (1996) Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. nov.. J. Clin. Microbiol. 34:2356-2363
36. **Funke G, Lawson PA, Nolte FS, Weiss N, Collins MD** (1998) *Aureobacterium resistens* sp. nov., exhibiting vancomycin resistance and teicoplanin susceptibility. FEMS Microbiol. Lett. 158:89-93
37. **Funke G, Pagano-Niederer M, Sjöden B, Falsen E** (1998) Characteristics of *Arthrobacter cumminsii*, the most frequently encountered *Arthrobacter* species in human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 36:1539-1543

38. **Funke G, Von Graevenitz A, Clarridge III. JE, Bernard KA** (1997) Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:125-159
39. **Gomez-Garces JL, Oteo J, Garcia G, Aracil B, Alos JI, Funke G** (2001) Bacteremia by *Dermabacter hominis*, a rare pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 39:2356-2357
40. **Gruner E, Steigerwalt AG, Hollis DG, Weyant RS, Weaver RE, Moss CW, Daneshvar M, Brenner DJ** (1994) Recognition of *Dermabacter hominis*, formerly CDC fermentative coryneform group 3 and group 5, as a potential human pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 32:1918-1922
41. **Guermazi A, Miaux Y, Laval-Jeantet M** (1995) Imaging of choroid plexus infection by *Stomatococcus mucilaginosus* in neutropenic patients. *Am. J. Neuroradiol.* 16:1331-1334
42. **Hall L, Doerr KA, Wohlfiel 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
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, Singer C, Rothgänger J, Tonjum T, de Hoog GS, Shah H, Albert J, Frosch M** (2001) Diagnostics of *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae* by

ribosomal DNA sequencing: Ribosomal differentiation of medical microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39:936-942

46. **Heym B, Gehanno P, Friocourt V, Bougnoux ME, Le Moal M, Husson C, Leibowitch J, Nicolas-Chanoine MH** (2005) Molecular detection of *Cellulosimicrobium cellulans* as the etiological agent of a chronic tongue ulcer in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* 43:4269-4271
47. **Hsu CL, Shih LY, Leu HS, Wu CL, Funke G** (1998) Septicemia due to *Arthrobacter* species in a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Infect. Dis.* 27:1334-1335
48. **Hugenholtz P, Huber T** (2003) Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:289-293
49. **Jones D, Collins MD** (1988) Taxonomic studies on some human cutaneous coryneform bacteria: Description of *Dermabacter hominis* gen.nov., sp.nov.. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:51-56
50. **Kloos WE, Musselwhite MS** (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 30:381-395
51. **Koch C, Schumann P, Stackebrandt E** (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:837-839
52. **Kocur M** (1986) Genus *Micrococcus* Cohn 1872, 151AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp.1004-1008. Edited by Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Williams and Wilkins, Baltimore.

53. **Kong R, Mebazaa A, Heitz B, De Briel DA, Kiredjian M, Raskine L, Payen D** (1998) Case of triple endocarditis caused by *Rothia dentocariosa* and results of a survey in France. *J. Clin. Microbiol.* 36:309-310
54. **Le Brun C, Bouet J, Gautier P, Avril JL, Gaillot O** (2005) *Kytococcus schroeteri* endocarditis. *Emerg. Infect. Dis.* 11:179-180
55. **LeProwse CR, McNeil MM, McCarty JM** (1989) Catheter-related bacteremia caused by *Oerskovia turbata*. *J. Clin. Microbiol.* 27:571-572
56. **Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R** (2002) Evaluation of the Vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* 40:1681-1686
57. **Lina B, Carlotti V, Lesaint V, Devaux Y, Freney J, Fleurette J** (1994) Persistent bacteremia due to *Brevibacterium* sp. in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* 18:487-488
58. **Liu H, Xu Y, Ma Y, Zhou P** (2000) Characterization of *Micrococcus antarticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:715-719
59. **MacKinnon MM, Amezaga MR, MacKinnon JR** (2001) A case of *Rothia dentocariosa* endophthalmitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20:756-757
60. **McCaughey C, Damani NN** (1991) Central venous line infection caused by *Brevibacterium epidermidis*. *J. Infect.* 23:211-212
61. **McNeil MM, Brown JM, Carvalho ME, Hollis DG, Morey RE, Reller LB** (2004) Molecular epidemiologic evaluation of endocarditis due to *Oerskovia*

