

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Professur für Milchwissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von  
β-hämolysierenden Streptokokken, isoliert von Seehunden  
und Kegelrobben aus der deutschen Nord- und Ostsee**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Arndt J. Vossen**

Gießen 2002

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Professur für Milchwissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ch. Lämmler

**Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von  
β-hämolysierenden Streptokokken, isoliert von Seehunden  
und Kegelrobben aus der deutschen Nord- und Ostsee**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Arndt J. Vossen**

Tierarzt aus Gangelst (Rheinland)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: **Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann**

---

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Ch. Lämmler**
2. Berichterstatter: **Prof. Dr. T. Rümenapf**

Tag der mündlichen Prüfung: 10. September 2002

ISBN 3-00-010261-2

*Alles Wissen  
und alle Vermehrung unseres Wissens  
endet nicht mit einem Schlusspunkt,  
sondern mit Fragezeichen.*

*Hermann Hesse*

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> ..... 1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> ..... 4
2.1	Die Familie der Seehunde und Kegelrobben..... 4
2.1.1	Klassifizierung..... 4
2.1.2	Anatomie und allgemeine Merkmale..... 6
2.1.3	Besonderheiten von Anatomie und Verbreitung des Seehunds..... 9
2.1.3.1	Spezielle anatomische Merkmale des Seehundes..... 9
2.1.3.2	Verbreitung des Seehundes..... 10
2.1.3.3	Bestandserfassung der Seehundpopulation im europäischen Wattenmeer (1960-2001)..... 11
2.1.4	Besonderheiten von Anatomie und Verbreitung der Kegelrobbe..... 13
2.1.4.1	Spezielle anatomische Merkmale der Kegelrobbe..... 13
2.1.4.2	Verbreitung der Kegelrobbe..... 14
2.1.4.3	Bestandserfassung der Kegelrobbenpopulation im schleswig-holsteinischen Wattenmeer (1976-2001)..... 15
2.2	Bedeutame Bakterienspezies, isolierbar bei Seehunden und Kegelrobben..... 16
2.2.1	<i>Arcanobacterium phocae</i> ..... 16
2.2.2	<i>Brucella maris</i> ..... 19
2.2.3	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>grippotyphosa</i> ..... 20
2.3	Seehundepidemie im Jahre 1988..... 21
2.3.1	Geographisches Ausmaß und Mortalität..... 21

2.3.2	Pathologische Veränderungen.....	23
2.3.3	Ursache.....	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.1	Untersuchungsgut.....	27
3.2	Obduktion der Seehunde und Kegelrobben.....	31
3.3	Probengewinnung.....	33
3.3.1	Histopathologische Untersuchungen.....	33
3.3.2	Probennahme für die bakteriologischen Untersuchungen und Konservierung der Kulturen.....	38
3.4	Bakteriologische Untersuchungen.....	44
3.4.1	Anzüchtungsmedien und Kultivierung.....	44
3.4.2	Identifizierung.....	46
3.4.2.1	Koloniemorphologie, Gramfärbung, Katalasereaktion und Nachweis der CAMP-Reaktion.....	46
3.4.2.2	Serologische Gruppenbestimmung.....	47
3.4.2.2.1	Extraktion der Gruppenpolysaccharidantigene.....	47
3.4.2.2.2	Nachweis der Gruppenpolysaccharidantigene.....	48
3.4.2.2.3	Staphylokokken – Koagglutination.....	49
3.4.2.2.4	Streptokokken – Identifizierungstest.....	49
3.4.2.3	Biochemische Eigenschaften.....	50
3.4.2.3.1	Nachweis des Kohlenhydratmetabolismus mittels api 50 CH	50
3.4.2.3.2	Weitere Nachweise der biochemischen Eigenschaften.....	51
3.4.2.3.3	Hydrolyse von Äskulin.....	52
3.4.2.3.4	Hydrolyse von Na-Hippurat.....	52
3.4.2.3.5	Spaltung von Arginin.....	52
3.4.2.4	Lektin – Agglutinationstest.....	53
3.4.2.5	Nachweis von Typenantigenen.....	54
3.4.2.5.1	Extraktion der Typenantigene.....	54
3.4.2.5.2	Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony.....	54

3.4.2.6	Speziesidentifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
3.4.2.6.1	Präparation der bakteriellen DNA.....	55
3.4.2.6.2	Reaktionsansatz der PCR.....	56
3.4.2.6.3	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	56
3.4.2.6.3.1	Amplifizierung des 16S rRNA-Gens.....	56
3.4.2.6.3.2	Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	57
3.4.2.6.4	Amplifizierung des 16S rRNA-Gens mit anschließendem Restriktionsverdau.....	58
3.4.2.6.4.1	Verwendete Oligonukleotidprimer und Temperaturprogramm.....	58
3.4.2.6.4.2	Restriktionsverdau.....	58
3.4.2.6.5	Nachweis der DNA-Amplifikate im Agarosegel.....	60
3.4.2.6.5.1	Agarosegelelektrophorese.....	60
3.4.2.6.5.2	Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation.....	60
3.4.2.6.6	PCR mit <i>S. phocae</i> -spezifischen Oligonukleotidprimern.....	61
3.4.3	Weitere phänotypische Charakterisierung.....	61
3.4.3.1	Wachstum in Flüssigmedium.....	61
3.4.3.2	Wachstum in Soft-Agar.....	62
3.4.3.3	Salz-Aggregationstest.....	62
3.4.3.4	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten.....	63
3.4.4	Weitere genotypische Charakterisierung.....	65
3.4.4.1	Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA.....	65
3.4.4.1.1	Präparation der bakteriellen DNA.....	65
3.4.4.1.2	Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA.....	66
3.4.4.1.3	Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel.....	67
3.4.4.1.4	Dendrogrammanalyse.....	68
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
4.1	Identifizierung der Kulturen.....	69

4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) - vermittelte Nachweisverfahren.....	79
4.3	Weitere phänotypische Eigenschaften.....	95
4.4	Antibiotikaempfindlichkeiten.....	100
4.5	Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA.....	102
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>187</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	187
9.2	Tabellenverzeichnis.....	192
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	194



# 1 Einleitung

In den deutschen Meeresgewässern kommen zahlreiche Robbenarten vor, wobei die meisten Arten wie die Bartrobbe (*Erignathus barbatus*), die Klappmütze (*Cystophora cristata*), die Ringelrobbe (*Phoca hispida*) und die Sattelrobbe (*Phoca groenlandica*) „Irrgäste“ sind (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994; HARDER, 1996). Zwei Robbenarten, der Seehund (*Phoca vitulina*) und die Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) sind in den deutschen Gewässern heimisch und kommen ganzjährig in der Nord- und Ostsee vor.

Der Seehund und die Kegelrobbe leben, wie alle mit ihnen verwandten Robben, in einem weitgehend stabilen Ökosystem, das jedoch durch anthropogenen Einfluß zunehmend verändert wird (SONNTAG, 1995). Beide Arten sind Nahrungsoportunisten und ihr Beutespektrum wird hauptsächlich von den am häufigsten vorkommenden Fischarten bestimmt (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994).

Der Weltbestand der Seehunde wurde von BONNER (1989) aufgrund von Zählungen und Schätzungen mit 300 000 – 400 000 Individuen angegeben. Der Teilbestand im Wattenmeer, der sich geographisch über die Staaten Dänemark, Deutschland und die Niederlande erstreckt, wird seit 1951 regelmäßig gezählt. Mit Beginn dieser quantitativen Erfassung des Seehundbestandes nahm der Bestand im Wattenmeer kontinuierlich bis auf 4000 Seehunde im Jahre 1975 ab (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994). Als einflussreichster Faktor für den Rückgang der Seehundpopulation wurde die Jagd angesehen. Weitere Ursachen schienen Belastungen mit chlorierten Kohlenwasserstoffen sowie Störungen der Seehunde auf den Sandbänken durch den Menschen zu sein (WIPPER, 1974; REIJNDERS, 1978; DRESCHER, 1979; REIJNDERS, 1983). Die Einführung des Jagdverbots (in den Niederlanden 1962, in Niedersachsen 1971, in Schleswig-Holstein 1973, in Dänemark 1977) sorgte für eine deutliche

Verbesserung der Lebensbedingungen und ermöglichte erstmalig seit Jahrhunderten eine annähernd ungestörte Entwicklung der Seehundpopulation. Die Zahl der Tiere stieg nach Einstellung der Bejagung bis 1988 stetig an. Infolge der Seehundepidemie, ausgelöst durch das Phocine Distemper Virus (PDV), reduzierte sich der Seehundbestand innerhalb eines Jahres auf etwa 40% (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994). Insgesamt fielen mehr als 18 000 Seehunde diesem Massensterben zum Opfer. Im Anschluß an die Epidemie folgte eine deutliche Zunahme des Seehundbestandes mit Wachstumsraten wie vor 1988 und liegt nunmehr mit knapp 20 000 gezählten Tieren im Jahr 2001 (TRILATERAL SEAL EXPERT GROUP, 2001) in allen Regionen über den Zahlen vor der Epidemie.

Der Bestand der Kegelrobben wurde weltweit mit etwa 90 000 Individuen angegeben (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994). Im Wattenmeer kommen über 250 Tiere vor, wobei in deutschen Gewässern zwischen Amrum und Sylt etwa 100 Tiere beobachtet werden. Der typische Lebensraum der Kegelrobbe ist die Felsküste. Die Tiere aus dem Wattenmeer stammen vermutlich aus Gebieten um Farne Island, der Ostküste Englands (VAN HAAFTEN, 1974) oder der südnorwegischen Küste (SCHEIBEL und WEIDEL, 1988). Das Populationswachstum in Großbritannien führte zu einer erhöhten Abwanderungsbereitschaft, so dass einige dieser Tiere den Wattenmeerbestand vergrößern (SCHWARZ und HEIDEMANN, 1994).

Im Rahmen des vom Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein geförderten Forschungsvorhabens „Totfundmonitoring von Robben“ und „Lebendmonitoring von Robben“ zeigte sich bei bakteriologischen Untersuchungen ein vermehrtes Vorkommen von *Escherichia coli* sowie von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hämolyisierenden Streptokokken. Die  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken konnten bei Seehunden und Kegelrobben aus verschiedenen Organen mit purulenten Veränderungen teilweise in Reinkultur isoliert werden (ABT et al., 1998; BANDOMIR et al., 1999; 2000a und b). Zu diesen  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken liegen bislang keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich

serologischer Einordnung, Speziesidentifizierung oder auch weitergehender Eigenschaften vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung solcher  $\beta$ -hämolyzierenden Streptokokken, isoliert von Seehunden und Kegelrobben aus der deutschen Nord- und Ostsee.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Familie der Seehunde und Kegelrobben

#### 2.1.1 Klassifizierung

Die Arten Seehund (*Phoca vitulina*) (Abb. 1) und Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) (Abb. 2) gehören beide zur großen Ordnung der *Carnivora* (KING, 1983) und sind die häufigsten Robben der europäischen Fauna. Sie werden der Unterordnung *Pinnipedia*, die weltweit 35 Arten umfasst (KING, 1983), der Überfamilie *Phocoidea*, der Familie *Phocidae* und der Unterfamilie *Phocinae* zugeordnet. Auf dieser Stufe teilt sich die bisherige gemeinsame Klassifikation von Seehund und Kegelrobbe in die Gattungen *Phoca* und *Halichoerus* (Abb. 3).

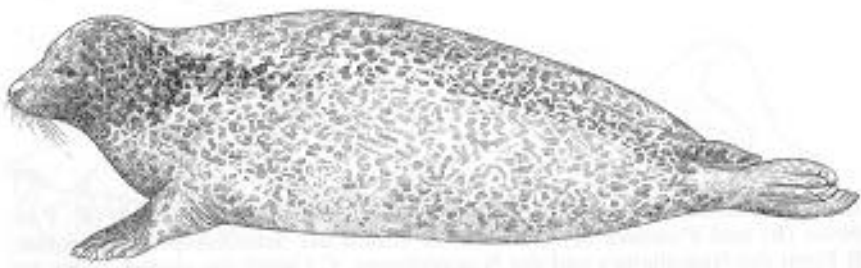


Abb. 1: Seehund (*Phoca vitulina*) (nach DUGUY und ROBINEAU, 1982; Zeichnung P. MARS)

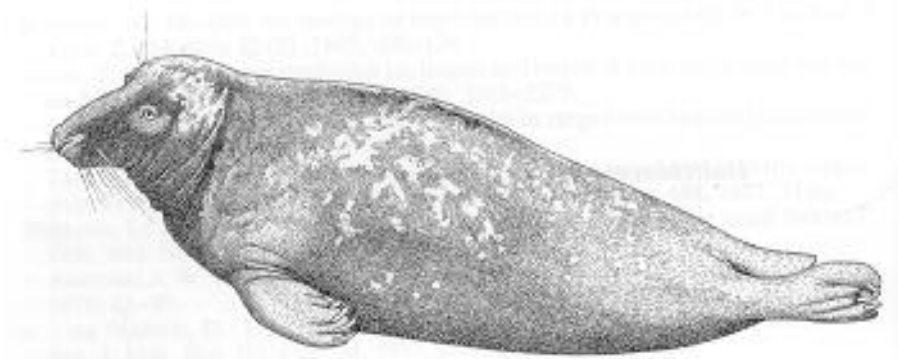


Abb. 2: Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) (nach DUGUY und ROBINEAU, 1982; Zeichnung P. MARS)

Die im Atlantik und Pazifik vorkommende Spezies *Phoca vitulina* wurde früher in die drei weiteren Unterarten *Phoca vitulina stejnegeri*, *Phoca vitulina richardsi* und *Phoca vitulina largha* unterteilt. Nach SCHEFFER (1958) erfolgte die Zuordnung der Arten *Phoca sibirica*, *Phoca hispida* und *Phoca caspica* zu der Gattung *Pusa*, da sie sich von der Gattung *Phoca* durch Kopfform, Geruch, Wurfplatz und Nahrung unterschieden. Diese Unterteilung wird heute aufgrund weiterer Untersuchungen, unter anderem der Kopfmorphologie, nicht mehr allgemein anerkannt. Die Gattung *Phoca* umfasst nach HONACKI et al. (1982) und KING (1983) nun die insgesamt sieben Arten *Phoca fasciata*, *Phoca groenlandica*, *Phoca sibirica*, *Phoca hispida*, *Phoca caspica*, *Phoca vitulina* und *Phoca largha*.

Die Gattung *Halichoerus* umfasst als einzige Art *Halichoerus grypus* (Abb. 3). BURNS und FAY (1970) wiesen an Schädelmerkmalen der Kegelrobbe auf Unterschiede zu anderen Robbenarten hin.

