

W. Witte · B. Strommenger · I. Klare · G. Werner
Bereich Wernigerode, Robert Koch-Institut, Wernigerode

Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen

Teil I: Diagnostik und Typisierung

Zusammenfassung

Für fast jede der therapeutisch gegen bakterielle Infektionserreger eingesetzten Antibiotikagruppen gibt es mehrere Einzelpräparate, die in der klinisch-bakteriologischen Routinediagnostik in der Empfindlichkeitsprüfung nicht erfasst werden können. Deshalb werden bei Kenntnis der Resistenzmechanismen und der daraus abzuleitenden Kreuzresistenzen bestimmte Testpräparate geprüft und das diesbezügliche Ergebnis im Sinne der Kreuzresistenz interpretiert. Diese Testpräparate entsprechen den Substanzen, die auch in den Ausführungen zu § 23 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) aufgeführt sind. Aufgrund der suboptimalen In-vitro-Expression verschiedener Resistenzmechanismen ist es erforderlich, neben den Routinemethoden (Agardiffusionstest, Mikrobouillon-MHK) ergänzende Tests einzusetzen, vorzugsweise durch Nachweis der Resistenzgene. Das Auftreten und besonders die Verbreitung antibiotikaresistenter Erreger von Krankenhausinfektionen können durch Erregertypisierung verfolgt werden. Bei der Auswahl der Typisierverfahren ist es erforderlich, Arbeitsaufwand, Diskriminierungsfähigkeit und Reproduzierbarkeit einzuschätzen. Zukünftig wird die Anwendung der Mikroarray-Technologie eine schnelle komplexe Diagnostik ermöglichen, die neben den Spezies-Eigenschaften und den Resistenzdeterminanten auch Virulenz-assoziierte Gene einschließt.

Natürliche und erworbene Resistenz gegen Antibiotika

Die bisher therapeutisch eingesetzten antibakteriellen Chemotherapeutika hemmen Einzelschritte der in Abb. 1 gezeigten komplexen molekularen Vorgänge in der Bakterienzelle. Sind diese Zielstrukturen den Antibiotika von vornherein aufgrund der natürlichen Eigenschaften bestimmter Bakterienspezies nicht zugänglich, dann besteht eine natürliche Resistenz, d. h., diese Bakterien liegen nicht im Wirkungsspektrum eines Antibiotikums. Demgegenüber steht die erworbene Resistenz, die erst im Zuge des Selektionsdruckes durch den Antibiotikaeinsatz auftritt. Bakterien haben eine Reihe verschiedener molekularer Resistenzmechanismen entwickelt, die in Übersicht 1 zusammengefasst sind (Übersicht bei [1]).

Auswahl von Antibiotika für die Resistenzbestimmung

Die Antibiotika-Resistenzbestimmung hat 2 wesentliche Ziele: Sie dient einerseits der Absicherung der antibakteriellen Chemotherapie, soll aber auch rechtzeitig über das Auftreten und die Verbreitung von Resistenzen informieren. Gegenwärtig sind in Krankenhäusern meist 30–40 verschiedene Antibiotika gelistet. Aus Kapazitäts- und Kostengründen ist es aber unmöglich, für jede dieser Substanzen eine Resistenzbestimmung durchzuführen. Die Bestimmung

Übersicht 1

Molekulare Strategien der Resistenzentwicklung von Bakterien

Veränderung des Wirkortes des Chemotherapeutikums durch:

- Mutation (z. B. DNA-Gyrase und Chinolonresistenz),
- Modifikation (z. B. Methylierung der 23S rRNA und Makrolidresistenz).

Verhinderung der Aufnahme des Chemotherapeutikums in die Bakterienzelle (z. B. durch Nicht-Expression eines Porins und daraus resultierende Carbapenem-Resistenz).

Aktiver Transport des Chemotherapeutikums aus der Bakterienzelle durch:

- spezifische Effluxmechanismen (z. B. für Tetrazykline),
- ABC-Transporter (z. B. für Streptogramin-A-Substanzen),
- erhöhte Expression unspezifischer Transporter (z. B. nur bei *Enterobacteriaceae*, nur bei *Pseudomonas* spp.).

Enzymatische Inaktivierung des Chemotherapeutikums (z. B. durch β -Laktamase).

Realisierung eines alternativen, gegen Chemotherapeutikaeinwirkung unempfindlichen Stoffwechselweges (bei Sulfonamiden und Trimethoprim als Hemmstoffe der Tetrahydrofolsäuresynthese).

© Springer-Verlag 2004

Prof. Dr. W. Witte
Bereich Wernigerode, Robert Koch-Institut,
Burgstraße 37, 38855 Wernigerode
E-Mail: wittew@rki.de

W. Witte · B. Strommenger · I. Klare
G. Werner

Antibiotic-resistant nosocomial pathogens. Part I: diagnostic and typing methods

Abstract

For use in human chemotherapy, there are several different substances for nearly each substance group available which cannot all be checked in routine susceptibility testing. If the bacterial resistance mechanisms and cross-resistance conferred by them are known, particular test substances can be selected and the results are interpreted on the basis of cross-resistance. Test substances correspond to those mentioned in guidelines for § 23 IfSG (German law on protection against infection). Due to suboptimal *in vitro* expression of different resistance mechanisms, it is necessary to perform additional tests besides routine agar-diffusion or microbroth MIC assays. These are preferentially tests for molecular demonstration of resistance genes. Emergence and spread of antibiotic-resistant nosocomial pathogens can be traced by typing. When selecting a typing method, it is important to assess workload, discriminatory power, and reproducibility. In future the availability of microarray technology will enable routine laboratories to demonstrate particular virulence-associated traits.

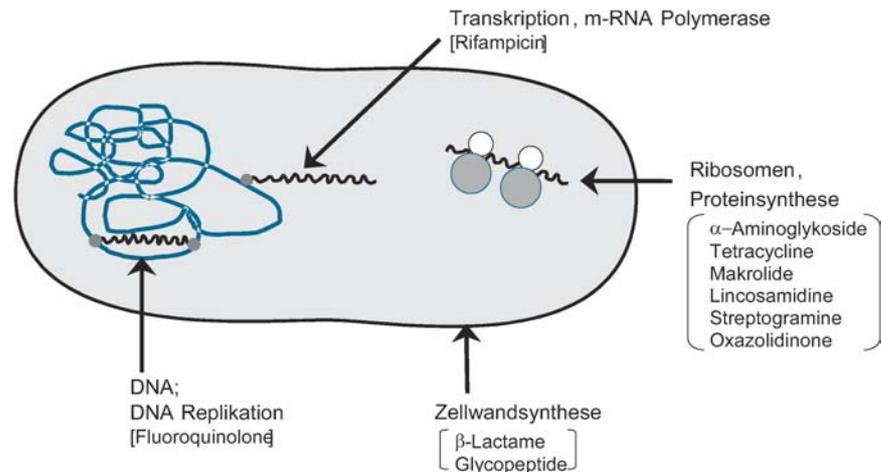


Abb. 1 ▲ Zielstrukturen für Antibiotika

dient der Ermittlung der erworbenen Resistenz, natürliche Resistenzen werden aus der Speziesbestimmung abgeleitet. Die Mehrheit der heute verfügbaren Antibiotika lässt sich einer begrenzten Zahl von Substanzklassen zuordnen, die (mit Ausnahme der Oxazolidinone) zwischen Mitte der 30er-Jahre bis zur Mitte der 60er-Jahre des vorigen Jahrhunderts entdeckt bzw. entwickelt wurden. Ziel der Weiterentwicklung der Präparate innerhalb einer Substanzklasse war die Verbesserung der Pharmakokinetik und die Verringerung der Toxizität, aber auch das Überwinden von Resistenzmechanismen der Bakterienzelle. Letzteres wird an der Entwicklung der β -Laktamantibiotika besonders deutlich (Abb. 2).