*turbata* and CDC group A-3 associated with contaminated homograft valves. J. Clin. Microbiol. 42:2495-2500

62. **Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D** (2006) Sequencing and staphylococci identification. Emerg. Infect. Dis. 12:333-336
63. **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
64. **Mohammedi I, Berchiche C, Becker K, Belkhouja K, Robert D, Von Eiff C, Etienne J** (2005) Fatal *Kytococcus schroeteri* bacteremic pneumonia. J. Infect. 51:E11-E13
65. **Neumeister B, Mandel T, Gruner E, Pfyffer GE** (1993) *Brevibacterium* species as a cause of osteomyelitis in a neonate. Infection 21:177-178
66. **Nolte FS, Arnold KE, Sweat H, Winton EF, Funke G** (1996) Vancomycin-resistant *Aureobacterium* species cellulitis and bacteremia in a patient with acute myelogenous leukemia. J. Clin. Microbiol. 34:1992-1994
67. **Old DC, McNeill GP** (1979) Endocarditis due to *Micrococcus sedentarius* incertae sedis. J. Clin. Pathol. 32:951-952
68. **Palys T, Nakamura LK, Cohan FM** (1997) Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1145-1156

69. **Pascual C, Collins MD, Funke G, Pitcher DG** (1996) Phenotypic and genotypic characterisation of two *Brevibacterium* strains from the human ear: description of *Brevibacterium otitidis* sp.nov.. Med. Microbiol. Lett. 5:113-123
70. **Patel JB, Leonard DGB, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I** (2000) Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S bacterial identification system. J. Clin. Microbiol. 38:246-251
71. **Peces R, Gago E, Tejada F, Laures AS, Alvarez-Grande J** (1997) Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter. Nephrol. Dial. Transplant 12:2428-2429
72. **Pinsky RL, Piscitelli V, Patterson JE** (1989) Endocarditis caused by relatively penicillin-resistant *Stomatococcus mucilaginosus*. J. Clin. Microbiol. 27:215-216
73. **Poirier LP, Gaudreau CL** (1989) *Stomatococcus mucilaginosus* catheter-associated infection with septicemia. J. Clin. Microbiol. 27:1125-1126
74. **Prauser H, Lechevalier MP, Lechevalier H** (1970) Description of *Oerskovia* gen. n. to Harbor Orskov's motile *Nocardia*. Appl. Microbiol. 19:534
75. **Radtke A, Bergh K, Oien CM, Bevanger LS** (2001) Peritoneal dialysis-associated peritonitis caused by *Dermabacter hominis*. J. Clin. Microbiol. 39:3420-3421
76. **Rainey FA, Nobre MF, Schumann P, Stackebrandt E, Da Costa MS** (1997) Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:510-514
77. **Ramzan NN, Loftus E Jr, Burgart LJ, Rooney M, Batts KP, Wiesner RH, Fredericks DN, Relman DA, Persing DH** (1997) Diagnosis and monitoring of Whipple disease by polymerase chain reaction. Ann. Intern. Med. 126:520-527

78. **Reinert RR, Schnitzler N, Haase G, Lütticken R, Fabry U, Schaal KP, Funke G** (1995) Recurrent bacteremia due to *Brevibacterium casei* in an immunocompromised patient. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14:1082-1085
79. **Rosypal S, Rosypalova A, Horejs J** (1966) The classification of micrococci and staphylococci based on their DNA base composition and adansonian analysis. J. Gen. Microbiol. 44:281-292
80. **Sammeth M, Rothgänger J, Esser W, Albert J, Stoye J, Harmsen D** (2003) QAlign: quality-based multiple alignments with dynamic phylogenetic analysis. Bioinformatics 19:1592-1593
81. **Schumann P, Spröer C, Burghardt J, Kovacs G, Stackebrandt E** (1999) Reclassification of the species *Kocuria erythromyxa* (Brooks and Murray 1981) as *Kocuria rosea* (Flügge 1886). Int. J. Syst. Bacteriol. 49:393-396
82. **Schumann P, Weiss N, Stackebrandt E** (2001) Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Keddie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1007-1010
83. **Shin JH, Shim JD, Kim HR, Sinn JB, Kook JK, Lee JN** (2004) *Rothia dentocariosa* septicemia without endocarditis in a neonatal infant with meconium aspiration syndrome. J. Clin. Microbiol. 42:4891-4892
84. **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
85. **Spanu T, Sanguinetti M, Ciccaglione D, D'Inzeo T, Romano L, Leone F, Fadda G** (2003) Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical