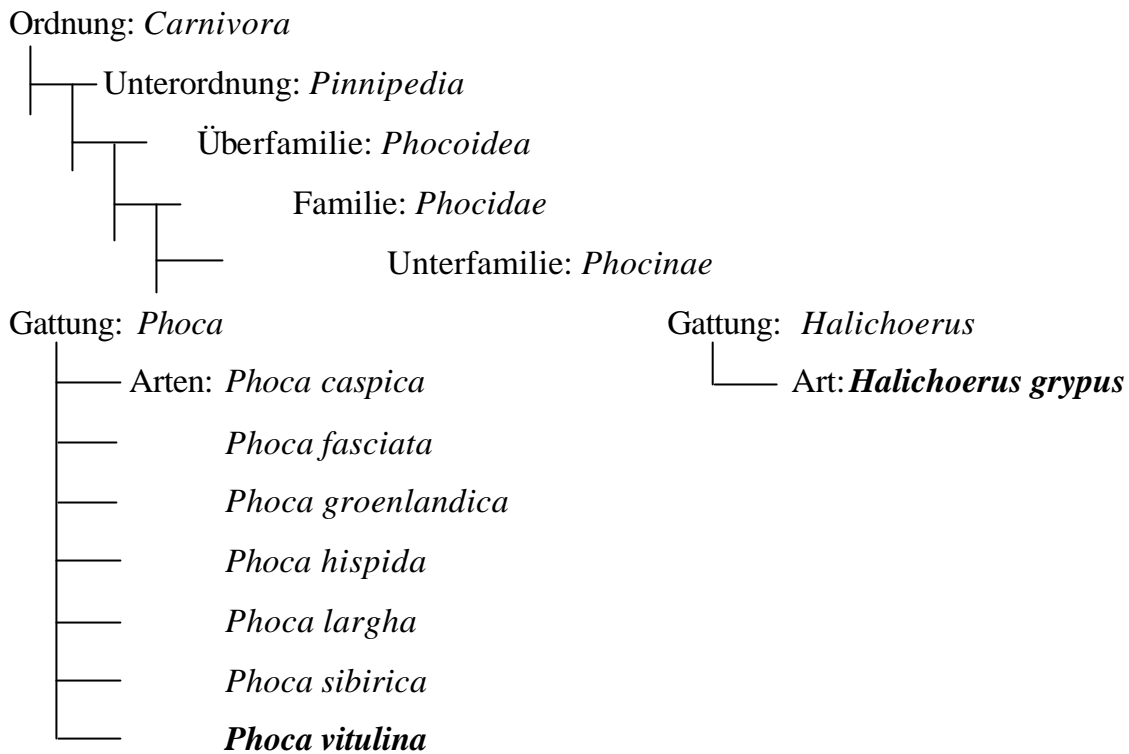


Abb. 3: Klassifikation der Seehunde und Kegelrobben

### 2.1.2 Anatomie und allgemeine Merkmale

Der Karyotyp der Seehunde und Kegelrobben beträgt  $2n=32$  Chromosomen und ist durch ein großes metazentrisches Chromosomenpaar mit Sekundäreinschnürung eines Armes charakterisiert.

Die Körperform der Robben ist durch eine spindelförmige Gestalt an das Leben im Wasser angepasst und ermöglicht dadurch eine optimale Fortbewegung im Medium Wasser.

Seehund und Kegelrobbe besitzen einen kugelförmigen Kopf mit einer Abflachung. Kennzeichnend sind das Verschwinden der Ohrmuscheln und eine abgeflachte Schnauze. Die Nasenöffnungen weisen die Form von vertikalen Spalten auf, die als V-Form mit der Spitze nach unten angeordnet sind. Rechts und links der Schnauze befinden sich 40 bis 50 Tasthaare (Vibrissen), die in horizontalen Reihen stehen und bei der Nahrungssuche eine zentrale Rolle spielen. Weiterhin sind einige Tasthaare über den Augen ausgebildet (Abb. 4).

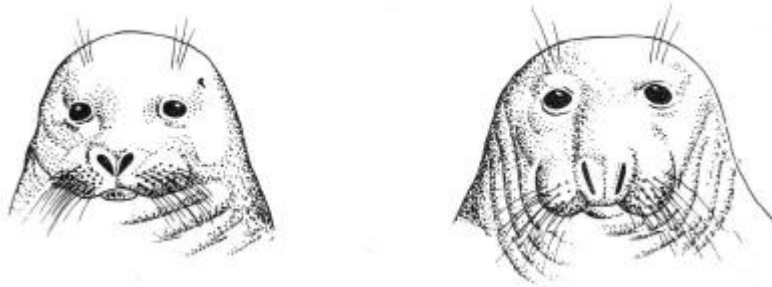


Abb. 4: Ansicht des Seehund- (links) und Kegelrobbenkopfes (rechts) von vorne (nach SOUTHERN, 1974)

Die vier Gliedmaßen weisen deutliche Anpassungen an das Schwimmen im Wasser auf und dienen der Namensgebung der Unterordnung Pinnipedia, welches an das Wort Pinna, übersetzt Flosse, angelehnt ist. Die Extremitäten sind abgeflacht und verbreitert und weisen zusammengewachsene Finger und Zehen auf, die vorne durch fettreiches Bindegewebe und hinten durch eine dünne

Schwimnhaut verbunden sind. Die Vorderextremitäten, die bei den Ruhephasen an Land dem Körper anliegen, sind kurz, die Hinterextremitäten deutlich größer, ausschließlich nach hinten gerichtet und nur beschränkt beweglich. Am Ende der Flossen befinden sich kräftige Krallen, die an den Hinterextremitäten etwas schwächer sind. Der Schwanz der Seehunde und Kegelrobben ist sehr kurz ausgebildet.

Die Färbung der Haare ist auf dem Rücken dunkler als auf der Bauchseite. Das Haarkleid besitzt zwei unterschiedliche Haararten: Deckhaare als äußeren Schutz und Wollhaare als feine Unterschicht. Die Deckhaare sind tiefer in die Haut eingefasst und die Wollhaare weisen kein Mark auf. Die Wasserundurchlässigkeit des Haarkleides erfolgt durch die Einfettung mittels Talgdrüsensekret.

Das Skelett der Seehunde und Kegelrobben ist im Vergleich zu dem der Landcarnivoren durch einen massiven Bau der Halswirbelsäule, der vorderen Gliedmaßen und des Brustkorbes, bei gleichzeitig schwach ausgebildetem Skelett des Hinterkörpers charakterisiert. Der Schädel weist einen kurzen Gesichtsteil, eine Abflachung und Verbreiterung des Basioccipitale und des Sphenoids auf. Die Orbitae sind besonders groß ausgebildet, um den sehr großen Augäpfeln der *Pinnipedia* Platz zu bieten.

Die Zahnzahl ist reduziert und das Gebiß ist verglichen mit landlebenden Carnivoren homodont ausgebildet. Die Reißzähne sind nicht mehr erkennbar und die Prämolaren und Molaren fast völlig identisch. Gut ausgebildet sind jedoch die Eckzähne. Bei Seehund und Kegelrobbe bilden sich die Milchzähne 4 bis 6 Wochen nach der Implantation der Blastozyste aus und sind bei den ca. drei Monate alten Foeten vollständig entwickelt. Zum Geburtszeitpunkt sind die Milchzähne wieder verschwunden und die Zähne des vollständigen, bleibenden Gebisses erscheinen mit etwa einem Monat nach der Geburt.

Beide Tierarten besitzen sieben Halswirbel, etwa fünfzehn Brustwirbel, fünf Lendenwirbel, drei Kreuzbeinwirbel sowie 10 bis 12 Schwanzwirbel. Durch das Fehlen antikliner Wirbel wird die Wirbelsäule besonders beweglich. Die Sakralwirbel sind verschmolzen sowie mit dem Ileum verbunden und die

Schwanzwirbel besitzen eine walzenförmige Gestalt ohne Fortsätze. Das aus acht bis neun Segmenten bestehende Brustbein ist cranial durch einen Knorpel verlängert. Die Rippen- und Brustwirbelanzahl kann, wie bei den landlebenden Säugetieren, individuelle Schwankungen aufweisen. Die Scapula ist verhältnismäßig klein ausgebildet und Humerus, Ulna und Radius sind kurz und kräftig. Nur einer der sechs Handwurzelknochen ist gelenkig mit der Ulna verbunden. Die fünf Finger verfügen jeweils über kräftige Krallen. Der Beckengürtel ist parallel zur Längsachse angeordnet. Es ist keine Pubissymphyse vorhanden. Im Weiteren ist ein verlängertes Ischium mit dorsaler Krümmung und ein mit dem Sacrum gelenkig verbundenes Ileum vorhanden. Der Femurknochen ist kräftig und cranio-dorsal abgeflacht. Tibia und Fibula sind relativ lang und proximal verschmolzen. Der erste Finger ist am stärksten und der dritte am schwächsten ausgebildet.

Die Speiseröhre ist besonders dehnbar und lang, damit auch große Beute gut in den einhöhligen Magen gelangen kann. Im Weiteren ist ein deutlicher Duodenum-Abschnitt vom übrigen Dünndarm, der relativ lang ist, abzugrenzen. Der Dickdarm und das Caecum hingegen sind relativ kurz ausgebildet, wobei jedoch die Darmlängen der Tiere individuell große Schwankungen aufweisen. Neben der in zahlreiche Lappen unterteilten Leber mit Gallenblase besitzen beide Tierarten eine langgestreckte Milz.

Die in jeweils drei Lappen geteilten Lungen sind gestreckter als bei den Landsäugetieren. Zusätzlich besitzt die rechte Lunge einen kleinen Zwischenlappen. Das Herz ist im Gegensatz zu den Landsäugetieren deutlich verbreitert und abgeflacht. Die an ihrem Ursprung stark erweiterte Aorta ascendens bildet einen Bulbus arteriosus. Die Vena cava posterior besitzt cranial des Zwerchfells einen Schließmuskel. Das Venensystem hat keine Venenklappen. Die Tiere verfügen an den Extremitäten über „Rete mirabile“ auch Wundernetze genannt, mit deren Hilfe sie vermutlich die Körpertemperatur regulieren können. Die Hoden liegen ventral in der Leistenbeuge und der Penis mit Penisknochen (Baculum) kann in eine Hautfalte zwischen Nabel und Anus



eingezogen werden. Die Prostata liegt dem Penis auf. Bei den weiblichen Tieren existieren zwei Uterushörner und ein sehr kurzer Uteruskörper. Die vier Zitzen sind paarweise vor dem Nabel angeordnet.

Die Nieren, auch Traubennieren genannt, bestehen aus zahlreichen kleinen Renculi, die jeweils eine eigene funktionelle Einheit bilden. Durch mehrere Harnleiter, die in einen gemeinsamen Harnleiter münden, wird der Harn in die längliche Harnblase geleitet (DUGUY and ROBINEAU, 1992).

Beide Arten erreichen ein relativ hohes Alter. Der Seehund kann bis zu 40 Jahre (NØRGAARD und LARSEN, 1991), weibliche Kegelrobben bis zu 45 Jahre und männliche Kegelrobben bis zu 30 Jahre (DEIMER, 1987) alt werden.

### **2.1.3 Besonderheiten von Anatomie und Verbreitung des Seehundes**

#### **2.1.3.1 Spezielle anatomische Merkmale des Seehundes**

Das Haarkleid weist auf dem Rücken kleine dunkle Flecken auf, die unregelmäßig, nicht deutlich abgegrenzt und nicht in Gruppen zusammengefaßt sind. Das Fell ist rauher als das anderer Arten und die Farbe sowie das Muster variieren stark. Es kommen stahlgraue und dunkelgraue bis hin zu gelblich-sandbraune Formen mit dunklen Flecken vor. Die Haarlänge beträgt je nach Körperregion zwischen 10 und 20 mm.

Die männlichen Tiere werden 150 bis 175 cm groß und besitzen ein Gewicht von ca. 100 kg. Die Weibchen sind mit einer Größe von 130 bis 155 cm etwas kleiner und mit einem Gewicht von etwa 80 kg auch leichter.

Das Gebiß der Seehunde besteht aus 34 Zähnen, die sich nach der Zahnformel  $I\ 3/2, C\ 1/1, P_c\ 5/5$  aufteilen. Der obere Incisivi 3 ist deutlich größer und liegt weiter außen als der  $I_2$ . Die Molaren sind durch drei gleich starke Höcker

charakterisiert und stehen im Oberkiefer schräg zur Kiefferrichtung (DUGUY und ROBINEAU, 1992).

### 2.1.3.2 Verbreitung des Seehundes

Der Seehund ist im gesamten Nord-Atlantik verbreitet. Nach BONNER (1989) kommt er an den Küsten Norwegens, in der gesamten Nordsee, der südlichen Ostsee, den Küsten Großbritanniens, Islands, Süd-Ost- und West-Grönlands sowie an der kanadischen Arktis bis zum Kap Cod bei Boston vor. Weiter bevölkert er den Nord-Pazifik mit der Baja Kalifornia in Mexiko, die Ostküste der Vereinigten Staaten und Kanadas, Bristol Bai bis Nord-Hokkaido in Japan (Abb. 5).

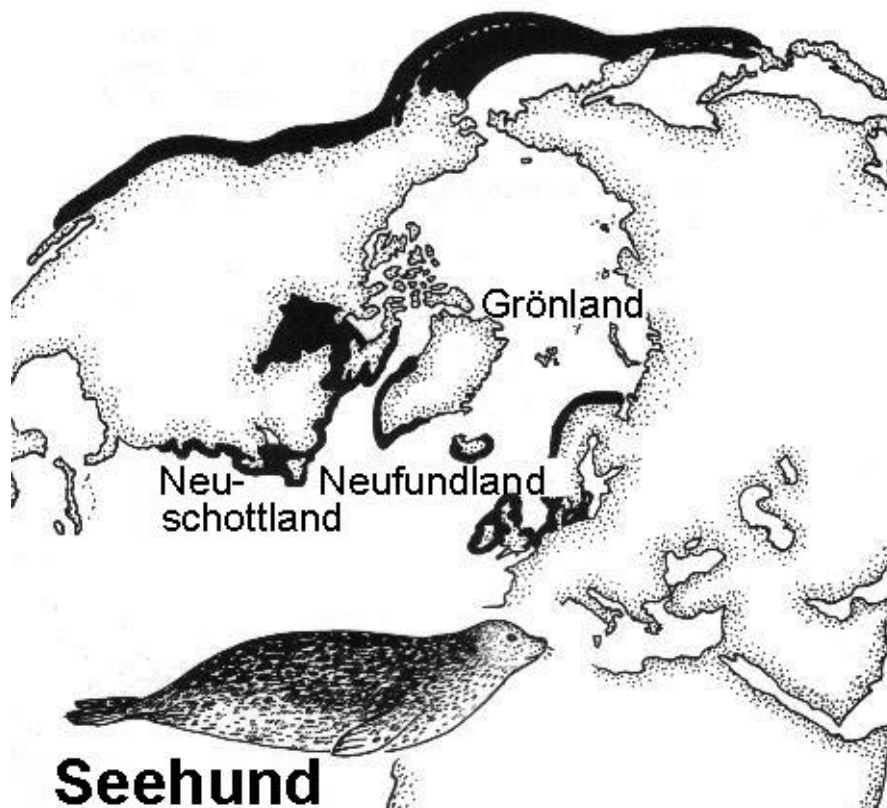


Abb. 5: Verbreitung der Seehunde (*Phoca vitulina*);  
Karte modifiziert nach BONNER (1989)

### **2.1.3.3 Bestandserfassung der Seehundpopulation im europäischen Wattenmeer (1960-2001)**

Seehunde verbringen nur etwa 20 % ihres Lebens auf dem Land, jedoch nur hier ist eine effektive Zählung möglich (ABT, 2001). Im Wattenmeer werden die bei Niedrigwasser freifallenden Watten und Sandbänke von den Seehunden als Liegeflächen genutzt. Während der Bestandszählung werden Jahreszeit, Tageszeit, Wetter und Tide so gewählt, dass eine maximale Anzahl von Seehunden an Land zu erwarten ist. Bei der Seehundzählung wird seit 1975 mit einem Flugzeug das gesamte Wattgebiet, entlang einer definierten Route, im Tiefflug beflogen. Einzelne Tiere werden während des Zählfluges sofort registriert und in eine Karte eingezeichnet. Große Seehundrudel, die über 1000 Tiere umfassen können, werden durch Fotografien aufgezeichnet und später ausgezählt. Bei mehreren Flügen innerhalb eines Jahres zur Bestandsermittlung, wird das höchste Zählergebnis als offizielle Bestandszahl angegeben und gewertet.