Ein bestimmter Resistenzmechanismus führt häufig zu einer Unempfindlichkeit des Bakteriums gegen alle Präparate einer Substanzklasse. Zum Beispiel bedingen durch Staphylokokken gebildete β -Laktamasen eine Resistenz gegen alle Substanzen, die gegen diese β -Laktamase empfindlich sind. Es liegt dann eine Kreuzresistenz vor. In diesen Fällen ist es ausreichend und sinnvoll, eine bestimmte Substanz als Testpräparat zu prüfen und das Ergebnis aufgrund der bekannten Kreuzresistenzen auf andere Präparate der gleichen oder bezüglich ihrer Wirkungsweise (nicht nur unbedingt bezüglich der chemischen Struktur) verwandter Substanzen zu übertragen.

Bei bestimmten Erregerspezies können allerdings im Hinblick auf die Präparate einer Substanzgruppe verschiedene Resistenzmechanismen mit einem unterschiedlichen Substratspek-

trum verbreitet sein (z. B. Aminoglykosidresistenz bei *Pseudomonas* spp.). Bei Resistenzbestimmungen mittels automatisierter Expertensysteme wird diese Tatsache bereits berücksichtigt und mit dem Befundausdruck übermittelt. Allerdings darf „Expertensystemen“ nicht blind vertraut werden. Eine Plausibilitätskontrolle sollte immer erfolgen, da z. B. neueste Erkenntnisse noch nicht in die Software eingespeist sein können oder die Komplexität der Resistenzmechanismen noch nicht vollständig erfasst wurde.

In der klinisch-bakteriologischen Routine ist es zweckmäßig, bezüglich der Testreihen von Präparaten für die Resistenzbestimmung zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien zu unterscheiden, bei letzteren ggf. auch noch zwischen *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden. Bei grampositiven Bakterien – insbesondere bei den Staphylokokken – sind für die verschiedenen Substanzgruppen vergleichsweise wenig Resistenzgene und dementsprechend auch Resistenzmechanismen verbreitet. Die Festlegung von Testsubstanzen und die Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Kreuzresistenzen sind daher unproblematisch (Tabelle 1 und 2, Übersicht bei [2]).

Bei gramnegativen Bakterien kann einer definierten Antibiotikaresistenz jedoch eine erheblich größere Vielfalt an Resistenzgenen und damit auch Resistenzmechanismen zugrunde liegen. Dennoch ist es in vielen Fällen möglich, aufgrund des Substratspektrums und der Kreuzresistenzen bestimmte Testpräparate auszuwählen und das Ergeb-

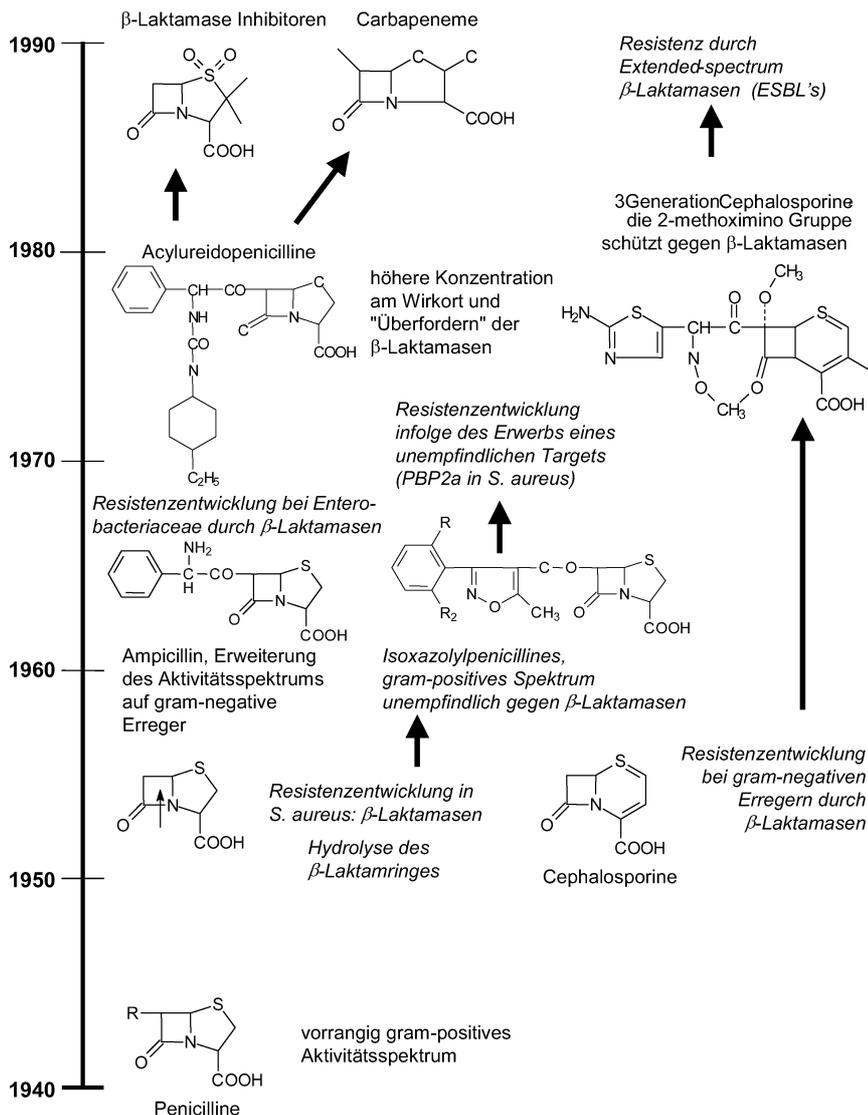


Abb. 2 **▲ Weiterentwicklung von β -Laktamantibiotika im Zuge der Resistenzentwicklung bakterieller Infektionserreger**

nis der Resistenzbestimmung entsprechend zu interpretieren (Tabelle 3 für *Enterobacteriaceae*, Tabelle 4 für *Pseudomonas* spp., Übersicht zur Aminoglykosidresistenz bei [3, 4]).