isolates of staphylococci from bloodstream infections. J. Clin. Microbiol. 41:4259-4263

86. **Stackebrandt E, Breyman S, Steiner U, Prauser H, Weiss N, Schumann P** (2002) Re-evaluation of the status of the genus *Oerskovia*, reclassification of *Promicromonospora enterophila* (Jager et al. 1983) as *Oerskovia enterophila* comb. nov. and description of *Oerskovia jenensis* sp. nov. and *Oerskovia paurometabola* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1105-1111
87. **Stackebrandt E, Goebel BM** (1994) 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
88. **Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, Schumann P** (1995) Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend.. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:682-692
89. **Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL** (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:479-491
90. **Stackebrandt E, Schumann P** (2000) Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacoccaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder *Micrococcineae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1279-1285
91. **Stackebrandt E, Seiler H, Schleifer KH** (1982) Union of the genera *Cellulomonas* Bergey et al. and *Oerskovia* Prauser et al. in a redefined genus *Cellulomonas*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3:401-409

92. **Takeuchi M, Hatano K** (1998) Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:739-747
93. **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
94. **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
95. **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
96. **Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A** (2001) Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 39:3637-3648
97. **Von Eiff C, Herrmann M, Peters G** (1995) Antimicrobial susceptibilities of *Stomatococcus mucilaginosus* and of *Micrococcus* spp.. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 39:268-270
98. **Von Eiff C, Peters G** (1998) In vitro activity of ciprofloxacin, ofloxacin, and levofloxacin against *Micrococcus* species and *Stomatococcus mucilaginosus* isolated from healthy subjects and neutropenic patients. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 17:890-892

99. **Wauters G, Van Bosterhaut B, Avesani V, Cuvelier R, Charlier J, Janssens M, Delmee M** (2000) Peritonitis due to *Brevibacterium otitidis* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:4292-4293
100. **Wharton M, Rice JR, McCallum R, Gallis HA** (1986) Septic arthritis due to *Micrococcus luteus*. *J. Rheumatol.* 13:659-660
101. **Wieser M, Denner EBM, Kämpfer P, Schumann P, Tindall B, Steiner U, Vybiral D, Lubitz W, Maszenan AM, Patel BKC, Seviour RJ, Radax C, Busse HJ** (2002) Emended description of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:629-637
102. **Woese CR** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271
103. **Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, Yip KT, Fung AMY, Leung KW, Tam DMW, Que TL, Yuen KY** (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

## 6 Zusammenfassung

Infektionen durch opportunistische Erreger spielen in der Medizin eine immer größere Rolle. Viele dieser opportunistischen Pathogene, zu denen auch die in der vorliegenden Arbeit behandelten Spezies der reorganisierten bzw. neu etablierten Gattungen der *Micrococcaceae* und *Dermaococcaceae* (Unterordnung *Micrococcineae*), herkömmlich als „Mikrokokken“ (triv.) bezeichnet, gehören, sind ubiquitär verbreitet und besiedeln auch die Haut und Schleimhaut des Menschen, weshalb ihr Nachweis in klinischem Untersuchungsmaterial sowohl als Kontamination bzw. Kolonisation als auch als klinisch signifikant bewertet werden kann. Für die Abschätzung des pathogenen Potentials und die gegebenenfalls nachfolgende Therapie ist deshalb eine exakte Identifizierung notwendig.