Die Entwicklung der Seehundpopulation im europäischen Wattenmeer ist in Abb. 6 graphisch dargestellt. Sie nahm seit den ersten Bestandsermittlungen, die teilweise schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts vorgenommen wurden, bis zu einem Bestandsminimum Anfang der 70er Jahre von etwa 3500 Seehunden stetig ab (ABT, 2001). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Einführung des Jagdverbots dieser Tierart. In den folgenden fünf Jahren stagnierte die Zahl der Tiere. Erst seit etwa 1979 nahm der Seehundbestand schließlich wieder kontinuierlich zu. Diese Zunahme der Seehundpopulation erreichte 1988 mit ca. 8500 Tieren im europäischen Wattenmeer sein vorläufiges Maximum. Aufgrund hoher Bestandsverluste durch die Seehundepidemie 1988 ging die Populationsgröße auf etwa 4500 Seehunde im Jahr 1989 zurück. Seit 1989 stieg der Seehundbestand wieder stetig an und hatte mit knapp 20 000 Tieren 2001 (TRILATERAL SEAL EXPERT GROUP, 2001) eine bisher einmalige Größenordnung erreicht. Die jährliche Bestandszunahme betrug seit der

Seehundepidemie zwischen zehn und fünfzehn Prozent. Auch im Jahr 2002 ist bisher keine Abnahme der Wachstumsrate zu erkennen, so dass ein weiterer Anstieg der Seehundpopulation im europäischen Wattenmeer in den nächsten Jahren zu erwarten ist.

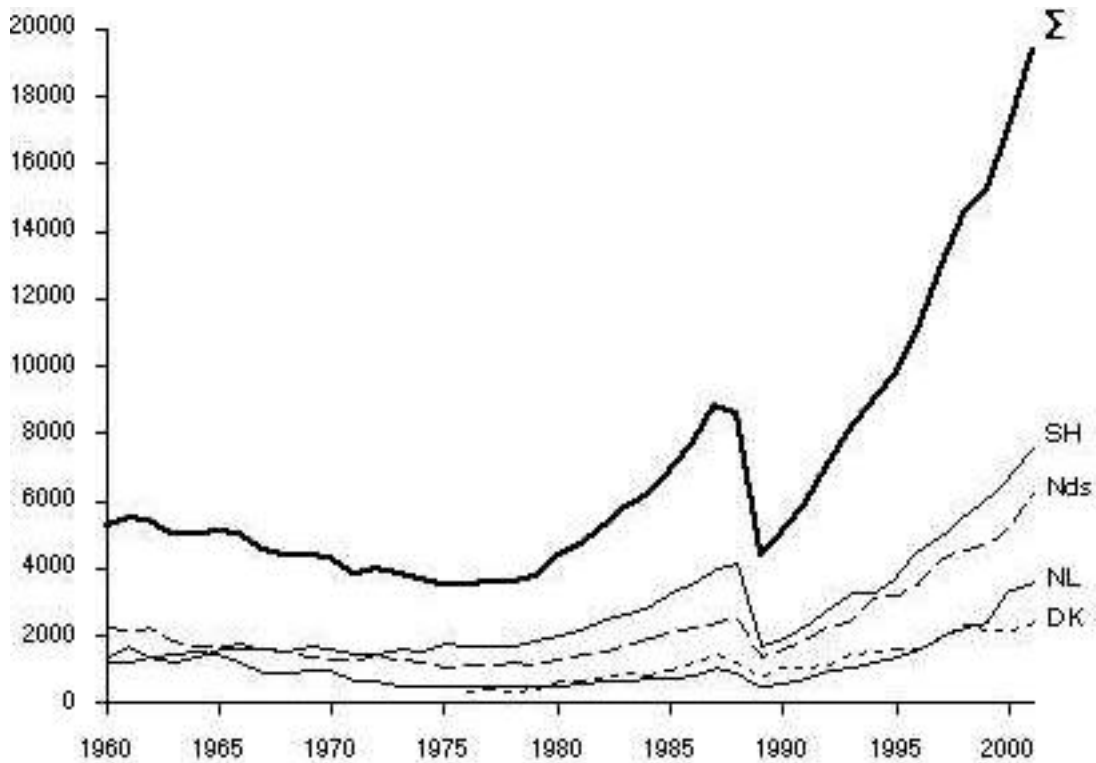


Abb. 6: Entwicklung des Seehundbestandes im europäischen Wattenmeer von 1960 bis 2001,  
 DK = Dänemark, Nds = Niedersachsen, NL = Niederlande,  
 SH = Schleswig-Holstein,  $\Sigma$  = gesamtes europäisches Wattenmeer  
 (nach ABT, unveröffentlicht)

## 2.1.4 Besonderheiten von Anatomie und Verbreitung der Kegelrobbe

### 2.1.4.1 Spezielle anatomische Merkmale der Kegelrobbe

Das Fell der Kegelrobbe ist meist einfarbig und variiert von dunkelgrau oder -braun bis zu hellem grau, silbern oder cremefarben. Es weist dunkle Flecken auf, die nur wenig zahlreich sein können oder ineinander übergehen und im Vergleich zum Seehund größer sind. Die Jungtiere werden mit einem weißen Babypelz, dem wasserdurchlässigen Lanugo, in den Wintermonaten geboren. Aufgrund dieses Lanugos sind die jungen Tiere nicht schwimmfähig. Das Lanugo wird mit zwei bis drei Wochen durch das Erwachsenenfell ersetzt.

Die Vorderflossen weisen eine paddelförmige Gestalt auf und die Hinterflossen sind fächerförmig ausgebildet.

Der Kopf der adulten Tiere ist groß und besitzt einen flachen Scheitel mit langgezogener Schnauze, welches dem Bild einer „Römischen Nase“ oder einem Pferdekopf ähnelt (Abb. 4). Der Schädel weist ein rostral konkaves Palatinum und eine breite Interorbitalregion mit hoher Schnauze auf, so dass die Nasalia parallel zu den Zahnreihen verlaufen. Der hintere Rand der Nasalia liegt etwa auf gleicher Höhe mit den Maxillaria. Die jungen Kegelrobbe verfügen über einen mit dem Seehund vergleichbaren Kopf.

Die Männchen werden im Durchschnitt 207 cm groß und besitzen ein Gewicht von 230 kg. Die weiblichen Kegelrobbe sind mit einer Größe von 180 cm deutlich kleiner und auch nur 154 kg schwer. Aufgrund der deutlichen Größenunterschiede zwischen den Geschlechtern verfügt die Kegelrobbe über einem ausgeprägten Sexualdimorphismus.

Das Gebiss der Kegelrobbe ergibt die Zahnformel:  $I \frac{3}{2}, C \frac{1}{1}, Pc \frac{5-6}{5}$ . Die oberen Incisivi sind größer als die unteren und die Canini sind kräftig sowie konisch ausgebildet. Auch die postcaninen Zähne sind groß und kräftig, einige fast rund im Querschnitt sowie mit einer konischen Spitze versehen. Es können kleine Sekundärhöcker an  $Pc^5$ ,  $Pc_4$  und  $Pc_5$  vorkommen, die aber nicht

regelmäßig ausgebildet und bei alten Tieren nach innen aus der Zahnreihe gedrückt sind (DUGUY und ROBINEAU, 1992).

#### **2.1.4.2 Verbreitung der Kegelrobbe**

Insgesamt kommen weltweit drei Kegelrobbenpopulationen vor (Abb. 7). Eine Population bewohnt den Nord-West-Atlantik mit den Küsten von Hebron, Labrador und Nantucket. Eine weitere Population ist in der Ostsee beheimatet und eine dritte bevölkert den Nord-West-Atlantik mit den Küsten im Westen und Süden Islands, den Färöer-Inseln, den norwegischen und russischen Atlantikküsten, den Küsten Großbritanniens und der Bretagne (BONNER, 1989). Im deutschen Wattenmeer vor den Inseln Sylt und Amrum kommen ca. 50 bis 100 Tiere vor (ABT et al., 2002).

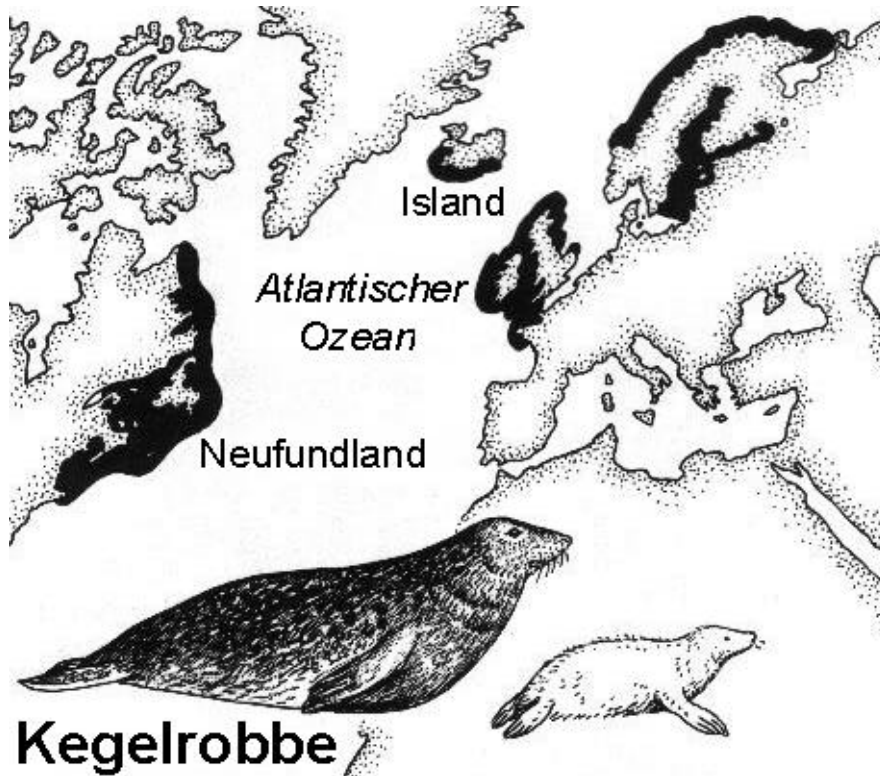


Abb. 7: Verbreitung der Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*);  
Karte modifiziert nach BONNER (1989)

#### 2.1.4.3 Bestandserfassung der Kegelrobbenpopulation im schleswig-holsteinischen Wattenmeer (1976-2001)

Kegelrobben sind vereinzelt an verschiedenen Orten im Wattenmeer anzutreffen (ABT et al., 2002). Regelmäßig kommen rastende Tiere jedoch nur auf den Knobsänden vor der Nordfriesischen Insel Amrum vor. Dort werden schon seit mehreren Jahrzehnten Kegelrobben beobachtet. Viele Kegelrobben verbringen nur einen Teil des Jahres, das sind teilweise nur einige Monate oder Wochen, in diesem Gebiet. Die Stellung dieser Tiere ist mit der überwinternder Vögel vergleichbar. Die genaue Aufenthaltsdauer und der Aufenthaltsort sind nicht bekannt, es scheint aber große Unterschiede zwischen einzelnen Kegelrobben zu geben (HOYER, 1998).

Die größte Anzahl von Kegelrobben wird jährlich im Frühjahr, Ende März und Anfang April beobachtet, wenn sich 70 bis über 100 Kegelrobben auf den Knobsänden befinden (ABT et al., 2002). Von Ende Mai bis Ende Januar, dies schließt die Wurfseason der Kegelrobben im Winter ein, werden nur etwa 40 Tiere auf diesen Sandbänken beobachtet.

Seit dem Beginn der Beobachtungen 1976 stieg nach ABT et al. (2002) sowohl der Frühjahrs- als auch der Sommerbestand jährlich um etwa 4 bis 5 % an. Die Anzahl der geborenen Kegelrobben betrug in den Jahren 1988 bis 1995 drei bis zehn junge Kegelrobben und in den Jahren 1996 bis 1999 neun bis dreizehn Tiere jährlich. Seit 1999 lag die Zahl der Geburten pro Jahr bei etwa 13 Kegelrobben. Diese Geburtenzahlen lassen auf einen Wurfbestand schließen, der etwa der Hälfte der minimalen Gesamtpopulationsgröße entspricht. Die Bestandszunahme des Frühjahrs- und Sommerbestandes beruhte nicht nur auf der örtlichen Reproduktion, sondern wurde auch auf den allgemeinen Anstieg der Kegelrobbenpopulation im Atlantik und der Nordsee zurückgeführt.

Bei der Kegelrobbenpopulation auf den Knobsänden vor Amrum konnten von ABT et al. (2002) ein ortsansässiger Wurfbestand und ein gleichgroßer oder größerer wandernder Migrationsbestand unterschieden werden. Die nicht ortsansässigen Tiere gehörten zu größeren Kegelrobbenkolonien aus dem Süden und Westen der Nordsee. Diese wanderten zur Wurfzeit dorthin zurück.

## **2.2 Bedeutsame Bakterienspezies, isolierbar bei Seehunden und Kegelrobben**

### **2.2.1 *Arcanobacterium phocae***

Die Gattung *Arcanobacterium* wurde 1982 erstmals von COLLINS et al. beschrieben. RAMOS et al. (1997) isolierten bei Seehunden und Kegelrobben



sechs Kulturen aus unterschiedlichen Geweben, die der Bakterienspezies *Arcanobacterium phocae* zugeordnet werden konnten. Die pathogene Bedeutung der Keime war unklar. Es fiel jedoch auf, dass die Kulturen im Zusammenhang mit Bronchopneumonien und Septikämien isoliert worden waren. *A. phocae* war grampositiv, nicht beweglich, fakultativ anaerob und bildete keine Sporen. Auf Schafblutagar wuchs *A. phocae* in kleinen weißen, runden, leicht konvexen Kolonien mit einer Zone deutlicher  $\beta$ -Hämolyse, die den zwei- bis dreifachen Durchmesser der Koloniegröße aufwies (RAMOS et al., 1997). Weitere biochemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Da eine klare Unterscheidung durch phänotypische Eigenschaften nicht möglich war, untersuchten RAMOS et al. (1997) die Sequenzen der 16S rRNA von *A. phocae* und anderer Bakterien der Gattungen *Actinomyces* und *Arcanobacterium*. Hierbei wurde eine phylogenetische Nähe von *A. phocae* zu *Arcanobacterium haemolyticum* festgestellt und in Dendrogrammen, basierend auf der 16S rRNA-Gensequenz, dargestellt.

Tabelle 1: Einige phänotypische Eigenschaften von *Arcanobacterium phocae* nach RAMOS et al. (1997)

Eigenschaften	n = 6	Eigenschaften	n = 6
$\beta$ -Hämolyse	6*	Melezitose	4
Katalase	5	Melibiose	0
Nitrat-Reduktion	0	D-Raffinose	0
Hydrolyse von:		Rhamnose	0
Äsculin	0	Ribose	6
Gelatine	0	Saccharose	6
Urease	0	Salicin	0
Säurebildung aus:		Sorbit	0
Adonit	0	Sorbose	0
Amygdalin	0	Stärke	6
D-Arabinose	0	D-Tagatose	2
L-Arabinose	0	Trehalose	5

Fortsetzung Tabelle 1:

Eigenschaften	n = 6	Eigenschaften	n = 6
Säurebildung aus:		Säurebildung aus:	
D-Arabit	0	D-Turanose	6
L-Arabit	0	Xylit	0
Arbutin	0	D-Xylose	1
Cellobiose	0	L-Xylose	0
Dulcitol	0	$\beta$ -Methyl-D-Xylosid	0
Erythrit	0	Enzyme:	
Fructose	6	Pyrrolidonylarylamidase	0
D-Fucose	0	Pyrazinamidase	6
L-Fucose	0	Cystin Arylamidase	2
Galactose	6	Leucin Arylamidase	6
Gentobiose	0	Valin Arylamidase	0
Gluconat	1	Chymotrypsin	0
2-Keto-Gluconat	0	Esterase	4
5-Keto-Gluconat	6	$\alpha$ -Fucosidase	0
N-Acetylglucosamin	6	$\alpha$ -Galactosidase	5
Glucose	6	$\beta$ -Galactosidase	6
$\alpha$ -Methyl-D-Glucosid	0	N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	0
Glycerol	6	$\alpha$ -Glucosidase	6
Glycogen	6	$\beta$ -Glucosidase	0
Inosit	5	$\beta$ -Glucuronidase	0
Inulin	0	Esterase-Lipase	4
Lactose	6	Lipase	0
D-Lyxose	0	$\alpha$ -Mannosidase	0
Maltose	6	Saure Phosphatase	6
Mannit	2	Alkalische Phosphatase	2
Mannose	4	Naphthol-Phosphohydrolase	0
$\alpha$ -Methyl-Mannosid	0	Trypsin	2

\* = Anzahl der positiven Kulturen

### 2.2.2 *Brucella maris*

Die Brucellose ist eine Zoonose-Erkrankung, die bei zahlreichen Säugetieren auftritt. Bei den Haustieren verursacht sie Aborte, Infertilität und andere Störungen des Reproduktionssystems (GEDEK, 1993).