Von aktueller Bedeutung für die Resistenzbestimmung bei *Enterobacteriaceae* ist das richtige Erkennen von Resistenzen gegen Cephalosporine der 3. und 4. Generation aufgrund von β -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum (ESBL). Diese können aus unterschiedlichen plasmidkodierten β -Laktamasen durch ein oder mehrere Aminosäureaustauschmutationen hervorgegangen sein (Übersicht bei [5]). Diese β -Laktamasen gehören zu den Klassen A und D. In Abhängigkeit von ihrer evolutionären Herkunft zeigen sie ein unterschiedli-

ches Substratspektrum (Tabelle 5). Allerdings werden durch den Test für Cefotaxim und Ceftazidim fast alle ESBL gut erfasst. Da plasmidkodierte β -Laktamasen fast immer durch β -Laktamaseinhibitoren gehemmt werden, sollte parallel der Test mit Cefpodoxim (allein und in Kombination mit Clavulansäure) erfolgen.

Das seit Januar 2001 in Deutschland geltende Infektionsschutzgesetz (IfSG) verpflichtet Krankenhäuser dazu, für die wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen eine Resistenzstatistik zu führen. Dabei sollen aus klinischer und epidemiologischer Sicht wichtige Resistenzeigenschaften erfasst werden. Eine entsprechende Übersicht gibt Tabelle 6.

Methoden der Resistenzbestimmung im Überblick

Phänotypische Verfahren

Am weitesten verbreitet ist immer noch der Agardiffusionstest, für dessen Durchführung in Deutschland der DIN-Standard 58940 [6] gilt. Neben dieser Empfehlung wird in Deutschland auch der NCCLS-Standard [7] eingesetzt. Es ist dabei grundsätzlich zu beachten, dass diese Standards unterschiedliche Inokulumdichten und unterschiedliche Blättchenbelastungen verwenden und somit auch unterschiedliche Ablesekriterien für die Bewertungsstufen als empfindlich, intermediär und resistent festlegen. Die einzelnen Komponenten (z. B. Inokulum nach DIN, Blättchen nach NCCLS, Ablesung nach DIN) sind nicht austauschbar! Der Agardiffusionstest ist aufgrund der Komplexität des Verfahrens deutlich höher mit Fehlern belastet als die Referenzmethode, d. h. die Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen (in der Praxis mittels Mikrobouillonverdünnungstest). Die Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen mittels E-Test (einem Diffusionstest unter Verwendung von MHK-Teststreifen) führt zu Ergebnissen, die eine hohe Übereinstimmung mit dem Mikrobouillonverdünnungstest zeigen.

Die Ergebnisse phänotypischer Resistenzverfahren können generell durch äußere Einflüsse auf die Expression der Gene, die für die Resistenz kodieren, beeinträchtigt werden. Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, die Konzentration von Salzen, die verwendeten Nährmedien und die Einstellung des Inokulums beeinflussen die Expression und können daher zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zu den phänotypischen Bestätigungsverfahren für Resistenzeigenschaften, die durch den Agardiffusionstest und die Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen nicht immer verlässlich erfasst werden, zählen:

- Der Nachweis der Oxacillinresistenz bei MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*), d. h. die Verwendung des Agar-Screening-Tests nach NCCLS [7] oder eines Bouillon-Screening-Verfahrens [8] bzw. eines Latex-Agglutinationstests zum Nachweis des Penicillinbindepoteins PBP2a [9],

Tabelle 1
Auswahl der Testpräparate für die phänotypische Resistenzbestimmung bei Staphylokokken

Testsubstanz	Resistenzmechanismus und Resistenzgene	Kreuzresistenzen
Gentamicin	Aminoglycosid-modifizierendes Enzym (<i>aph2''-aac6'</i> Gen)	Potenziell auch gegen Amikacin, Netilmicin
Erythromycin	Methylierung der 23S r-RNA in Position 2058 (<i>ermA, ermB, ermC</i>)	Alle Makrolide
Linkomycin	Methylierung der 23S r-RNA in Position 2058	Bei konstitutiver Ausprägung alle Linkosamidine, Streptogramin-B-Substanzen
Quinupristin/ Dalfopristin	Methylierung der 23S r-RNA in Pos. 2058 (<i>ermB</i>) für Quinupristin O-Acetylierung für Dalfopristin (<i>vatA, vatB</i>)	Gegen andere Streptogramin-A/B-Kombinationen
Ciprofloxacin	Mutation Ser80 des <i>grlA</i> -Gens (Topoisomerase IV)	Alle Fluorchinolone Gr. II, potenziell alle Fluorchinolone
Moxifloxacin	Zusätzlich Mutation in Ser83 des <i>gyrA</i> -Gens (DNA-Gyrase)	Alle Fluorchinolone
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Trimethoprim-unempfindliche Dihydrofolatreduktase ^a	Alle Sulfonamide
Rifampicin	Punktmutation in der β -Untereinheit der m-RNA-Polymerase	Andere Rifamycine
Fusidinsäure-Natrium	Resistenzmutation, Efflux	
Vancomycin/ Teicoplanin	Dickere Zellwand mit unvollständiger Quervernetzung der Peptidoglykanstränge (trapping effect)	
Linezolid	Punktmutation(en) in der Domäne V der zentralen Schleife der 23S r-RNA	

^aSulfonamid Dihydropteroatsynthase.

Tabelle 2
Auswahl von Testpräparaten für die phänotypische Resistenzbestimmung bei Enterokokken

Testsubstanz	Resistenzmechanismus und Resistenzgene	Kreuzresistenzen
Ampicillin	<i>E. faecalis</i> : β -Laktamase <i>E. faecium</i> : verändertes Penicillinbindendes Protein PBP5	Alle β -Laktamase-empfindlichen Penicilline Mehr oder weniger alle β -Laktamantibiotika
Vancomycin	Targetmodifikation an dem N-Azetylmuraminsäure-Pentapeptid	Teilweise Teicoplanin
Teicoplanin	Targetmodifikation an dem N-Azetylmuraminsäure-Pentapeptid	Vancomycin
Gentamicin	Modifizierendes Enzym (<i>aph2''-aac6'</i>)	Amikacin, Netilmicin
Streptomycin	Modifizierendes Enzym (<i>aad6'</i>)	–
Erythromycin	Methylierung der 23S r-RNA in Pos. 2058 (<i>ermB</i>)	Streptogramin B bei konstanter Expression
Quinupristin/ Dalfopristin	<i>E. faecium</i> : Methylierung der 23S r-RNA in Pos. 2058 (<i>ermB</i>) für Quinupristin O-Acetylierung für Dalfopristin Bei <i>E. faecalis</i> natürliche Resistenz	Andere Streptogramin-Kombinationen
Linezolid	Mutation in der Domäne V der zentralen Schleife der 23S rRNA	

Tabelle 3
Auswahl von Testpräparaten für die phänotypische Resistenzbestimmung bei *Enterobacteriaceae*