Molekulare Techniken sind mittlerweile eine wichtige Alternative zu traditionellen phänotypischen Nachweismethoden. Zu diesen molekularen Verfahren gehört die Sequenzierung von amplifizierten Genomabschnitten. Hierbei wird die Basenfolge eines definierten Genomabschnittes des zu identifizierenden Mikroorganismus ermittelt und anschließend mit Referenzsequenzen bekannter Organismen verglichen. Die 16S-rRNA-Gensequenz ist aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in allen bakteriellen Zellen und ihrer strukturellen Merkmale einer der am häufigsten für die Identifizierung und Differenzierung verwendeten Genomabschnitte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand einer klinischen „Mikrokokken“-Stammsammlung die molekulare Identifizierung basierend auf variablen Abschnitten des 16S-rRNA-Gens mit zwei kommerziellen, auf phänotypischen Nachweismethoden beruhenden Identifizierungssystemen verglichen, dem API STAPH- und dem VITEK 2-System. Dabei dienten die neuermittelten und qualitätskontrollierten 16S-rRNA-Gensequenzen von 21 ausgewählten Referenz- und Typstämmen als Basis für den Aufbau einer Referenzdatenbank, mit deren Hilfe 74 klinische „Mikrokokken“-Isolate differenziert wurden.

Die 16-rDNA-Sequenzanalyse identifizierte 38 der 74 klinischen Isolate (51,4%) innerhalb einer Sequenzübereinstimmung von mindestens 99%. Ausgehend von den systemeigenen Auswertungs- und Identifizierungsschemata, konnte das API STAPH-System 31 klinische Isolate (41,9%), das VITEK 2-System 60 klinische Isolate (81,1%)

eindeutig identifizieren. Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse und API-STAPH kamen zu 31 (41,9%), Sequenzanalyse und VITEK 2 zu 28 übereinstimmenden Identifizierungen (37,8%). API STAPH und VITEK 2 identifizierten 33 klinische Isolate (44,6%) übereinstimmend. Insgesamt gab es für 22 der 74 klinischen Isolate (29,7%) ein übereinstimmendes Ergebnis aller drei Nachweismethoden. Insbesondere die Ergebnisse der 16S-rDNA-Sequenzanalyse ergaben Hinweise darauf, dass sich unter den klinischen Isolaten weitere, bisher nicht beschriebene Arten verbergen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich eine qualitätskontrollierte 16S-rDNA-Datenbank zur Identifizierung von Vertretern der Unterordnung *Micrococccineae* etabliert werden. Im Gegensatz zu den in der Arbeit eingesetzten phänotypischen Nachweismethoden hat sich die 16S-rDNA Sequenzanalyse als schnellere und exakte Methode zur Identifizierung von „Mikrokokken“ bewährt.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität angefertigt, wobei Teile der praktischen Tätigkeiten im Institut für Hygiene der Westfälischen Wilhelms-Universität stattfanden. Ich möchte daher den Institutsdirektoren Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters und Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch für die Möglichkeit danken, das Thema der vorliegenden Arbeit an den jeweiligen Instituten bearbeitet haben zu können.

H<sup>o</sup>Doz. PD Dr. med. K. Becker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die stets sehr gute Betreuung während der gesamten Arbeit.

Mein Dank gebührt ebenfalls Prof. Dr. med. C. von Eiff, der mich immer kompetent und zuverlässig betreut hat und mein Vorhaben von Anfang an sehr unterstützt hat.

Ferner gilt mein Dank Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen, dessen vielfache Unterstützung mich durch alle Arbeitsschritte begleitet hat. Dr. A. Mellmann möchte ich herzlich für seine vielen, hilfreichen Anregungen und die freundliche, geduldige Mithilfe bei allen anfallenden Fragen danken.

Mein ganzer Dank gilt allen Mitarbeitern der jeweiligen Institute und Arbeitsgruppen, die durch ihre praktische Mithilfe, Unterstützung und Anregungen diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Christian Meier, der diese Arbeit über all die Jahre hinweg begleitet hat, möchte ich für seine Freundschaft und Herzlichkeit danken, auf die ich mich immer verlassen konnte und die mir über so manche Fragen und Zweifel hinweggeholfen haben.

In tiefster Dankbarkeit ist diese Arbeit meinen Eltern gewidmet.