EWALT et al. beschrieben 1994 bei einem Großen Tümmler (*Tursiops truncatus*) und ROSS et al. (1994) bei verschiedenen marinen Säugetieren, wie dem Seehund, das Vorkommen von Brucellen. FOSTER et al. konnten 1996 bei einer Kegelrobbe ebenfalls Brucellen isolieren. Auch andere Autoren (NIELSEN et al., 1996; GARNER et al., 1997; JAHANS et al., 1997) beschrieben eine Isolierung von Brucellen bei marinen Säugetieren. Serologische Nachweise von *Brucella*-Antikörpern bei marinen Säugetieren in Europa und Südamerika wurden von VAN BRESSEM et al. (2001) durchgeführt. Diese Bakterien schienen nach FOSTER et al. (1996) bei marinen Säugetieren weit verbreitet zu sein.

Zur Beurteilung der Brucellose bei marinen Säugetieren empfahlen FOSTER et al. (1996) die Untersuchung von Milz, Reproduktionssystem, Lymphknoten des Reproduktions- und Verdauungssystems sowie aller veränderten Organe. Die Anzucht der Kulturen erfolgte auf Farrell-Medium und Columbia-Schaf-Blut-Agar bei 37° C in Anwesenheit von 10 % Kohlendioxyd. Ein negatives Ergebnis konnte erst nach siebentägiger Bebrütung diagnostiziert werden. Verdächtige Kolonien wurden durch Kolonie- und Zellmorphologie, Gram- sowie Ziehl-Neelsen-Färbung und durch Agglutination mit *Brucella abortus*-spezifischem Antiserum identifiziert.

Außerdem verglichen FOSTER et al. (1996) die Gewebe und Organe von marinen Säugetieren, aus denen Brucellen isoliert worden waren, mit Kulturen, isoliert von Rindern, Schafen, Schweinen und Rentieren. Die Autoren vermuteten eine ähnliche Pathogenese und Übertragung der Brucellen, isoliert von marinen Säugetieren, wie sie auch bei Brucellen, isoliert von terrestrischen Säugetieren, beschrieben wurden. Infektionsversuche an Versuchstieren mit

Brucellen, isoliert von marinen Säugetieren, die von ROSS et al., (1996) sowie JAHANS et al., (1997) durchgeführt wurden, deuteten jedoch auf eine geringere Virulenz dieser Brucellen, verglichen mit den Brucellen von Haussäugetieren, hin.

Die bei den marinen Säugetieren nachgewiesenen Bakterien der Gattung *Brucella* konnten nach JENSEN et al. (1999) bisher keiner bekannten Brucellenspezies zugeordnet werden. Daher untersuchten diese Autoren sechs Brucellenspezies und weitere Brucellen, die von unterschiedlichen marinen Säugetieren isoliert wurden, mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Phänotypische Eigenschaften und die Ergebnisse der PFGE stützten die bisher bekannte Taxonomie der Brucellen und sprachen für eine bei marinen Säugetieren vorkommende neue Spezies, die vorläufig als *Brucella maris* bezeichnet wurde.

Aufgrund der Untersuchungen von FOSTER et al. (1996) konnten Brucellen, isoliert von marinen Säugetieren, in zwei Gruppen unterteilt werden. Brucellen, die von Robben isoliert wurden, zeigten eine Kohlendioxidabhängigkeit, Kulturen, isoliert von Cetaceen, waren kohlendioxidunabhängig. Aufgrund der molekularen Analysen des *omp2* locus und der Herkunft der Brucellen von verschiedenen Hauptwirten unterteilten CLOECKAERT et al. (2001) die vorläufig als *Brucella maris* bezeichneten Brucellen weiter. Sie ordneten der Gattung *Brucella* zwei neue Brucellenspezies, die von Robben isolierte Spezies *Brucella pinnipediae* und die von Delphinen isolierte Spezies *Brucella cetaceae*, zu.

### **2.2.3 *Leptospira interrogans* Serovar *grippotyphosa***

Leptospiren wurden bereits bei zahlreichen Wild- und Haussäugetieren nachgewiesen (REILLY, 1970; MAGHAMI et al., 1977). Bei Seehunden

konnten *Leptospira interrogans* Serovar *grippotyphosa* erstmals von STAMPER (1998) isoliert werden. Im Juni 1996 zeigten zwei Seehunde im Rehabilitationszentrum in Kalifornien klinische Symptome wie Anorexie, Schwäche, Dehydration, orale Ulzera und Halitosis. Die Blutanalyse zeigte eine Leukozytose, erhöhte Werte für Harnstoff, Kreatinin, Gesamteiweiß, Globulin, Calcium und Phosphor. Die Untersuchung des Urins ergab ein spezifisches Gewicht von 1.018 sowie zahlreiche Granula, Erythrozyten und einige wenige Leukozyten. Der Serum-titer gegen *L. interrogans* Serovar *grippotyphosa* war bei beiden Tieren erhöht. Bei einem dritten Tier, das während des Auftretens der Krankheitssymptome der beiden anderen Seehunde starb, konnte ebenfalls ein erhöhter Titer gegen *L. interrogans* Serovar *grippotyphosa* nachgewiesen werden. Die Sektionen aller drei Seehunde ergab eine Tubulusnekrose mit interstitieller Nephritis. Bei einem Seehund konnten Leptospiren im Nierenparenchym nachgewiesen werden. Die Ursache der Nierenveränderungen wurde von STAMPER et al. (1998) im Erreger *L. interrogans* Serovar *grippotyphosa* gesehen. Als Überträger diskutierten die Autoren andere in dem Rehabilitationszentrum gehaltene Tierarten, wie Seelöwen und Seeelefanten. Weitere mögliche Ansteckungsquellen wurden in den Wildtierarten, die in der Umgebung des Rehabilitationszentrums vorkamen, gesehen. Hierzu zählten Stinktiere, Mäuse und Füchse.

## **2.3 Seehundepidemie im Jahre 1988**

### **2.3.1 Geographisches Ausmaß und Mortalität**

Die ersten Anzeichen der Seehundepidemie in Europa traten etwa Mitte April 1988 auf, als zahlreiche tote Seehunde und Aborte junger Seehunde auf der dänischen Insel Anholt im Kattegat beobachtet wurden (KENNEDY, 1990). Von

der dänischen Insel Anholt ausgehend breitete sich das Seehundsterben auf zahlreiche weitere Seehundkolonien in vielen weiteren Ländern aus. Zunächst starben Ende April weitere Tiere auf der dänischen Insel Hesselø (DIETZ et al., 1989). Mitte Mai stieg die Mortalität im westlichen Kattegat und Ende Mai auch im östlichen Kattegat sowie im dänischen und niederländischen Wattenmeer an. Im Juni breitete sich die Epidemie weiter auf den Skagerrak in Dänemark, das deutsche Wattenmeer und Limfjord aus. Zu Beginn des Juli erreichte das Seehundsterben die Gebiete um Oslo und Mitte Juli die kleineren Seehundkolonien in der südwestlichen Ostsee. In England trat eine deutlich erhöhte Sterblichkeit der Seehunde nicht vor August auf. Ab August und September 1988 wurde auch von der Ausbreitung der Epidemie auf irische Gewässer sowie die westlichen schottischen Gewässer berichtet. Nur wenige Seehunde in Europa blieben 1988 von der Seehundepidemie verschont. Hierzu gehörten die ca. 2 500 Tiere im Norden Norwegens, eine größere Anzahl von etwa 30 000 Seehunden in Island und eine kleine Gruppe von etwa 100 Tieren in der Ostsee.

Die Kegelrobben wurden von der Epidemie nicht so stark betroffen wie die Seehunde (DIETZ et al., 1989). In England konnten 200 tot aufgefundene Kegelrobben ätiologisch dem Robbensterben von 1988 zugeordnet werden (HARWOOD et al., 1989). Im Kattegat und der westlichen Ostsee wurden sechs tote Kegelrobben gefunden (DIETZ et al., 1989).

Auch im Nordwesten Europas konnte 1988 von zahlreichen toten Seehunden berichtet werden. Im dänischen Kattegat wurden 3909 tote Seehunde gefunden, im schwedischen Skagerrak betrug die Zahl der toten Tiere 1469 und im norwegischen Skagerrak waren 910 tote Seehunde aufgefunden worden (DIETZ et al., 1989). Die Gesamtzahl der toten Seehunde im dänischen, deutschen und niederländischen Wattenmeer betrug 8456 Tiere. In Limfjord wurden 391 verendete Seehunde und in der Ostsee 143 tote Tiere registriert. Die in britischen Gewässern gefundene Zahl an toten Seehunden belief sich auf 2658

Tiere, so dass 1988 während des Seehundsterbens insgesamt etwa 18 000 tote Seehunde registriert werden konnten.

In den meisten Regionen dauerte die Seehundepidemie etwa zwei Monate an, wobei in diesen 40 bis 60 Tagen ca. 90% der Seehunde verendeten (DIETZ et al., 1989). Im Wattenmeer dauerte der Seuchenzug länger als in den übrigen Regionen. Im niederländischen Wattenmeer wurden noch während des Winters 1988/1989 einige weitere tote Seehunde der Epidemie zugeordnet (OSTERHAUS et al., 1989). Die Sterblichkeit während der Seehundepidemie hatte in allen Regionen einen identischen Verlauf (DIETZ et al., 1989). In den ersten zwei bis drei Wochen war die Sterblichkeit zunächst relativ gering. Täglich verendeten nur wenige Tiere. Anschließend stieg die Sterblichkeit rapide an und erreichte eine Plateauphase der täglichen Sterblichkeit nach etwa zwei Monaten. Danach sank die Sterblichkeit wieder deutlich ab.

### **2.3.2 Pathologische Veränderungen**

Die häufigste pathologische Veränderung der Seehunde, die während der Seehundepidemie 1988 starben, war die Bronchopneumonie (BREUER et al., 1988; KENNEDY et al., 1988; KROGSRUD et al., 1990). Nach KENNEDY (1990) waren die Pneumonien regelmäßig mit interlobulären und subpleuralen Lungenödemen und –emphysemen assoziiert, wobei die Emphyseme häufig bis ins Mediastinum und auch in die Subkutis des Nackens ausgedehnt waren.

Histologisch zeigte sich das Bild einer bronchointerstitialen Pneumonie (KENNEDY, 1990). Die Alveolen waren ödematös und mit serofibrinösem Exsudat, Leukozyten und Makrophagen gefüllt. Charakteristisch waren die Proliferation von Typ II Pneumozyten und zytoplasmatische, azidophile Einschlusskörperchen im Bronchialepithel, in intraalveolären Makrophagen und im multinuklealen Synzytium.

Im Weiteren wurden an zahlreichen Seehunden nicht-eitrige, demyelinisierte Enzephalitiden diagnostiziert (KENNEDY, 1990). Ferner traten Degenerationen und Nekrosen der Neurone des cerebralen Cortex, eine Gliosis und eine Demyelinisierung auf. In den Neuronen konnten häufig zytoplasmatische und nukleäre, azidophile Einschlusskörperchen nachgewiesen werden.

Während der Seehundepidemie waren bei verendeten Tiere ferner Lymphozytendepletionen und -nekrosen in Milz und Lymphknoten feststellbar (KENNEDY, 1990). Im Weiteren wurden zahlreiche zytoplasmatische, azidophile Einschlusskörperchen im Übergangsepithel des Nierenbeckens und der Blase sowie gelegentlich in Magenepithelien beobachtet.

### **2.3.3 Ursache**

Zunächst wurden verschiedene Ursachen als Auslöser der Epidemie diskutiert. Hierzu zählten auch die Belastung der Umwelt mit diversen Schadstoffen (KENNEDY, 1990). Es zeigte sich jedoch relativ schnell, dass ein infektiöses Geschehen Ursache sein musste. Auch wurden verschiedene Viren, wie Herpesviren oder Picornaviren, die von verendeten Tieren isoliert werden konnten, als Auslöser der Epidemie diskutiert (OSTERHAUS, 1988; OSTERHAUS and VEDDER, 1988). BREUER et al. (1988), HOFMEISTER et al. (1988) und KENNEDY et al. (1988, 1989) konnten Morbillivirus-Antigen in Epithelien, im zentralen Nervensystem (ZNS) und im lymphatischen Gewebe von erkrankten Seehunden mittels Immunperoxidase- und Immunfluoreszenzfärbung nachweisen. Die histopathologischen Veränderungen, die in Zusammenhang mit dem Nachweis des Morbillivirus Antigens standen, waren den Veränderungen der Staupe, verursacht durch das Canine Distemper Virus (CDV) bei Hunden und anderen landlebenden Säugetieren, sehr ähnlich



(DUNGWORTH 1985). Von KENNEDY et al. (1988, 1989) wurden daher als Ursache der Epidemie das CDV oder ein nah verwandtes Virus diskutiert.

BLIXENKRONE-MOLLER et al. (1989), OSTERHAUS et al. (1989) und VISSER et al. (1989) konnten durch die Verabreichung einer Gewebesuspension, die aus erkrankten Seehunden während der Epidemie 1988 hergestellt wurde, bei Seehunden und Nerzen, deren Immunsystem noch keinen Kontakt mit Morbilliviren hatte, eine Staupe-ähnliche Erkrankung auslösen. Seehunde und Nerze, die zuvor gegen Hundestaupe geimpft worden waren, waren nicht infizierbar. Außerdem konnten OSTERHAUS et al. (1989) durch Verabreichung eines Gewebehomogenats aus Seehunden, die während des Seehundsterbens erkrankt waren, bei SPF-Hunden eine leicht verlaufende Staupe-ähnliche Erkrankung auslösen. Diese Untersuchungen bestätigten die Vermutung, dass ein Mobillivirus das primäre Agens der Seehundepidemie war.

COSBY et al. (1988) untersuchten die Beziehung zwischen verschiedenen Morbilliviren aufgrund der Struktur ihrer N-Proteine. Sie bestimmten vom Virus, das die Seehundepidemie auslöste, vom Hundestaupevirus (CDV), vom Rinderpestvirus (RPV) und vom Masernvirus des Menschen das Molekulargewicht des N-Proteins. Dieses betrug beim Virus der Seehunde 65 000 kD und bei den anderen drei Viren jeweils 60 000 kD. Diese Zusammenhänge waren erste Anzeichen für die Existenz eines neuartigen Morbillivirus innerhalb der Seehundpopulation.