Testsubstanz	Resistenzmechanismus und Resistenzgene	Kreuzresistenzen
Aminopenicilline	β -Laktamasen	Ampicillin, Amoxycillin, ggf. Acylureidopenicilline
Ampicillin/Sulbactam, Amoxycillin (Clavulansäure)	Bei Resistenz aufgrund einer Überproduktion von plasmidkodierten β -Laktamasen oder <i>ampC</i> - β -Laktamasen	Resistenz gegen Inhibitorgeschützte Aminopenicilline
Piperacillin (Mezlocillin)	Exprimierte <i>ampC</i> - β -Laktamasen, plasmiddeterminierte, durch Inhibitor hemmbare β -Laktamasen	Potenziell gegen alle Amino- und Acylureidopenicilline
Piperacillin/Tazobactam (Piperacillin/Sulbactam)	Ursprünglich durch Inhibitorhemmbare β -Laktamase (plasmidkodiert) mit Mutation zur Inhibitorresistenz; exprimierte <i>ampC</i> - β -Laktamasen	Inhibitorgeschützte Penicilline
Cefuroxim oder Cefotiam	β -Laktamasen	Andere Gruppe-II-Cephalosporine, alle Penicilline
Cefotaxim, Ceftazidim, parallel mit Clavulansäure	ESBL exprimierte <i>ampC</i> - β -Laktamasen	Potenziell alle Cephalosporine und Penicilline
Cefpodoxim, Cefpodoxim/Clavulansäure	Test auf plasmiddeterminierte ESBL, die durch Clavulansäure ESBL, hemmbar sind	Potenziell alle Cephalosporine und Penicilline
Imipenem	Fehlende Expression des OMP D	Meropenem
Trimethoprim	Resistente Dihydrofolatreduktase	
Gentamicin	Verschiedene Aminoglykosidmodifizierende Enzyme [(<i>aac</i> (3) bis X; <i>ant</i> (2'') I]	Teilweise Tobramycin, Netilmicin, Amikacin
Amikacin	Aminoglykosidacetyltransferase <i>aac</i> (6') I Aminoglykosidphosphoryltransferase <i>aph</i> (3') VI	Gentamicin, Netilmicin, Tobramycin

ESBL *Extended Spectrum β -Laktamase*.

- der Nachweis der intermediären Glykopeptidempfindlichkeit bei *S. aureus* (GISA) mittels Agar-Screening-Test nach NCCLS [7],
- der Nachweis der Glykopeptidresistenz bei Enterokokken durch Agar-Screening-Test nach NCCLS [7],
- der Nachweis der ESBL-Eigenschaft bei *Enterobacteriaceae*-Isolate mit vermindertem Hemmhof oder erhöhter MHK für Cephalosporine der 3. und 4. Generation (NCCLS [7], Tabelle 7).

Genotypische Verfahren

Im Prinzip ist jedes bekannte Resistenzgen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisbar. In der diagnostischen Praxis sind PCR-Verfahren bisher für solche Resistenzen etabliert, die phänotypisch (aufgrund der unvollständigen Expression) nicht immer sicher nachzuweisen sind oder wenn das phänotypische Ergebnis keine sichere Interpretation zulässt. Dies trifft insbesondere für die Methicillinresistenz bei *S. aureus*, die Glykopeptidresistenz bei Enterokokken und die Detektion von β -

Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) zu. Inzwischen sind für die Methicillinresistenz Testkits verfügbar, die auf der Detektion der PCR-Produkte durch reverse Hybridisierung beruhen (reverser Blot, d. h. Hybridisierung des PCR-Produkts gegen eine spezifische Capture-Probe im Makroarray [10, 11]). Zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Resistenzgene wurden Multiplex-PCR-Verfahren entwickelt (für Staphylokokken [12], für AmpC- β -Laktamasen [13]). Abbildung 3 zeigt dies für Staphylokokken. Die verschiedenen PCR-Produkte werden dabei mittels Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Zuordnung der einzelnen Banden zu einem gesuchten Resistenzgen erfolgt jedoch zunächst nur über die Größe des PCR-Produktes. Dieses Vorgehen birgt vor allem bei Multiplexsystemen die Gefahr falsch positiver Ergebnisse aufgrund des Vorliegens unspezifischer PCR-Produkte. Eine Kombination von Multiplex-PCR und reverser Blot verbessert die Spezifität der Detektion der Zielsequenz signifikant. Zu diesem Zweck werden statt der membranbasierten Hybridisierungssysteme zunehmend Mikrochips (Mikroarrays) eingesetzt. Auf der Glasoberfläche dieser Chips können spezifische Captureproben für Tausende von Zielgenen aufgebracht werden. Diese Systeme detektieren sowohl erworbene Resistenzgene [14, 15] als auch die Mutationen, die zu Resistenzen führen [für Staphylokokken z. B. Mutationen im Gen für die DNA-Topoisomerase (*grlA*), die zur Chinolonresistenz führen]. Die fraglichen DNA-Abschnitte werden zunächst mittels PCR präamplifiziert, mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und dann auf einem Microarray hybridisiert. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse solcher Hybridisierungen.

Für die besonders schnelle Detektion einzelner Resistenzgene in einer Vielzahl von klinischen Proben werden heute Real-time-PCR-Systeme eingesetzt: Durch die Verwendung sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter Reporter-moleküle und die Online-Erfassung der erzeugten Fluoreszenzsignale lassen sich hier Resistenzgene und -mutationen besonders schnell und spezifisch detektieren. Allerdings ist die Möglichkeit zur simultanen Erfassung verschiedener Gene durch das beschränkte Angebot an Reporterfarbstoffen limitiert.

Tabelle 4

Auswahl von Testpräparaten für die phänotypische Resistenzbestimmung bei *Pseudomonas aeruginosa*

Testsubstanz	Resistenzmechanismus	Kreuzresistenzen
Piperacillin	Chromosomale β -Laktamase, exprimiert	Azlocillin
Ceftazidim	Chromosomale β -Laktamase, exprimiert	Z.T. für Cefsulodin
Ciprofloxacin	Mutation in Ser84 von <i>gyrA</i> DNA-Gyrase	Andere Fluorchinolone der Gruppe II
Imipenem	Fehlendes 49 kD OMP+chromosomale β -Laktamase exprimiert; Metallo- β -Laktamase, plasmidkodiert	Meropenem
Gentamicin	Aminoglykosidacetyltransferase <i>aac(3) I</i> Aminoglykosidacetyltransferase <i>aac(3) III</i> Aminoglykosidacetyltransferase <i>aac(6') II</i>	Sisomycin Tobramycin Tobramycin, Netilmicin
Amikacin	Aminoglykosidnukleotidyltransferase <i>ant(4') II</i>	Tobramycin

Tabelle 5

Hydrolyse von ausgewählten Substanzen durch β -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum (Extended Spectrum β -Laktamasen, ESBL, Übersicht bei [5])

Enzyme	Aminosäure-substitution(en)	Relative Hydrolyserate			
		Benzylpenicillin	Cephaloridin	Cefotaxim	Ceftazidim
TEM-1		100	140	0,07	0,01
TEM-2	Q39K	100	120	0,08	<0,01
TEM-3	Q39 K, E104 K, G238S	100	120	170	8,3
TEM-5	R164S, A237T, E240K	100	300	29	100
TEM-7	Q39 K, R164S	100	120	1,9	1,7
TEM-10	R164S, E240K	100	77	1,6	68
TEM-12	R164S	100	57	2,4	3,8
TEM-20	G328S	100	150	250	<1
TEM-26	E104 K, R164S	100	120	7,5	170
SHV-1		100	120	7,5	170
SHV-2	G238S	100	48	0,18	0,02
SHV-4	R205L, G238S, E240K	100	5,6	1,1	0,65
SHV-7	I8F, R43S, G238S, E240K	100	91	30	13

Für *S. aureus* wurden z. B. Systeme zur Speziesidentifikation und zum Nachweis des *mecA*-Gens entwickelt [16, 17].

Molekulare Typisierung von Erregern nosokomialer Infektionen

Die Typisierung im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen hat das Ziel, den Epidemiestamm (Klon) durch bestimmte Merkmale eindeutig von epidemiologisch unbedeutenden Stämmen zu unterscheiden. Ideale Typisiermerkmale sollten deshalb innerhalb der Isolate des epidemischen Stammes stabil und

innerhalb der gesamten Speziespopulation ausreichend polymorph (divers) sein. Diversität resultiert aus zufälligen, nicht letalen genetischen Ereignissen, die durch das Typisiersystem erkannt werden. Hierzu zählen z. B. neutrale Mutationen, die mittels multilocus-sequence-typing erfasst werden, oder Deletionen, Insertionen und Inversionen, die den Abstand zwischen Restriktionsendonuklease-Schnittstellen und damit die entsprechenden Spaltungsmuster beeinflussen. Die genetische Diversität zwischen Stämmen mit klinischer und epidemiologischer Bedeutung im Hinblick auf Pathogenität oder Antibiotika-

resistenz als Selektionsfaktoren kann dann eingeschränkt sein, wenn eine bestimmte klonale Gruppe mit optimaler Adaptation an einen bestimmten Wirtsorganismus oder an ein bestimmtes Ökosystem weit verbreitet auftritt. Hier hat aber die Entwicklung sensitiver molekularer Techniken während der vergangenen 10 Jahre erheblich dazu beigetragen, Subpopulationen von evolutionär verwandten Erregergruppen (klonale Gruppen) zu unterscheiden.

An die molekularen Methoden der Typisierung (Typisiersysteme s. [14, 15]) werden folgende Anforderungen gestellt:

- Die für die Typisierung verwendeten Merkmale sollten bei fast allen Isolaten der jeweiligen Erregerspezies nachweisbar sein, um eine hohe Typisierbarkeit (95%) zu gewährleisten,
- die Ergebnisse der Typisierung müssen bei wiederholten, unabhängigen Versuchsansätzen im gleichen Laboratorium und zwischen verschiedenen Laboratorien seriell reproduzierbar sein,
- die Merkmale sollten im Verlauf eines Ausbruchs ausreichend stabil sein,
- ein Typisierverfahren muss innerhalb der Speziespopulation zur Unterscheidung einer ausreichenden „Typenzahl“ führen, dabei sollte der Anteil des häufigsten „Typs“ 5% der Isolate einer Speziespopulation nicht übersteigen.

Molekulare Typisierung (Genotypisierung) bedeutet die Unterscheidung von Isolaten der gleichen Erregerspezies aufgrund von Unterschieden auf der Nukleinsäureebene. Sie wird sich notwendigerweise auf genomische Regionen mit dem erwünschten Maß an Variabilität konzentrieren oder mit geeigneten Methoden genomische Strukturumbauten (Deletionen, Additionen, Inversionen) erfassen. Dabei sind verschiedene Ebenen der Unterscheidung erforderlich: Die Ebene mit der höchsten Empfindlichkeit muss ein Typisierungsmuster ergeben, das einen einzelnen Stamm und seine klonale Nachkommenschaft (z. B. im Falle eines Ausbruchs von Infektionen) von nicht verwandten Stämmen unterscheidet. Die zweite Ebene sollte eine Gruppe jeweils evolutionär ver-

Tabelle 6

Liste der zu erfassenden Erreger mit Antibiotikaresistenzen gemäß Infektionsschutzgesetz § 23 Abs. 1 S. 1

Erregerspezies	Zu erfassen ist die Resistenz (auch Einzelresistenzen) gegen folgende Substanzen, sofern im Rahmen der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik getestet
1 <i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacillin, Vancomycin, Teicoplanin, Gentamicin, Chinolon Gr. IV (z. B. Moxifloxacin), Quinupristin/Dalfopristin, Linezolid
2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin (Oxacillin 1 µg), Vancomycin, Cefotaxim, Erythromycin, Chinolon Gr. IV (z. B. Moxifloxacin)
3 <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin, Teicoplanin , Gentamicin und Streptomycin [beide „high level“: Gentamicin >500 mg/l; Streptomycin >1.000 mg/l (Mikrodil.) bzw. 2.000 mg/l (Agardilution)], Linezolid <i>E. faecium</i> : zusätzlich Quinupristin/Dalfopristin
4 <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp.	Imipenem/Meropenem, Chinolon Gr. II (z. B. Ciprofloxacin), Amikacin, Ceftazidim, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxim oder analoge Testsubstanz ^a , Cefoxitin ^b
5 <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter</i> spp. <i>Serratia marcescens</i>	Imipenem/Meropenem, Chinolon Gr. II (z. B. Ciprofloxacin), Amikacin

^aZur Bestätigung von ESBL: Cefpodoxim+/-Clavulansäure, ^bzur Bestätigung von Klasse C-β-Laktamasen.

Tabelle 7

Nachweis des ESBL-Charakters bei Enterobacteriaceae (ausführliche Übersicht bei [5])

Kriterien für ESBL	Interpretation
1. Plasmidkodierte β-Laktamasen MHK für Cefotaxim 1 mg/l Cetazidim 1 mg/l Cefpodoxim 4 mg/l Absenkung der Cefpodoxim-MHK durch Clavulansäure um 3 Stufen (bzw. Hemmhofvergrößerung für Cepodoxim um 5 mm)	Resistenz gegen alle Penicilline und Cephalosporine
2. Klasse C-β-Laktamasen (übertragbar, wenn Nachweis in <i>K. pneumoniae</i>) MHK für Cefoxitin mindestens 4 mg/l, keine Absenkung der Cefpodoxim-MHK bzw. keine Hemmhofvergrößerung durch Clavulansäure	

ESBL Extended Spectrum β-Laktamase; MHK minimale Hemmstoffkonzentration.

wandter Stämme voneinander unterscheiden. Eine dritte Ebene beschreibt Erregerstämme, die zunächst unabhängig von einer genotypischen Verwandtschaft in Verbindung mit bestimmten Erkrankungen oder klinischen Situationen stehen. Tabelle 8 fasst die wichtigsten Methoden der molekularen Erregertypisierung zusammen.