BOSTOCK et al. (1990) untersuchten das Morbillivirus aus der Milz eines Seehundes mittels DNA-RNA-Hybridisierung. Sie verwendeten kurze und lange cDNA-Klone verschiedener Morbilliviren zur Untersuchung der Seehundvirus RNA. Die kurze cDNA enthielt Regionen geringer Homologie zwischen vergleichbaren Genen verschiedener Morbilliviren. Diese waren spezifisch für jedes Virus und hybridisieren nicht mit nichthomologen Viren. Die kurzen cDNA's des Staupevirus, des Rinderpestvirus und des Masernvirus hybridisierten nicht mit der cDNA des Seehundvirus. Dies wies auf den Unterschied zwischen dem Seehundvirus und den drei anderen Viren hin. Die lange cDNA besteht aus

Regionen mit hoher Homologie zwischen äquivalenten Genen verschiedener Morbilliviren. Dies führt zur Kreuzhybridisierung auch nichthomologer Viren. Die cDNA einiger Morbilliviren kreuzhybridisierte mit der cDNA des Seehundvirus und bestätigte die Einordnung dieses Virus zu den Morbilliviren.

CURRAN et al. (1990) verglichen und analysierten die Nukleotidsequenz des Seehundvirus mit dem Staupevirus, dem Rinderpestvirus und dem Masernvirus. Hierbei konnten Gemeinsamkeiten zwischen dem Seehundvirus und dem Staupevirus erkannt werden. Diese Übereinstimmungen waren vergleichbar mit den Gemeinsamkeiten zwischen dem Rinderpestvirus und dem Masernvirus, so dass das Seehundvirus mit dem Staupevirus in gleicher Beziehung steht, wie das Rinderpestvirus mit dem Masernvirus.

Die Untersuchungen des Seehundvirus, das die Epidemie 1988 in Nord-West-Europa verursachte, zeigte deutlich die Eigenständigkeit dieses Virus.

Das Virus gehört zur Familie der *Paramyxoviridae* und hier zur Gruppe der Morbilliviren. Es unterscheidet sich jedoch deutlich von allen bisher bekannten Morbilliviren, so dass dieses neuartige Morbillivirus als Phocines Distemper Virus (PDV) bezeichnet wurde (ROLLE und MAYR, 1993). Dieses Virus wurde später als PDV-1 benannt, da man noch ein weiteres PDV isolieren konnte. Das als PDV-2 bezeichnete Virus verursachte den Tod mehrerer tausend Sibirischer- oder Baikal-Ringelrobben (*Phoca sibirica*) (ROLLE und MAYR, 1993).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Untersuchungsgut**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 72 Bakterienkulturen untersucht, die aus 55 Gewebeproben von 39 Seehunden und aus 9 Gewebeproben von vier Kegelrobben aus der deutschen Nord- und Ostsee im Zeitraum von 1995 bis 1999 isoliert werden konnten. Die Untersuchungen waren Bestandteil des Forschungsvorhabens „Totfundmonitoring von Robben“ des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein unter der Leitung von Frau Dr. U. Siebert (Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Zentrale Einrichtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Büsum) und Herrn Prof. Dr. D. Adelung (Institut für Meereskunde der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Bei den am Strand aufgefundenen Tieren handelte es sich entweder um bereits verendete Tiere (Totfunde) oder um noch lebende Tiere, die aufgrund eines nicht überlebensfähigen Zustandes vom zuständigen Seehundjäger getötet wurden. In die Untersuchungen konnten ebenfalls ein Seehund und eine Kegelrobbe miteinbezogen werden, die anhand von Netzmarken (= Einschnitte in der Haut durch Netze) als Beifang, dies sind versehentlich in Netzen gefangene und in diesen gestorbene Tiere, identifiziert worden waren. Ein weiterer Seehund stammte aus der Seehundanlage der Biologischen Anstalt Helgoland und verstarb dort. Außerdem wurde ein lebender Seehund, der im Rahmen der Seehundfangaktion am 21. Oktober 1997 untersucht wurde sowie ein lebender Seehund und eine lebende Kegelrobbe, die zur Rehabilitation in der Seehundaufzuchtstation Friedrichskoog gehalten wurden, in die Untersuchungen einbezogen.

Zur besseren Übersicht wurde ein Tierschlüssel verwendet. Angaben zu Fundort, -datum und Art des Fundes der Tiere sind aus Tabelle 2 und Tabelle 3 zu entnehmen. Im Weiteren wurden die Fundorte in Abbildung 8 dargestellt.

Tab. 2: Funddaten zu den untersuchten Seehunden (*Phoca vitulina*)

Tierschlüssel	Fundort	Funddatum	Fundart
P1	Nordsee (Amrum)	26.12.95	G
P2	Nordsee (Dagebüll)	15.06.96	G
P3	Nordsee (Nordstrand)	16.06.96	G
P4	Nordsee (St. Peter-Ording)	23.06.96	T
P5	Nordsee (Sylt/Kampen)	15.11.96	T
P6	-	-	T
P7	Nordsee (Pellworm)	-	-
P8	Nordsee (St. Peter-Ording)	22.04.1997	G
P9	Nordsee (St. Peter-Ording)	17.06.1997	B
P10	(Ulvesbüll/Vorland)	21.06.1997	G
P11	Nordsee (Sylt/Rantum)	06.07.1997	G
P12	Nordsee (Friedrichskoog)	20.07.1997	G
P13	Nordsee (Sylt/Hörnum)	26.07.1997	G
P14	Nordsee (Amrum/Nebel)	18.08.1997	T
P15	Nordsee (Amrum/Nebel)	30.08.1997	T
P16	Nordsee (Wenningstedt)	30.09.1997	G
P17	Nordsee (Amrum)	17.10.1997	G
P18	Nordsee (Lorenzenplate)	21.10.1997	SF/lebend
P19	Nordsee (Sylt/Hörnum)	09.11.1997	G
P20	-	-	T
P21	Nordsee (Sylt/List)	06.01.1998	G
P22	Nordsee (Sylt/Hörnum)	10.01.1998	G
P23	Nordsee (Sylt/Hörnum)	14.01.1998	T
P24	Nordsee (Biol. Anst. Helgoland)	02.02.1998	SA
P25	Nordsee (Pellworm)	16.02.1998	T
P26	Nordsee (Amrum)	15.03.1998	T
P27	Nordsee (Helgoland)	20.03.1998	G
P28	Nordsee (Pellworm)	15.06.1998	G
P29	Nordsee (Friedrichskoog)	17.06.1998	G
P30	Nordsee (Helgoland Nordstrand)	17.06.1998	G
P31	Nordsee (Oland)	23.06.1998	G
P32	Nordsee (St. Peter-Ording)	23.06.1998	G
P33	Nordsee (Sylt/Hörnum)	25.06.1998	T
P34	Nordsee (Sylt/Rantum)	12.07.1998	G
P35	Nordsee (Sylt/List)	14.07.1998	G
P36	Nordsee (Sylt/Hörnum)	17.07.1998	T
P37	Nordsee (Helgoland)	22.07.1998	T
P38	Nordsee (Sylt/List)	03.08.1998	G
P39	Seehundstation Friedrichskoog	-	lebend

SA = Seehundanlage; SF = Seehundfangaktion; B = Beifang;  
G = getötet; T = Totfund; - = keine Angaben vorhanden

Tab. 3: Funddaten zu den untersuchten Kegelrobben (*Halichoerus grypus*)

<b>Tierschlüssel</b>	<b>Fundort</b>	<b>Funddatum</b>	<b>Fundart</b>
H1	Nordsee (St. Peter-Ording)	14.03.1998	G
H2	Ostsee (Kleiner Haft)	25.05.1998	B
H3	Ostsee (Rügen/Vitt)	01.08.1998	T
H4	Seehundstation Friedrichskoog	-	lebend

B = Beifang; G = getötet; T = Totfund; - = keine Angaben vorhanden

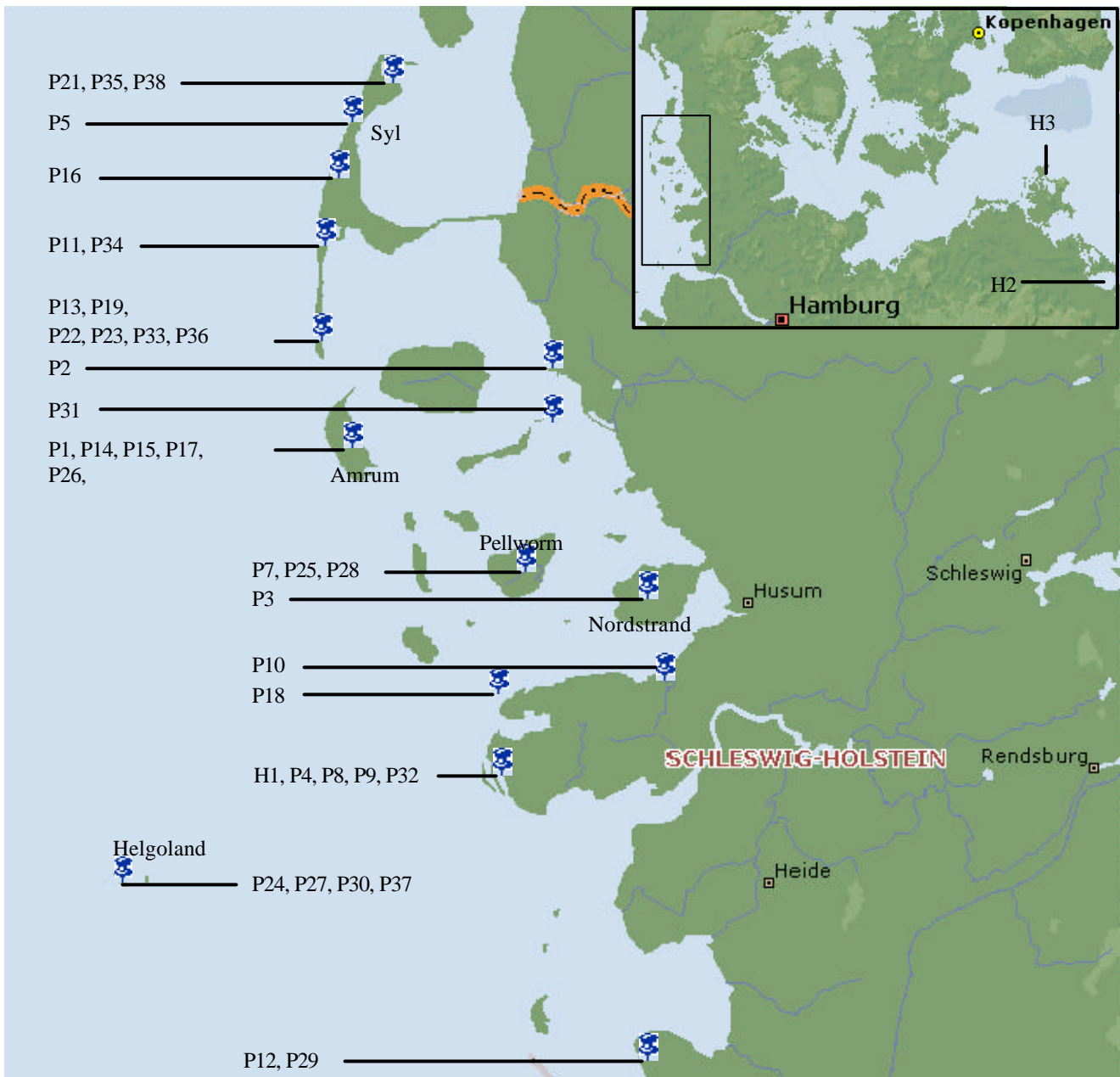


Abb. 8: Fundorte der Seehunde (P1-P5, P7-P19, P21-P38) und Kegelrobben (H1-H3)

### **3.2 Obduktion der Seehunde und Kegelrobben**

Aus organisatorischen Gründen diente das Strandungsnetz in Schleswig-Holstein, das der Registrierung und Bergung aller marinen Säugetiere dient, als Zwischenlager der meisten obduzierten Tiere. Die an den Küsten aufgefundenen Seehunde und Kegelrobben wurden von den zuständigen Seehundjägern in Gefriertruhen der Sammelstellen des Strandungsnetzes zwischengelagert und von dort zum Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel in Büsum transportiert. Unter der Leitung von Frau Dr. U. Siebert erfolgte dort die Obduktion der Tiere. Die Obduktion fand nach den Standardmethoden des Institutes statt, welche eine für Robben modifizierte Sektionstechnik ist, die auf der Basis der Empfehlungen der European Cetacean Society (ECS) (KUIKEN und HARTMANN, 1993) zur Sektion von Kleinwalen beruhte.

Einige Angaben zu den seziierten Seehunden bzw. Kegelrobben sind den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen.

Tab. 4: Einige Angaben zu den seziierten Seehunden (*Phoca vitulina*)

Tier-schlüssel	Alter	Geschlecht	Standard-länge in cm	Gewicht in kg	Speck-dicke in mm	Verwesungs-grad	Lagerung
P1	< 1 Jahr	w	89	16	16	-	gefroren*
P2	< 1 Jahr	m	78,5	8,2	-	-	-
P3	< 1 Jahr	m	77	8,2	-	3	-
P4	< 1 Jahr	m	80,5	9,2	-	-	-
P5	< 1 Jahr	m	96,5	17	15	3	-
P6	< 1 Jahr	w	81	9	-	-	-
P7	< 1 Jahr	m	94,5	20,2	-	3	-
P8	ca.1 Jahr	m	95	16,4	11	3	gefroren
P9	ca.1 Jahr	w	-	-	-	-	gefroren
P10	< 1 Jahr	m	82	7,2	2	3	gefroren
P11	< 1 Jahr	m	82	12,8	11	3	gefroren
P12	< 1 Jahr	m	83,5	9,4	7	-	gefroren
P13	< 1 Jahr	m	84	10,2	4	3	gefroren
P14	ca.1 Jahr	w	114	-	21	5	gefroren
P15	ca.1 Jahr	w	-	-	-	5	gefroren
P16	< 1 Jahr	m	-	13,4	7	3	gefroren
P17	< 1 Jahr	w	89	13,6	8	2	gefroren
P18	-	-	-	-	-	-	-
P19	< 1 Jahr	m	96	40,6	7	3	gefroren
P20	> 1 Jahr	w	121	39,8	28	3	gefroren
P21	ca.1 Jahr	m	94	16,6	14	2	gefroren
P22	ca.1 Jahr	m	96,5	21	27	2	gefroren
P23	> 1 Jahr	w	150	94,1	44	4	gefroren
P24	> 1 Jahr	w	96	15,2	20	3	gefroren
P25	> 1 Jahr	m	153	81	34	3	frisch**
P26	ca.1 Jahr	m	101	17,5	11	3	gefroren
P27	ca.1 Jahr	m	-	22,4	18	2	gefroren
P28	< 1 Jahr	w	78	7	-	2	gefroren
P29	< 1 Jahr	w	80	8,8	-	2	gefroren
P30	ca.1 Jahr	w	97	14,6	12	2	gefroren
P31	< 1 Jahr	w	76,5	8,2	-	2	gefroren
P32	< 1 Jahr	w	87	13,4	-	2	gefroren
P33	> 1 Jahr	m	108	22,7	15	3	gefroren
P34	< 1 Jahr	w	88	9,8	-	2	gefroren
P35	< 1 Jahr	m	84	9,6	-	2	gefroren
P36	< 1 Jahr	w	78	7,8	-	2	gefroren
P37	> 1 Jahr	m	121	36,8	21	4	gefroren
P38	< 1 Jahr	m	86	12,6	-	1	frisch
P39	< 1 Jahr	-	-	-	-	-	-

m = männlich; w = weiblich; 1 = sehr guter Erhaltungszustand; 2 = guter Erhaltungszustand; 3 = beginnende Verwesung; 4 = mittlere Verwesung; 5 = fortgeschrittene Verwesung/mumifiziert; \* = - 20° C; \*\* = > 0° C; - = keine Angaben vorhanden



Tab. 5: Einige Angaben zu den seziierten Kegelrobben (*Halichoerus grypus*)

Tier-schlüssel	Alter	Geschlecht	Standard-länge in cm	Gewicht in kg	Speck-dicke in mm	Verwesungs-grad	Lagerung
H1	ca.1 Jahr	m	-	21,2	5	2	gefroren*
H2	> 1 Jahr	m	185	175,4	30	3	gefroren
H3	> 1 Jahr	w	164	57	20	5	gefroren
H4	< 1 Jahr	m	-	-	-	-	-

m = männlich; w = weiblich; 2 = guter Erhaltungszustand; 3 = beginnende Verwesung; 5 = fortgeschrittene Verwesung/mumifiziert; \* = - 20° C; \*\* = > 0° C; - = keine Angaben vorhanden

### 3.3 Probengewinnung

Im Rahmen der Obduktion wurden Proben sowohl zur histopathologischen als auch zur bakteriologischen Untersuchung zur Abklärung der Todesursache bzw. bei erkrankt aufgefundenen und getöteten Tieren zur Abklärung der Erkrankungsursache genommen.