Anwendung der Typisierung im Rahmen von Studien zur Resistenzentwicklung

Außer zur Aufklärung von Infektketten mit resistenten Erregern (z. B. MRSA) ist die Typisierung für die Klärung der Ursachen/Mechanismen, die einer Resistenzausbreitung zugrunde liegen, uner-

lässlich. Diesbezüglich gibt es 3 verschiedene Möglichkeiten:

1. Möglichkeit. Die beobachtete Zunahme einer Antibiotikaresistenz beruht auf einer Verbreitung von Resistenzgenen bzw. von Resistenzgenclustern zwischen einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterienstämme im Sinne eines Resistenzgen- oder eines Resistenzplasmid-Hospitalismus.

Um zu klären, ob dieser Mechanismus für die Zunahme einer Resistenz verantwortlich ist, ist zusätzlich zur Typisierung des genomischen Hintergrundes auch eine Charakterisierung der Resistenzgene bzw. Resistenzgencluster sinnvoll. Bei *Enterobacteriaceae* kann der ESBL-Phänotyp von einer Vielzahl verschiedener Mutanten der weit verbreiteten β-Laktamasen des TEM- und des SHV-Typs ausgehen, die durch PCR und eine nachfolgende Sequenzierung voneinander unterschieden werden [25]. Glykopeptidresistente Enterokokken in Europa besitzen überwiegend das *vanA*-Gen. Aufgrund von Insertionen und Deletionen sowie Punktmutationen im *vanA*-Gencluster (*Tn1546* like elements) ist eine Unterscheidung einzelner „Subtypen“ gut möglich ([26], Überblick zur Anwendung im Rahmen ökologischer Studien bei [27]). Das die Methicillinresistenz bei Staphylokokken kodierende *mecA*-Gen ist in größere Elemente (staphylococcal cassette chromosome *mec*, *SCCmec*) integriert, die bis zu 60 kb groß sein können. Bisher wurden aus Sequenzierungen die Typen I, II, III, IVa und IVb abgeleitet [28]. Unterschiedliche MRSA-Epidemiestämme und community acquired MRSA tragen verschiedene *SCCmec*-Elemente.

Der hier vorgestellte Mechanismus der Resistenzausbreitung, d. h. die Verbreitung von Resistenzgenen bzw. von Genclustern zwischen einer Vielzahl von Stämmen, gilt hauptsächlich für die β-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBL). Beispielhaft dafür sind Ergebnisse aus einem spanischen Krankenhaus. Hier traten ESBL der Typen TEM-4, SHV-2 und CTX 10 in genotypisch verschiedenen Stämmen der Spezies *E. coli* und *K. pneumoniae* auf [29].

2. Möglichkeit. Die Zunahme einer Resistenz beruht auf der Verbreitung eines bestimmten Stammes (einer bestimm-

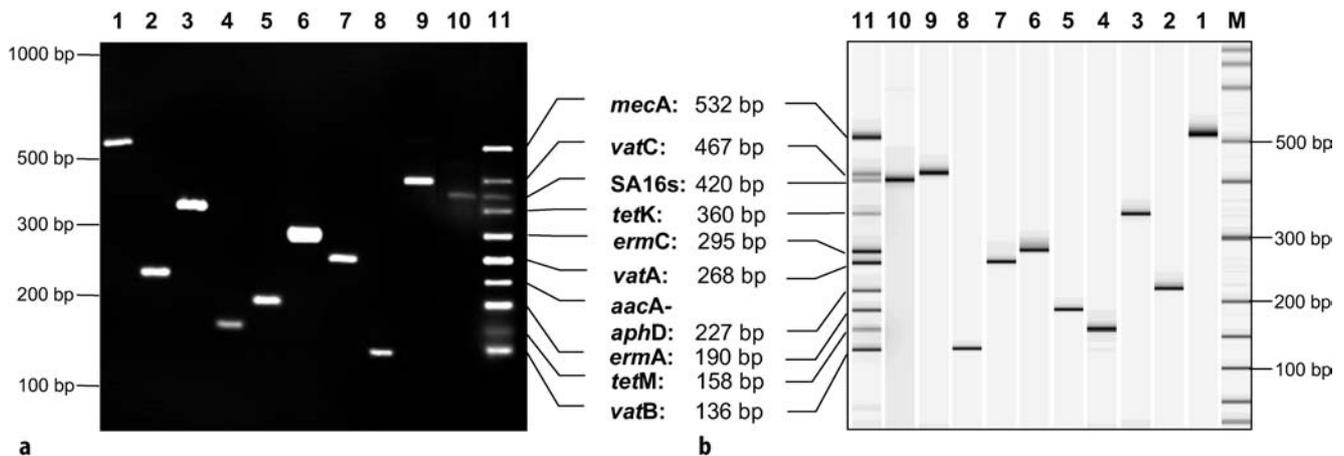


Abb. 3a,b ▲ Einzel-PCR-Produkte (1–10) und ein Multiplex-PCR-Produkt (11) für 9 klinisch relevante Antibiotikaresistenzgene und eine Amplifikationskontrolle aus der 16 s rDNA. a Darstellung mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. b Darstellung mittels Kapillarelektrophorese

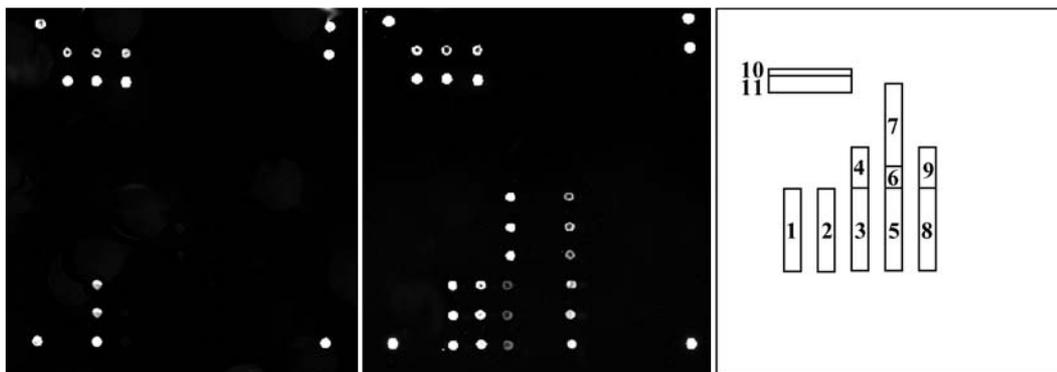


Abb. 4 ▲ Microarray-Hybridisierungsmuster für 2 verschiedene Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA). a Isolat mit schmalen Resistenzspektrum (*mecA*). b Isolat mit breitem Resistenzspektrum (*mecA*, *aacA-aphD*, *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*). c Legende; 1: *mecA*, 2: *aacA-aphD*, 3: *tetK*, 4: *tetM*, 5: *vatA*, 6: *vatB*, 7: *vatC*, 8: *ermA*, 9: *ermC*, 10: Hybridisierungskontrolle, 11: Amplifikationskontrolle

ten Subpopulation der Erregerspezies), der an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten Resistenzgene oder zur Resistenz führende Mutationen erwarb.