#### 3.3.1 Histopathologische Untersuchungen

Die Proben für die histopathologischen Untersuchungen wurden aus After, Auge, Darm, Fettgewebe, Gelenk, Haut, Leber, Lunge, Maul, Milz und Niere entnommen und zunächst in einer 4% igen Formaldehydlösung für mehrere Tage eingelegt. Danach konnten in Abhängigkeit vom Vorhandensein pathologisch-anatomischer Veränderungen aus den Geweben und Organen Gewebeblöcke herausgeschnitten und in Plastikkapseln zur weiteren Bearbeitung in Paraffin fixiert werden.

Die weiteren Untersuchungen erfolgten im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen. Hierzu wurden die Plastikkapseln mit den enthaltenen Gewebelöcken in einem Einbettautomaten (Miles Scientific, Naperville, Irland) während eines 16-Stundenzyklus über die aufsteigende Alkoholreihe (50% Ethanol, 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Isopropanol) bei 45°C mit dem Xylol-Ersatzmittel Roti®-Histol 6640 (Roth C., Karlsruhe) als Intermedium entwässert und anschließend in Rotiplast eingebettet. Für Hämatoxilin-Eosin-Färbungen (H.E.) und weitere erforderliche Spezialfärbungen mußten 4µm dicke Schnitte mit einem Rotationsmikrotom hergestellt werden, die dann entsprechend den Standardmethoden des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen angefertigt wurden. Bei den Färbungen handelte es sich um Elastica-van-Gieson-, von Kossa-, Grocott-, Ziehl-Neelsen-, PAS (Periodic-Acid-Schiff-Reaktion)- und Fettrot 7B-Färbungen.

Bei Lungengewebe erfolgte zusätzlich nach Einbettung in Paraffin eine immunhistologische Untersuchung auf Morbillivirus-Antigen nach der von MÜLLER et al. (2000) beschriebenen Methode.

In Tabelle 6 sind die pathologisch-anatomischen sowie histologischen Untersuchungsbefunde der seziierten Tiere dargestellt.

Tab. 6: Pathologisch-anatomische sowie histologische  
Untersuchungsbefunde der sezierten Seehunde (P) und  
Kegelrobben (H)

Tier- schlüssel	Befunde
P1	MDT leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; verminöse Bronchopneumonie; Schädel durch Einschuß zertrümmert
P2	MDT leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; geringgradige Leberverfettung
P3	mäßiger EZ; MDT mit schleimigem Inhalt; alveoläres Lungenemphysem; offener Nabel; 2 sandkorngroße Blasensteine
P4	mäßiger EZ; MDT mit schleimigem Inhalt; diffuses, alveoläres Lungenödem; Fettleber; stecknadelspitz- bis stecknadelkopfgröße Herde im Myocard
P5	MDT außer Parasiten leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; verminöse Bronchopneumonie; Lymphadenitis simplex des Pankreas; purulente Arthritis und Myositis des linken Knie- und Tarsalgelenkes
P6	MDT mit schleimigem Inhalt; Stauung innerer Organe; Hämatome im Brustbereich; 600 ml Blut in der Brusthöhle
P7	sehr guter EZ; MDT mit Fisch; Stauung innerer Organe
P8	MDT außer Parasiten leer; alveoläres Lungenemphysem; verminöse Bronchopneumonie
P9	MDT außer Parasiten leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; verminöse Bronchopneumonie; Strangulationsmarken durch Netz im Nacken; Haut im Nacken eröffnet
P10	MDT leer; diffuses alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; Einschuß im Kopf
P11	MDT außer Parasiten leer; alveoläres Lungenemphysem; verminöse Bronchopneumonie; pulpöse Milzhyperplasie; purulente Entzündung des linken Tarsalgelenks mit Ödem
P12	Schnittwunde in distaler Halsregion
P13	MDT mit blutigem Inhalt; diffuses, alveoläres Lungenödem; pfenniggroßes Loch in der linken Hinterextremität

MDT = Magen-Darm-Trakt; EvG = Elastica-van-Gieson Färbung;  
EZ = Ernährungszustand; - = keine Angaben vorhanden

Fortsetzung Tab. 6:

<b>Tier-schlüssel</b>	<b>Befunde</b>
P14	diffuses, alveoläres Lungenödem; multiple Hautläsionen auf Bauchseite; hochgradig purulente Arthritis der rechten Hintergliedmaße
P15	purulente Arthritis des linken Sprung- und Tarsalgelenks
P16	Polyarthritis der linken Extremität
P17	verminöse Bronchopneumonie
P18	keine Sektion (lebendes Tier)
P19	MDT außer Parasiten leer; verminöse Bronchopneumonie
P20	MDT mit Parasiten und gefüllt; diffuses, alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; verminöse Bronchopneumonie; Stauung der inneren Organe
P21	Lunge: mittelgradige granulomatöse, teils nekrotisierende Entzündung
P22	verminöse Bronchopneumonie, herdförmige, teils konfluierende granulomatöse, teils eitrige Entzündung mit zahlreichen Parasitenanschnitten (Nematoden) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien; purulente Polyarthritis der Hintergliedmaße
P23	Aspirationspneumonie
P24	diffuse Alopezie
P25	interstitielle Pneumonie, teils desquamativ mit intraalveolärer Infiltration von Makrophagen Lymphozyten und einzelnen neutrophilen Granulozyten, teils granulomatös mit vereinzelt Riesenzellen und Fibrose; Milz: Lymphozytendepletion
P26	schlechter EZ; MDT leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; verminöse Bronchopneumonie; Gastritis
P27	Kopfverletzung; Ulkus am Sternum Ø 14 cm
P28	schlechter EZ; linkes Auge mit Trübung der Cornea; Konjunktivitis
P29	Konjunktivitis
P30	mäßiger EZ; verminöse Bronchopneumonie; mittelgradige granulomatöse Entzündung mit zahlreichen intraalveolär gelegenen Parasitenanschnitten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien; multiple stecknadelkopfgröße Nierenzysten; Zungenrundabszeß

MDT = Magen-Darm-Trakt; EvG = Elastica-van-Gieson Färbung;  
 EZ = Ernährungszustand; - = keine Angaben vorhanden

Fortsetzung Tab. 6:

<b>Tier-schlüssel</b>	<b>Befunde</b>
P31	schlechter EZ; MDT leer; diffuses, alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; Nabel offen; Konjunktivitis
P32	alveoläres Lungenemphysem und -ödem
P33	mäßiger EZ, MDT außer Parasiten leer; alveoläres Lungenemphysem; verminöse Bronchopneumonie; Stauung innerer Organe; Alopezie um Augen, Bauch und Nabel
P34	MDT mit Algen gefüllt; diffuses alveoläres Lungenödem; alveoläres Lungenemphysem; Nabel offen; Konjunktivitis; linkes Auge mit Corneatrübung; gelbe, brüchige Leber
P35	mäßiger EZ; MDT gefüllt; diffuses, alveoläres Lungenödem; Nabel offen; stecknadelkopf- bis erbsengroße Abszesse im Nacken- und Flankenbereich
P36	schlechter EZ; Stauung innerer Organe; Nabel offen; 8 ml weißlich-rötliche Flüssigkeit in der Bauchhöhle
P37	mäßiger EZ; MDT gefüllt; Parasiten; diffuses alveoläres Lungenödem;
P38	MDT mit Parasiten und gefüllt; alveoläres Lungenemphysem; Stauung innerer Organe; purulente Konjunktivitis mit Ulkus der Cornea des rechten Auges
P39	keine Sektion (lebendes Tier)
H1	Ölflecken im Brustbereich; multiple Hautläsionen
H2	guter EZ; Lunge: hochgradiges akutes, diffuses, alveoläres Ödem; Milz: Stauung, mäßige Lymphozytendepletion; Schilddrüse: deutliche Fibrose des interstitiellen Bindegewebes, EvG: positiv; Nebenniere: geringgradige noduläre Hyperplasie, EvG: negativ; MDT mit Parasiten; geringgradige Fibrose der Lamina propria des Darmes; Magen: vereinzelte Parasitenanschnitte; Stauung innerer Organe; Hoden: zellreiches Keimepithel, keine Spermatozoen sichtbar;

MDT = Magen-Darm-Trakt; EvG = Elastica-van-Gieson Färbung;  
 EZ = Ernährungszustand; - = keine Angaben vorhanden

Fortsetzung Tab. 6:

Tier-schlüssel	Befunde
H3	schlechter EZ; Lunge: hochgradige granulomatöse Entzündung mit herdförmigen Verkalkungen und Parasitenanschnitten (Nematoden) in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, akutes, diffuses, alveoläres Ödem; Nebenniere: teils ausgeprägte Herdfibrose in Mark und Rinde, herdförmige Verkalkungen; Darm: vereinzelte Parasitenanschnitte (Nematoden); Magen: chronische ulzerative Entzündung mit Parasitenanschnitten (vermutlich Akantozephalen); Niere: herdförmige Verkalkung in Mark und Rinde; Uterus: Leiomyom mit zentraler Verkalkung und herdförmiger Fibrose
H4	keine Sektion (lebendes Tier)

MDT = Magen-Darm-Trakt; EvG = Elastica-van-Gieson Färbung;  
EZ = Ernährungszustand; - = keine Angaben vorhanden

### 3.3.2 Probennahme für die bakteriologischen Untersuchungen und Konservierung der Kulturen

Für die bakteriologischen Untersuchungen wurden während der Obduktionen Gewebe und Tupferproben und von den lebenden Tieren ausschließlich Tupferproben entnommen. Diese Proben wurden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Eine Kodierung bezüglich der Herkunft der Proben am Tier selbst erfolgte durch die Benennung der Organe mit einem Buchstabenschlüssel.

In Tabelle 7 sind das Organ sowie die entsprechende Buchstabenkodierung dargestellt.

Tab. 7: Buchstabenkodierung der Organe

<b>Organ/Probe</b>	<b>Buchstabenschlüssel</b>
After	A
Auge	B
Darm	C
Darmlymphknoten	D
Extremität	E
Fett	F
Gelenk	G
Haut	H
Leber	I
Lunge	J
Maul	K
Milz	L
Niere	M
Zunge	N

Die bakteriologische Untersuchung der eingefrorenen Organproben erfolgte zunächst durch Herrn Dr. R. Weiß am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Dazu wurden die aufgetauten Proben zunächst in 70%iges Propanol getaucht, abgeflammt, durchgeschnitten, die Schnittflächen auf Schafblutagarplatten ausgestrichen und diese für 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bebrütet.

Die Schafblutagarplatten setzten sich wie folgt zusammen:

Blutagarbasis (Merck, Darmstadt<sup>1</sup>)

Herzextrakt	10,0g
Tryptose	10,0g
NaCl	5,0g
Agar	15,0g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert:  $6,8 \pm 0,2$

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und anschließend für 15 min bei 120°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 5% aseptisch entnommenen, defibriniertem Schafblut.

Aus den 64 vorhandenen Organ- und Tupferproben wurden 72  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokkenkulturen isoliert. Die im Weiteren isolierten Bakteriengattungen und -spezies aus diesen Organen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

---

<sup>1</sup> Soweit nicht anders angegeben wurden Produkte der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.



Tab. 8: Herkunft der neben den  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken isolierten Mikroorganismen

Tier-schlüssel	Organ/Probe	Im weiteren isolierte Mikroorganismen
P1	J	keine
P2	L	unspezifische Keimflora
P3	I, L	<i>Escherichia coli</i> (I); <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp. (L)
P4	I, J, L, M	<i>E. coli</i> (I, J, L, M)
P5	I	unspezifische Keimflora
P6	C	<i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp.
P7	J	<i>Neisseria</i> spp., <i>E. coli</i> var. <i>hämolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
P8	J(Tupfer)	keine
P9	J	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>Erwinia</i> spp.
P10	J	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Neisseria</i> spp.
P11	G, J	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., <i>E. coli</i> var. <i>hämolytica</i> (G), keine (J)
P12	J	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken
P13	E	<i>Neisseria</i> spp.
P14	G(Tupfer)	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Staphylococcus epidermidis</i>
P15	G(Tupfer)	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.
P16	G(Tupfer), I, J	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken (G), keine (I, J)
P17	J(Tupfer)	unspezifische Begleitflora
P18	A	<i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., Coliforme, <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Morganella morganis</i>
P19	J	<i>Brucella</i> spp.
P20	I	<i>Arcanobacterium phocae</i>
P21	J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> (Tupfer)	unspezifische Begleitflora (J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> )
P22	I, J, L	keine (I, L); <i>A. phocae</i> (J)
P23	H	keine
P24	B(Tupfer)	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>Acinetobacter</i> spp.
P25	N(Tupfer)	keine
P26	J	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Brucella</i> spp.
P27	B, F, J, L	keine (B, F, L), <i>A. phocae</i> (J)
P28	B(Tupfer)	<i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp., Hefen, <i>Pseudomonas</i> spp.
P29	B(Tupfer)	$\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp., Hefen
P30	N	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp.

Fortsetzung Tabelle 8:

Tier-schlüssel	Organ/Probe	Im weiteren isolierte Mikroorganismen
P31	B(Tupfer)	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>E. coli</i> var. <i>haemolytica</i> , <i>S. epidermidis</i> , Hefen, <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
P32	I	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>
P33	J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub>	$\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> (J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> )
P34	I, J, M	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken (I, M), <i>Erwinia</i> spp. (J), <i>E. coli</i> var. <i>haemolytica</i> (I, J, M), <i>S. epidermidis</i> (J, M), <i>Acinetobacter</i> spp. (I, J), <i>E. rhusiopathiae</i> (J, M)
P35	I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , H	$\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken (I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> ), $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken (I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , H), <i>E. coli</i> (I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , H), <i>Bacillus</i> spp. (I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , H), <i>Erwinia</i> spp. (H), <i>E. coli</i> var. <i>haemolytica</i> (H)
P36	C	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Neisseria</i> spp.
P37	J	$\alpha$ - und $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>E. rhusiopathiae</i>
P38	B(Tupfer) I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub>	$\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken (I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> ), <i>E. coli</i> (B), <i>Erwinia</i> spp. (J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> ), <i>Neisseria</i> spp. (B), <i>E. coli</i> var. <i>haemolytica</i> (B), <i>S. epidermidis</i> (B, I, J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> ), <i>Pseudomonas</i> spp. (J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> )
P39	B (Tupfer)	keine
H1	J	<i>Brucella</i> spp., <i>A. phocae</i>
H2	D, I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , L, M, N	keine (N); $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> (D, I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , L, M), <i>E. coli</i> var. <i>haemolytica</i> (J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , L, M), <i>E. rhusiopathiae</i> (I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> ), <i>Bacillus</i> spp. (D, I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> )
H3	J	$\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken, <i>E. coli</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Serratia liquefaciens</i>
H4	K	keine

Ferner erfolgte die Benennung der isolierten  $\beta$ -hämolyisierenden Kulturen durch eine Kombination aus dem Tierschlüssel und dem entsprechenden Organ bzw. der Probe ( z.B. P4L).

Bis zur weiteren Untersuchung erfolgte die Konservierung der  $\beta$ -hämolisierenden Kulturen bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in Serumbouillon, die sich wie folgt zusammensetzte:

#### Serumbouillon

Pepton aus Fleisch	7,8g
Pepton aus Casein	7,8g
Hefeextrakt	2,8g
NaCl	5,6g
D-Glucose	1,0g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert:  $7,5 \pm 0,1$

Dieses Flüssigmedium wurde autoklaviert und nach Abkühlen und dem Zusatz von 10 % Rinderserum steril in Röhrchen abgefüllt.

Nach Anzüchtung der  $\beta$ -hämolisierenden Bakterien in Reinkulturen auf Blutagarplatten erfolgte eine Überschichtung der Bakterien mit jeweils 3 ml Serumbouillon. Anschließend wurden die Kolonien mit einem sterilen Glasspatel abgeschwemmt, abpipettiert und in sterilen 1,8 ml-Cryo-Tubes™ (Nunc, Wiesbaden) bei  $-25^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Weitere in die Untersuchungen miteinbezogene Kulturen waren die  $\beta$ -hämolisierende *Staphylococcus aureus*-Kultur (Stamm Pertsch) und die *S. aureus*-Kultur Cowan I. Als Vergleichsstämme wurden die *Streptococcus phocae*-Referenzkulturen 8399 H1 (NCTC 12719 ) und 8190 R2, freundlicherweise von H. Stenwig (Central Veterinary Laboratory, State Veterinary Laboratories of Norway, Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt, herangezogen. Als L-Streptokokkenreferenzkultur diente die Kultur ATCC 9932 (MS 210). Im Weiteren wurden die Kulturen, *S. canis* G2176, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 50, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar G 22, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L 2074, *S. equi* subsp. *equi* 66,

*S. equi* subsp. *equi* 69, *S. equi* subsp. *equi* CF32, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 68, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60, *S. parauberis* NCDO 2020, *S. parauberis* M33, *S. porcinus* E ATCC 12390, *S. porcinus* P 9824, *S. porcinus* U 1790, *S. porcinus* V 63940, *S. pyogenes* 282, *S. suis* SS1 S 428/1968, *S. suis* SS2 R 735/1986, *S. uberis* NCDO 2022 und *S. uberis* NCDO 2038 in die Untersuchungen miteinbezogen sowie die drei von SWENSHON (1997) untersuchten L-Streptokokkenkulturen, isoliert von Schweinswal P (Leber 18865), Schweinswal C (Lunge 17408) und Schweinswal H (Lunge 18263). Die Kulturen konnten der Stammsammlung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität, Gießen entnommen werden.

Zur Untersuchung des Vorkommens spezifischer Typenantigene fanden die B-Streptokokkentypenantigenreferenzkulturen 090 (Ia), H36B (Ib), 18RS21 (II), 6313 (III), 3139 (IV), SS1169 (V), NT6 (VI), 7271 (VII), JM9 (VIII), Compton 24/60 (X), Compton 25/60 (R), 335 (c $\alpha$ ), 70339 (c $\beta$ ) und BS 30 (Rib) Anwendung. Diese Kulturen wurden ebenfalls der Stammsammlung des Instituts entnommen.

### **3.4 Bakteriologische Untersuchungen**

#### **3.4.1 Anzüchtungsmedien und Kultivierung**

Für die Kultivierung der Bakterienkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, Schafblutagarplatten (3.3.2) verwendet.

Die Inkubation der beimpften Nährmedien erfolgte für 48 h bei 37° C unter mikroaerophilen Bedingungen im Kerzentopf.

Zur Anzüchtung der Bakterienkulturen in Flüssigmedium stand Todd-Hewitt-Bouillon (THB) (Diagnostics Pasteur, Marnes-La Coquette, Frankreich) zur

Verfügung, die zuvor nach den Angaben des Herstellers gefertigt, in 100 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und autoklaviert worden war.

Das Flüssigmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Todd-Hewitt-Bouillon (THB)

Casein	20,0g
Fleischaufguß vom Rind	10,0g
NaHCO <sub>3</sub>	2,0g
NaCl	2,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,4g
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Glucose)	2,0g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert: 7,8

Nach dem Beimpfen der Nährmedien wurden diese für 48 h bei 37 °C im Kerzentopf inkubiert.

Zur Rekultivierung der bei -25 °C eingefrorenen Bakteriensuspensionen (3.3.2) wurden diese zunächst aufgetaut und einige Tropfen auf eine Schafblutagarplatte mit einem sterilen Spatel ausgestrichen. Im Anschluss daran erfolgte eine Bebrütung der Platten für 48 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank.

### **3.4.2 Identifizierung**

#### **3.4.2.1 Koloniemorphologie, Gramfärbung, Katalasereaktion und Nachweis der CAMP-Reaktion**

Zur vorläufigen Einordnung der Kulturen wurde, entsprechend den Angaben von FACKLAM und WASHINGTON (1991), die Morphologie der nach 3.4.1 auf Festmedium angezüchteten Kolonien bewertet.

Im Weiteren konnten, nach LÄMMLER und HAHN (1994), die Gramfärbung, die Katalasereaktion sowie die Hämolyseform auf Blutagarplatten zur Differenzierung der Kulturen herangezogen werden.

Zum Nachweis der Hämolyse wurden die Kulturen im unterbrochenen Ausstrichverfahren auf Blutagarplatten angezüchtet und die Hämolyse anschließend beurteilt.

Die Kriterien zur Bewertung der Hämolyseform waren wie folgt:

$\alpha$ -Hämolyse: Die Kolonien waren von einer Zone unvollständiger Hämolyse mit grünen oder schwarzgrünen Höfen umgeben. Die Erythrozyten waren erhalten oder unvollständig gelöst.

$\beta$ -Hämolyse: Die Kolonien waren von einer Zone vollständiger Hämolyse (Aufklärung) umgeben. Es war eine vollständige durchsichtige Hofzone zu erkennen, in der die Erythrozyten vollständig aufgelöst waren.

$\gamma$ -Hämolyse: Der Nährboden um die Kolonien war auch in unmittelbarer Umgebung unverändert. Es war keine Lyse der Erythrozyten vorhanden.

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte mit 5-10 Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkultur, die in ca. 50 µl einer 3 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung verrieben wurde. Das Auftreten einer deutlichen Bläschenbildung wurde als positive Reaktion gewertet (BRÜCKLER et al., 1994). Im negativen Fall zeigte sich eine Trübung der Lösung ohne Bläschenbildung.

Der CAMP-Test (CHRISTIE et al., 1944) beruht auf einer thermolabilen Substanz, die von CAMP-positiven Streptokokken gebildet wird und die in Anwesenheit des Staphylokokken-β-Hämolytins Schaf- und Rindererythrozyten vollständig lysiert. Hierzu wurde eine β-hämolytische *S. aureus* Kultur (Referenzstamm Pertsch) auf einer Schafblutagarplatte (3.4) strichförmig ausgestrichen und im 90° Winkel dazu, auch strichförmig, bis ca. 3-5 mm an den Staphylokokkenimpfstrich heranreichend, die zu untersuchende Kultur. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C zeigte sich eine positive CAMP-Reaktion durch eine halbmondförmige Zone vollständiger Lyse im Bereich der unvollständigen Staphylokokken β-Hämolyse.

### **3.4.2.2 Serologische Gruppenbestimmung**

#### **3.4.2.2.1 Extraktion der Gruppenpolysaccharidantigene**

Die Extraktion der Gruppenantigene der untersuchten Kulturen erfolgte nach dem von RANTZ und RANDALL (1955) beschriebenen Verfahren durch Autoklavieren.

Dazu wurden die nach 3.4.1 in Flüssigmedium angezüchteten Kulturen für 10 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugiert (Typ RC-2B Fa. Sorvall, Newton, Connecticut, U.S.A.), der Überstand verworfen, das Bakteriensediment in 0,5 ml einer NaCl-Lösung (0,14 M) resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 ml NaOH-Lösung (1 mol/l) sowie 0,05%igem Phenolrot als Indikator neutralisiert.

Anschließend erfolgte das Autoklavieren der Suspension für 20 min bei 120 °C sowie ein erneutes Zentrifugieren für 5 min bei 13 000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde zum Nachweis der gruppenspezifischen Antigene verwendet.

#### **3.4.2.2.2 Nachweis der Gruppenpolysaccharidantigene**

Der Nachweis der Gruppenpolysaccharidantigene erfolgte mit spezifischen Antiseren durch Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (1949).

Zur Präparation des Gels wurden 0,4 g Agarose (Standard EEO; Serva, Heidelberg), 1,2 g Polyethylenglykol (PEG Typ 6 000; Serva) und 0,02 g Na-Azid in 20 ml PBS ( 8 g NaCl (0,14mol/l), 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( pH 7,5) ) und 20 ml Aqua dest. durch Erhitzen gelöst. Nach Auftragen von 20 ml Agarose-Lösung auf einer Schiene mit sechs geschliffenen Objektträgern konnten nach dem Erstarren der Agarose mit Hilfe einer Gelstanze (LKB-Typ 6808 A, Stockholm, Schweden) ein Zentralloch und vier Marginallöcher ausgestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben werden. Die im Durchmesser 2,5 mm großen Marginallöcher wurden mit 5 µl der nach 3.4.2.2.1 gewonnenen Antigene, das Zentralloch mit jeweils 10 µl der gruppenspezifischen Antiseren A, B, C, E, G, L, P, U oder V (freundlicherweise von Prof. Dr. Ch. Lämmler, Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität, Gießen zur Verfügung gestellt) gefüllt. Die Beurteilung der Diffusionsreaktion erfolgte nach 24 und 48 h Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer und zeigte sich im positiven Fall durch Präzipitationsbanden zwischen dem Zentralloch und dem entsprechenden Marginalloch.



### 3.4.2.2.3 Staphylokokken – Koagglutination

Der Nachweis der Gruppenpolysaccharidantigene C und L erfolgte vergleichend mit der von CHRISTENSEN et al. (1973) beschriebenen Methode der Staphylokokken-Koagglutination. Dabei reagierte das entsprechende Streptokokkenzellwandantigen mit dem spezifischen Antikörper, der auf der Zelloberfläche von *S. aureus* Cowan I an Protein A gebunden war.

Dazu wurde zunächst die Bakterienkultur *S. aureus* Cowan I in 50 ml THB für 18 – 24 h bei 37 °C auf einem Rundschtüttler angezchtet, für 10 min bei 10 000 U/min abzentrifugiert, zweimal mit 5 ml NaCl-Lösung (0,14 mol/l) gewaschen, in 2 ml NaCl-Lösung (0,14 mol/l) resuspendiert und bei 56 °C für 1 h im Wasserbad inaktiviert. Nach Zugabe von 100 µl Antiserum C bzw. 50 µl Antiserum L zu 300 µl dieser Cowan I – Staphylokokkensuspension erfolgte eine Inkubation für 1-2 h bei Raumtemperatur unter rotierendem Schwenken (Celloshaker Variospeed, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen ). Anschließend wurde das durch 5 min. Zentrifugation bei 13 000 U/min gewonnene Pellet zweimal mit 500 µl Tris-HCl-Puffer (24,2 g Tris/l mit 37%iger HCl auf pH 7,4 eingestellt) und 0,1% Triton gewaschen und dann in 500 µl des Waschpuffers aufgeschwemmt. Durch Mischen von 10 µl der mit den Antikörpern beladenen Staphylokokkensuspension und 10 µl der nach 3.4.2.2.1 gewonnenen Antigene auf einem Objektträger durch rotierendes Schwenken zeigte sich eine positive Reaktion innerhalb von 2 min als deutliche Agglutination.

### 3.4.2.2.4 Streptokokken – Identifizierungstest

Der Nachweis des Gruppenpolysaccharidantigens der serologischen Gruppe F wurde mit Hilfe eines kommerziellen Testsystems (Streptokokken-Identifizierungstest; Oxoid, Wesel) vorgenommen.

Die enzymatische Extraktion des gruppenspezifischen Antigens der zu untersuchenden Kulturen erfolgte durch Vermischen von 2-5 Kolonien mit 0,2 ml der dem Testsystem beigefügten Extraktionslösung sowie einer anschließenden Inkubation für 5 min bei 37°C. Nach kurzem Schütteln und einer weiteren Inkubation für 5 min bei 37°C wurden 20 µl dieser Lösung mit 20 µl der zuvor auf Raumtemperatur erwärmten Latexsuspension F auf einem Objektträger unter rotierendem Schwenken vermischt.

Eine positive Reaktion zeigte sich nach 30 – 60 s durch die Agglutination der mit dem gruppenspezifischen Antikörpern sensibilisierten Latexpartikel.

### **3.4.2.3 Biochemische Eigenschaften**

#### **3.4.2.3.1 Nachweis des Kohlenhydratmetabolismus mittels api 50 CH**

Der Nachweis der biochemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Kulturen erfolgte zunächst durch ein kommerzielles Identifizierungssystem (api 50 CH; bioMérieux, Laupheim). Es handelte sich hierbei um fünf Streifen mit jeweils zehn Mikroröhrchen, die eine definierte Menge dehydratisiertes Substrat, Kohlenhydrate oder Derivate (Heteroside, Polyalkohole und Uronsäuren) enthielten. Diese waren im einzelnen: Glycerol (GLY), Erythrit (ERY), D-Arabinose (DARA), L-Arabinose (LARA), Ribose (RIB), D-Xylose (DXYL), L-Xylose (LXYL), Adonit (ADO),  $\beta$ -Methyl-D-Xylosid (MDX), Galactose (GAL), Glucose (GLU), Fructose (FRU), Mannose (MNE), Sorbose (SBE), Rhamnose (RHA), Dulcit (DUL), Inosit (INO), Mannit (MAN), Sorbit (SOR),  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid (MDM),  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosid (MDG), N-Acetyl-Glucosamin (NAG), Amygdalin (AMY), Arbutin (ARB), Äskulin (ESC), Salicin (SAL), Zellobiose (CELI), Maltose (MAL), Lactose (LAC), Melibiose (MEL), Saccharose (SAC), Trehalose (TRE), Inulin (INU), Melezitose (MLZ), Raffinose

(RAF), Stärke (AMD), Glycogen (GLG), Xylit (XLT), Gentibiose (GEN), D-Turanose (DTUR), D-Lyxose (DLYX), D-Tagatose (DTAG), D-Fucose (DFUC), L-Fucose (LFUC), D-Arabit (DARL), L-Arabit (LARL), Gluconat (GNT), 2-Keto-Gluconat (2KG) und 5-Keto-Gluconat (5KG).

Die Beimpfung der Mikrokammern erfolgte nach den Angaben des Herstellers bis zur Hälfte mit einer Suspension, bestehend aus api 50 CHL Medium (bioMerieux) und den nach 3.4.1 auf Festmedium angezüchteten Kulturen. Danach wurden die Kammern mit einigen Tropfen sterilem Paraffinöl überschichtet und in einer feuchten Kammer im Kerzentopf bei 37 °C bebrütet. Die Beurteilung erfolgte nach 4, 24, 48 und 72 h sowie nach 7 d. Eine positive Reaktion, bedingt durch die beim Substratabbau entstehende Säurebildung, zeigte sich durch die Gelbfärbung des ansonsten blauen Mediums. Die hydrolytische Spaltung von Äskulin zeigte sich durch eine Schwarzfärbung des blauen Mediums.