Ein Beispiel für diesen Mechanismus der Resistenzverbreitung ist die Verbreitung der C1-Population von *E. faecium* in europäischen Krankenhäusern. Seine Existenz wurde erst durch die Anwendung der AFLP- und MLST-Verfahren (Tabelle 8) offensichtlich. Der Erwerb des *esp*-Gens (das Gen kodiert für ein Protein der intrazellulären Adhäsion bei Biofilmbildung, vermutlich auch für Adhäsion) sowie der *van*-Gencluster und der *sat*-Gene (für Streptogramin-A-Resistenz) erfolgten und erfolgen weiterhin offenbar unabhängig voneinander [30]. Der Nachweis von *vanA*-Gen tragenden *E. faecium* mit ähnlichen Makrorestriktionsmustern in

einem Krankenhaus über längere Zeitabstände bzw. überregional in verschiedenen Krankenhäusern kann deshalb nicht ohne eine vertiefende Charakterisierung als klonale Ausbreitung interpretiert werden (Beispiele dafür bei [31, 32]).

3. Möglichkeit. Die Zunahme einer Resistenz beruht auf der klonalen Ausbreitung eines resistenten (multiresistenten) Epidemiestammes.

Dieser Mechanismus ist für den weltweit beobachteten Anstieg von MRSA verantwortlich. Dieser Anstieg geht auf die klonale Verbreitung (in Krankenhäusern, zwischen Krankenhäusern, über Landesgrenzen und auch interkontinental) von mehreren Epidemiestämmen zurück, die durch *Sma*I-Makrorestriktionsmuster [33], MLST-Typisierung und Charakterisierung der

SCCmec-Elemente charakterisiert sind [34, 35]. Aber auch bei gramnegativen Erregern von Hospitalinfektionen wurde über eine weit reichende klonale Ausbreitung bestimmter resistenter Stämme berichtet (Zusammenfassung bei [21]). Bemerkenswert ist die Ausbreitung eines *S. enterica*-Serovar-Typhimurium-Stammes, der die ESBL CTX-M-4 bildet, in Russland, Ungarn und Griechenland [36].

Ergänzung der Typisierung durch die Bestimmung von Merkmalen mit Bedeutung für die Diagnostik nosokomialer Infektionen

Die bakteriellen Erreger nosokomialer Infektionen sind an sich Bestandteil der normalen Besiedlungsflora des Menschen sowie der Umwelt. Dabei können einzelne Populationsanteile der Besiedlungsflora besondere Pathogenitätsmerkmale aufweisen, die für die Bestätigung der klinischen Diagnose von Bedeutung sind und zudem auch einen

Tabelle 8
Übersicht über die Verfahren der molekularen Typisierung, die bei Erregern nosokomialer Infektionen eingesetzt werden (Einzelheiten bei [19, 20, 21, 22, 23, 24])

Verfahren	Zugrunde liegendes Prinzip	Erregergruppen	Vergleichbarkeit	Reproduzierbarkeit	Arbeitsaufwand	Diskriminierungsfähigkeit
Makrorestriktionsmuster	Verteilung von Restriktionsendonukleasen mit vergleichsweise wenigen Schnittstellen	Staphylokokken Enterokokken Enterobacteriaceae Pseudomonaden <i>Acinetobacter</i> spp.	Hoch	Gut bei standardisierter Durchführung und elektronischer Auswertung	Hoch, erfordert Pulsfeldgelelektrophorese	Hoch, kongruent mit MLST, bei <i>S. aureus</i> und <i>spa</i> -Analyse
Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)	Sequenzanalyse von Allelen dafür geeigneter „house-keeping“-Enzyme (n=5–8)	Staphylokokken <i>E. coli</i> <i>E. faecium</i>	Sehr hoch	Sehr gut	Sehr hoch	Unterscheidet „klonale Gruppen“, wichtig für Evolutionsstudien
Sequenzanalyse von Genen und Genabschnitten	Sequenzierung von Genabschnitten (oft repeats) mit ausreichend hohem Polymorphismus, wie z. B. der X-Region von <i>spa</i> bei <i>S. aureus</i>	Bisher <i>S. aureus</i>	Sehr hoch	Sehr gut	Moderat, erfordert Datenbanksystem	Hoch
Amplified Fragment length polymorphism (AFLP)	Fragmentierung der genomischen DNS mit häufig schneidenden Restriktionsendonukleasen, Ansetzen von Linkern mit Primersequenzen, PCR mit Fluoreszenzmarkierung, Kapillarelektrophorese	Staphylokokken Enterokokken Enterobacteriaceae Pseudomonaden	Mittel bis hoch	Gut	Mittel bis hoch	Hoch
Ribotyping	Restriktionssite Polymorphismus im Bereich des rRNA-Gen Operons, Restriktaseverdau, Southern-Blot und Hybridisierung mit rRNA-Gensonde	Praktisch für jeden Erreger durchführbar	Gut	Gut	Manuell hoch, aber Automat kommerziell erhältlich	Zumeist deutlich niedriger als bei Makrorestriktion
PCR-Typisierung	Längenpolymorphismus von DNA-Abschnitten, die durch Sequenzen flankiert sind, an die Zufallsprimer binden	Z. B. M13 sowie Uprime-System	Nur bei weitgehend gleichen Puffer- und Elektrophoresesystemen gegeben	Gut im gleichen Laboratorium, begrenzt zwischen verschiedenen Laboratorien	Vergleichbar gering	Gut, geeignet als „vor Ort“-Methode für präsumptive Analyse
Variable number of tandem repeats	Durchführung mehrerer PCR für Gene (Genabschnitte), die aus Tandem Repeats bestehen, mit Primern, die diese Sequenzen begrenzen	<i>S. aureus</i> (z. B. für <i>coa</i> , <i>dru</i> , <i>fna-fnb</i>)	Hoch	Gut, wenn ausreichend standardisiert	Wenn keine Multiplex-PCR möglich, dann hoch	Vergleichsuntersuchungen noch nicht verfügbar

Tabelle 9

Beispiele für den Nachweis von Erregereigenschaften zur Bestätigung der klinischen Diagnose und mit prädiktivem Wert für den Krankheitsverlauf

Erreger	Art der Infektion	Genetische Determinante	Bisher etablierte Nachweise
<i>S. aureus</i> [37, 38, 39, 40, 41, 42]	Toxic Shock Syndrom	Superantigene Toxic Shock Syndrom Toxin (<i>tst</i>), selten Enterotoxine B und C (<i>seb, sec</i>)	PCR
	Exfoliative Dermatitis (SSSS)	Exfoliative Toxine A und B (<i>eta, etb</i>)	PCR
	Tief gehende Hautinfektionen, nekrotisierende Pneumonien	Panton-Valentin-Leukozidin (<i>lukS-lukF</i>)	PCR
<i>E. faecium</i> [43]	Systemische Infektionen	Intrazelluläres Adhäsion, Biofilmbildung, enterococcal surface protein (<i>esp</i>)	PCR
<i>E. coli</i> [44, 45, 46, 47, 48, 49]	Sepsis, Meningitis, Urosepsis, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)	Nekrotisierendes Zytotoxin (<i>cnf-1</i>), Pyelonephritis-Adhäsion (Pili, <i>papC</i>), α -Hämolysin (<i>hly</i>), Aerobactin (<i>aero</i>), Non-Fimbrien-Adhäsion (<i>afa</i>), Shiga-Toxin (<i>stx</i>), Intimin (<i>eae</i>)	Dot-blot und PCR-probes, Array-Technologie

prädiktiven Wert besitzen (Tabelle 9). Dies wird bisher vor allem für *Staphylococcus aureus* praktisch angewandt. Bei *E. coli* ist es von besonderem Interesse, Isolate mit hoher pathogener Potenz im Hinblick auf Sepsis, Urosepsis und Meningitis rechtzeitig zu erkennen. Hier wirken mehrere Pathogenitätsmechanismen zusammen, die sich vor allem bei der Subpopulation B2 finden (Tabelle 9). In epidemiologischen Studien wurden diese Virulenzassoziierten Gene bisher vergleichsweise aufwändig mittels Dot-blot-Analyse bestimmt. Aussichtsreich ist hier die Einführung von Mikroarrays [47].

Grundsätzlich ist es aber nicht möglich, innerhalb einer Spezies harmlose Besiedler von Stämmen mit hoher pathogener Potenz zu unterscheiden. Nosokomiale Infektionen betreffen häufig Patienten, die aufgrund von Grunderkrankungen, von Immunschwächen und von unausweichlichen Behandlungsverfahren (z. B. Langzeitbeatmung) für Infektionen prädisponiert sind. Ausgangspunkt einer Infektion kann dann bereits die Anwesenheit einer „Besiedlers“ zur falschen Zeit am falschen Ort sein.

Literatur

- Davies J (1997) Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Levy SB (ed) Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. John Wiley & Sons, Chichester New York, pp 1–8
- Witte W (1999) Antibiotic resistance in grampositive bacteria: epidemiological aspects. J Antimicrob Chemother 44 [Suppl A]:1–9
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of aminoglycoside modifying enzymes. Microbiol Rev 57:138–163
- Miller HG, Sabatelli JF, Hare RS et al. (1997) The most frequent aminoglycoside resistance mechanism – changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Clin Infect Dis 24:46–62
- Witte W, Mielke M (2003) β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 46:881–890
- DIN-Standard 58940; Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden
- NCCLS-Standard M100-S12. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement, January 2002
- Cuny C, Pasemann B, Witte W (1999) Detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by screening tests. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11:834–836

- Van Leeuwen W, van Pelt C, Luijendijk A et al. (1999) Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 37:3029–3030
- Cuny C, Salmenlinna S, Witte W (2001) Evaluation of a reverse hybridization blot test for detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20:906–907
- www.bag-germany.com
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 41:4089–4094
- Perez-Perez FJ, Hansen ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates using multiplex PCR. J Clin Microbiol 40:2153–2162
- Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC (2003) Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. Antimicrob Agents Chemother 47:3290–3295
- Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, Rasooly A (2003) Microarray analysis of erythromycin resistance determinants. J Appl Microbiol 95:787–798
- Reischl U, Linde HJ, Metz M et al. (2000) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 38:2429–2433
- Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B (2001) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 39:4529–4531
- Struelens M (1996) Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 2:2–11
- Goering RV (1998) The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, application, and interpretation. In: Specter G (ed) Rapid detection of infectious agents. Plenum Press, New York
- Witte W (1999) Diagnostics, typing & taxonomy. In: Fischetti VA, Fenetti J, Novick RP (eds) Grampositive pathogens. ASM, Washington, DC, pp 309–316
- Savekoul P, Aarts HJ, de Haas J et al. (1999) Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of the art. J Clin Microbiol 37:3083–3091
- Enright MC, Spratt BG (1999) Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 7:482–487
- Sabat A, Krysztos-Russjan J, Strzalka W et al. (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol 41:1801–1804

24. Harmsen D, Claus H, Witte W et al. (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting using a novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 41 (in press)
25. Gniadkowski M (2001) Evolution and epidemiology of extended spectrum β -lactamases (ESBL's) and ESBL microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 7:597–608
26. Willems R, Top J, Van den Braak N et al. (1999) Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn 7546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 43:483–491
27. Witte W, Klare I, Werner G (2002) Molecular ecological studies on spread of antibiotic resistance genes. *Anim Biotechnol* 13:57–70
28. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C et al. (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1147–1152
29. Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC et al. (2002) Genes encoding TCM-4, SHV2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1988–2000). *Antimicrob Agents Chemother* 46:500–510
30. Homann W, Tribe D, Poznanski S et al. (2002) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 40:1963–1971
31. Oancea C, Werner G, Klare I, Witte W (2003) Transfer of *esp* between enterococcal strains co-selected by antibiotic resistance gene transfer. 6th IMMEM, 27.–30.08.2003, Les Diablerets, Switzerland, Abstract 03-A-87-ASM
32. Werner G, Klare I, Spencker FB, Witte W (2003) Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in paediatric ward of a German hospital. *J Antimicrob Chemother* 52:113–115
33. Witte W, Bräulke C, Cuny C et al. (2002) Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from German hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22:683–686
34. Enright ML, Robinson DA, Feil EJ et al. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Nat Acad Sci* 28:7687–7692
35. Branger C, Gardye C, Galdbart JO et al. (2003) Genetic relationship between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from France and from international sources: delineation of genomic groups. *J Clin Microbiol* 41:2946–2951
36. Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E (1999) Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 37:3774–3777
37. Dinges M, Orwin PM, Schlievert P (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16–34
38. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP et al. (1991) Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:426–430
39. Becker K, Roth R, Peters G (1998) Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin-1 gene. *J Clin Microbiol* 36:2548–2553
40. Becker C, Friedrich AW, Lubritz G et al. (2003) Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of nasal specimens. *J Clin Microbiol* 41:1434–1439
41. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F et al. (1999) Involvement of Panton-Valentine Leukocidine-producing staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumoniae. *Clin Infect Dis* 29:1128–1132
42. Cuny C, Bräulke C, Strommenger B et al. (2004) Leukocidine determinants in *Staphylococcus aureus* of different clinical origin. *Int J Med Microbiol* 293: im Druck
43. Willems R, Homann W, Top J et al. (2001) Variant *esp* as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 357:853–855
44. Hilali F, Ruimy R, Saulnier P et al. (2000) Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients. *Infect. Immunity* 68:3983–3989
45. Johnson JR, Oswald E, O'Brian T et al. (2002) Phylogenetic distribution of virulence associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 185:774–784
46. Bingen-Bidois M, Chlermont O, Bonacorsi S et al. (2002) Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 70:3216–3226
47. Dobrindt U, Agere F, Janka A et al. (2003) Analysis of genomic plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185:1831–1840
48. Fratamico PM, Sackitey SV, Wiedmann M, Deng MY (1995) Detection of *Escherichia coli* O175:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33:2188–2191
49. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WC et al. (2002) *Escherichia coli* harbouring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185:74–84