#### **3.4.2.3.2 Weitere Nachweise der biochemischen Eigenschaften**

Vergleichend zu dem unter 3.4.2.3.1 durchgeführten Testsystem konnte der Abbau einiger Kohlenhydrate auch in Bouillonröhrchen unter Zusatz des entsprechenden Zuckers geprüft werden.

Hierzu wurden 5 ml Phenolrot-Bouillon mit den Zuckern Fructose, Lactose, D-Mannose, Ribose, Salicin, Sorbit bzw. Trehalose in einer Endkonzentration von 1 % versetzt, zunächst autoklaviert, dann mit den zu untersuchenden Kulturen beimpft und bei 37 °C im Kerzentopf bebrütet. Nach einer Inkubation von 24, 48 und 72 h erfolgte die Bewertung. Eine positive Reaktion wurde durch einen Farbumschlag des ursprünglich roten Mediums in eine deutlich gelbe Farbe angezeigt.

#### **3.4.2.3.3 Hydrolyse von Äskulin**

Die hydrolytische Spaltung des Glykosids Äskulin in Äskuletin und Glucose erfolgte vergleichend zu dem unter 3.4.2.3.1 beschriebenen Nachweis. Hierzu fanden Röhren mit 5 ml Brain–Heart–Infusion (BHI) (Gibco, Eggenstein) unter Zusatz von 0,1 % Äskulin und 0,05 % Eisen–(III)–Citrat Verwendung. Nach einer Inkubation von 24 bis 72 h bei 37 °C im Kerzentopf zeigte sich eine positive Reaktion durch deutliche Schwarzfärbung der zuvor gelblich–braunen Bouillon.

#### **3.4.2.3.4 Hydrolyse von Na-Hippurat**

Der Nachweis der hydrolytischen Spaltung von Na–Hippurat erfolgte nach den Angaben von HWANG und EDERER (1975). Hierzu wurden einige Kolonien der zu untersuchenden Kultur in 0,4 ml einer wässrigen 1 %igen Na–Hippurat–Lösung suspendiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 3,5 %igen Ninhydrinlösung erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die positive Reaktion zeigte sich in einer blauviolettten Färbung des zuvor klaren Mediums.

#### **3.4.2.3.5 Spaltung von Arginin**

Zum Nachweis der Argininspaltung kam ein kommerzielles Testsystem (Arginine Dihydrolase; Rosco, Taastrup, Dänemark) zur Anwendung. Hierzu wurden einige Kolonien der nach 3.4.1 auf Festmedium angezüchteten Bakterien in 0,25 ml einer 0,14 mol/l NaCl–Lösung entsprechend McFarland

Standard Nr. 2 suspendiert. Nach Zugabe des in Tablettenform vorliegenden Reagenz und der Überschichtung des Reaktionsansatzes mit drei Tropfen sterilem Paraffinöl erfolgte die Reaktionsbeurteilung nach einer Inkubationszeit von 4, 24, 48 und 72 h bei 37 °C.

Im positiven Fall kam es hierbei zunächst zum Abbau von L-Arginin in L-Citrullin, welches dann wiederum in L-Ornithin, CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> gespalten wurde. Die hierdurch bedingte Alkalisierung des ursprünglich gelben Mediums führte zum Farbumschlag des Indikators nach rot.

#### **3.4.2.4 Lektin – Agglutinationstest**

Dazu erfolgte die Anzucht der Bakterien in Röhren mit 10 ml THB (3.4.1). Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 5 000 U/min und 4 °C wurde das Pellet mit 2 ml PBS, das der Herstellung unter 3.4.2.2.2 entsprach, gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 20 - 40 µl Trypsinlösung (1 mg Trypsin / ml PBS) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dies diente der Vermeidung von unspezifischen Agglutinationsreaktionen durch Proteinstrukturen der Bakterienoberfläche.

Anschließend konnten 20 µl dieser zu testenden Bakteriensuspension auf einem Objektträger mit 20 µl Lektinlösung (0,5 mg Lektin/ml PBS) homogen vermischt werden. Die verwendeten Lektine stammten von *Arachis hypogaea* (Sigma, Deisenhofen) und *Dolichos biflorus* (Sigma). Die Beurteilung erfolgte unter rotierendem Schwenken bei indirekter Beleuchtung über einem Lichtkasten, wobei sich eine positive Reaktion in einer deutlichen Agglutination innerhalb von 2–3 min zeigte. Die parallel dazu angesetzte Bakteriensuspension, vermischt mit 20 µl PBS ohne Lektin, diente als Kontrolle, um eine Selbstagglutination der Bakterien auszuschließen.

### **3.4.2.5 Nachweis von Typenantigenen**

Zum Nachweis spezifischer Typenantigene konnten die unter 3.3.2 beschriebenen Typenantigenreferenzkulturen eingesetzt werden. Die monospezifischen B-Streptokokken-Antiseren, hergestellt im Kaninchen, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ch. Lämmler, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität, Gießen, zur Verfügung gestellt.

#### **3.4.2.5.1 Extraktion der Typenantigene**

Die Extraktion der Typenantigene erfolgte nach dem von LANCEFIELD (1933) beschriebenen und von JELINKOVA (1977) modifizierten Verfahren. Die nach 3.4.1 in Flüssigmedium angezüchteten Kulturen wurden zentrifugiert (10 min, 10 000 U/min, 4 °C), mit 5 ml NaCl-Lösung (0,14 mol/l) gewaschen, in 350 µl HCl (0,2 mol/l) resuspendiert und für 2 h bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Neutralisierung erfolgte die Zugabe von zwei bis drei Tropfen einer NaOH-Lösung (1 mol/l), wobei Phenolrot als Indikator diente. Nach abschließender Zentrifugation (5 min, 13 000 U/min, 4 °C) konnten die im Überstand enthaltenen Typenantigene in die Untersuchung eingesetzt werden.

#### **3.4.2.5.2 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony**

Der Nachweis der Typenantigene erfolgte nach dem unter 3.4.2.2.2 beschriebenen Nachweis der Gruppenantigene durch Doppelimmundiffusion

nach Ouchterlony. Abweichend zu 3.4.2.2.2 wurden die Zentrallöcher mit den monospezifischen Typenantisera und die Marginallöcher mit den nach 3.4.2.5.1 hergestellten Antigenen der zu typisierenden Kulturen gefüllt.

### **3.4.2.6 Speziesidentifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **3.4.2.6.1 Präparation der bakteriellen DNA**

Zur Präparation der DNA kam die von FRÉNEY et al. (1996) für Staphylokokken beschriebene Methode in modifizierter Form zur Anwendung. Zunächst wurden die Kulturen nach 3.4.1 auf Festmedium angezüchtet. Nach Suspension einiger Kolonien in 100 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0) unter Zugabe von 5 µl Mutanolysin (10 U/µl; Sigma) zum Aufschluss der Zellwand erfolgte ein gründliches Vermischen der Suspension und eine anschließende Inkubation für 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Zur Deproteinisierung wurden 10 µl Proteinase K (Endkonzentration 0,5 µg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben, erneut gründlich gemischt, für 2 h bei 56 °C und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (30 s bei 13 000 U/min) und Abkühlung konnte die DNA bis zur Anwendung bei – 15 °C aufbewahrt bzw. als „Template“ in die PCR eingesetzt werden.

### 3.4.2.6.2 Reaktionsansatz der PCR

Zur Durchführung der PCR erfolgte zunächst der Ansatz eines Reaktionsgemisches ("Master-Mix") nach folgendem Verhältnis:

19,9 µl	Aqua bidest.
3,0 µl	Inkubationspuffer (10x Puffer; Promega, Mannheim)
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l; Promega)
0,6 µl	dNTP (10 mmol/l; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
1,0 µl	Primer I (10 pmol/µl; MWG-Biotech, Ebersberg)
1,0 µl	Primer II (10 pmol/µl; MWG-Biotech)
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl; Promega)

Nach sorgfältigem Mischen konnten 27,5 µl des Mastermixansatzes in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) pipettiert und nach Zugabe von 2,5 µl der nach 3.4.2.6.1 präparierten DNA im Thermocycler (Progene, *thermo-DUX*, Wertheim) ein Temperaturprogramm durchlaufen.

### 3.4.2.6.3 Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

#### 3.4.2.6.3.1 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

Mit dem von HUTSON et al., (1993) beschriebenen universellen Oligonukleotidprimern pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' und pH 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' und dem unter 3.4.2.6.2 hergestellten Reaktionsgemisch konnte das 16S rRNA-Gen der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 (NCTC 12719) amplifiziert werden. Die Ansatzstelle des



Oligonukleotidprimers pA entsprach der Position 8 bis 27 und die des Oligonukleotidprimers pH der Position 1541 bis 1522 der *E. coli*-Nummerierung. Das Temperaturprogramm des Thermocyclers, das den Angaben von BENTLEY und LEIGH (1995) entsprach, umfasste einen initialen Denaturierungsschritt für 4 min bei 94° C und anschließend 35 Zyklen, die einen Denaturierungsschritt für 1,5 min bei 94° C, einen Schritt zur Primeranlagerung für 1,5 min bei 58° C und einen Polymerisierungsschritt für 1,5 min bei 72° C umfassten. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloß sich ein weiterer Zyklus für 4 min bei 72° C an. Die Proben wurden anschließend bei 4° C im Thermocycler bis zur Entnahme aufbewahrt.

#### **3.4.2.6.3.2 Sequenzierung des 16S rRNA-Gens**

Die DNA-Sequenzanalyse des unter 3.4.2.6.3.1 erhaltenen Amplikons wurde mit freundlicher Unterstützung von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Chakraborty (Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen) nach der Di-desoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) durchgeführt.

Durch die in die Reaktion eingesetzten fluoreszierenden, farbmarkierten Di-Desoxynukleotide konnte die Erkennung und Bestimmung jedes Abbruchstrangs mit einem für die jeweilige endständige Base individuellen Farbstoff erfolgen. Auf diese Weise konnte die gesamte Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden und im Gel in einer Spur aufgetragen werden.

Vor der eigentlichen Sequenzierung war jedoch eine Reinigung der DNA durch eine Fällung und eine erneute Lösung der DNA in steriler Aqua bidest-Lösung notwendig. Die Fällung des Amplikons erfolgte mit Natriumacetat (0,3 mol/l) und Isopropanol, wobei Isopropanol in 0,5-facher Menge des Gesamtvolumens zugegeben wurde. Die durch Zentrifugation für 20 min bei 13 000 U/min

präzipitierte DNA wurde nach Entfernung des Überstandes mit einer Pasteurpipette mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und der Überstand nach erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 13 000 U/min verworfen. Anschließend erfolgte ein Trocknen der Präparation für 10 min unter Vakuum und die Lösung der DNA in sterilem Aqua bidest..

Die so gereinigte DNA konnte dann zur Sequenzanalyse eingesetzt werden.

#### **3.4.2.6.4 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens mit anschließendem Restriktionsverdau**

##### **3.4.2.6.4.1 Verwendete Oligonukleotidprimer und Temperaturprogramm**

Eine Amplifizierung des 16S rRNA-Gens erfolgte im Weiteren mit dem von BENTLEY und LEIGH (1995) beschriebenen 5'-Oligonukleotidprimer 5'-GAG AGT TTG ATC TGG CTC AGC A-3' und dem von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (2000) beschriebenen 3'-Oligonukleotidprimer 5'-CGG GTG TTA CAA ACT CTC GTG GT-3' unter Verwendung des unter 3.4.2.6.2 beschriebenen Reaktionsansatzes und dem unter 3.4.2.6.3.1 beschriebenen Temperaturprogramms.

##### **3.4.2.6.4.2 Restriktionsverdau**

Zum Erstellen von speziesspezifischen Restriktionsmustern und zum Nachweis von möglichen Genpolymorphismen des 16S rRNA-Gens erfolgte mit den unter 3.4.2.6.3.2 erhaltenen Sequenzdaten des *S. phocae*-Referenzstammes 8399 H1 (NCTC 12719) die Auswahl der Restriktionsenzyme. Die ausgewählten

Restriktionsenzyme wurden zur Überprüfung der Spezifität mit 16S rRNA-Sequenzen der Gendatenbank, insbesondere unter Einbeziehung von 33 weiteren V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies, verglichen und der Restriktionsverdau mit dem Programm Clon manager 4.1, Scientific Educational Software, Durham, USA simuliert. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den unter 3.4.2.6.4.1 erhaltenen Amplikons und den Endonukleasen *EcoRI* und *HincII* (BioLabs, Schwalbach/Taunus).

Der Restriktionsansatz mit dem Enzym *EcoRI* setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Produkt	30,0	µl
Enzym	4,0	µl
Puffer (10x) (Biolabs)	4,0	µl
Aqua bidest.	2,0	µl

Der Restriktionsverdau mit dem Enzym *HincII* wurde mit folgendem Restriktionsansatz durchgeführt:

PCR-Produkt	14,0	µl
Enzym	3,0	µl
Puffer (10x) (Biolabs)	4,0	µl
BSA (10x)	4,0	µl
Aqua bidest.	15,0	µl

Die Inkubation der Restriktionsansätze wurde für 2,5 h bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel (3.4.2.6.5.).

### **3.4.2.6.5 Nachweis der DNA-Amplifikate im Agarosegel**

#### **3.4.2.6.5.1 Agarosegelelektrophorese**

Der Nachweis der Amplifikate bzw. der Fragmente nach Restriktionsverdau erfolgte nach Auftrennung durch konventionelle Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose (Roth, Karlsruhe) in 100 ml 1x TAE-Puffer (40 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 1,14 mol/l Eisessig, pH 7,8) und 1 x TAE als Laufpuffer.

Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts bzw. der gesamte Restriktionsansatz mit 3 µl 5 x Probenpuffer (DNA BlueRun, AGS GmbH, Heidelberg, bestehend aus: 25 mmol/l Tris-HCl (pH 7,0), 150 mmol/l EDTA, 0,05% Bromthymolblau, 25% Glycerol) vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm im Horizontalgel. Als Längenstandard wurden 4 µl einer 100 bp-Ladder (Gibco) aufgetragen.

#### **3.4.2.6.5.2 Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation**

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte, zur Darstellung der DNA, eine Färbung des Agarosegels für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml, Sigma) wobei sich das Ethidiumbromid, ein fluoreszierender Farbstoff, als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA einlagerte. Durch Schwenken in Aqua dest. für 20 min bei Raumtemperatur konnte überschüssiger Farbstoff entfernt werden. Schließlich wurde das Gel unter UV-Beleuchtung mit Hilfe eines Gel-Videodokumentationssystems (Cybertech CS1 Video Copy Processor, Mitsubishi) fotografisch dokumentiert, wobei sich die Fragmente als helle Banden bei dunklem Hintergrund darstellten.

#### **3.4.2.6.6 PCR mit *S. phocae*-spezifischen Oligonukleotidprimern**

Zum Nachweis eines *S. phocae* speziesspezifischen Abschnittes der V2-Region des 16 S rRNA-Gens wurden mit den unter 3.4.2.6.3.2 erhaltene Sequenzdaten und dem Computerprogramm OLIGO Primer Analysis Software 4.0 (National Biosciences Inc., Plymouth, USA) Sequenzen für *S. phocae*-spezifische Oligonukleotidprimer ausgewählt. Diese Basensequenzen waren für den Oligonukleotidprimer PX 1: 5'-GCT AAT ACC GCA TAA GAA GAG-3' und für den Oligonukleotidprimer PX 2: 5'-CAC CCT GTC ACT TCT GCT C-3'. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die ausgewählten Primer mit Sequenzdaten der Gendatenbank verglichen. Abweichend zu dem unter 3.4.2.6.3.1 beschriebenen Temperaturprogramm lag die optimale „Annealing“-Temperatur bei 60 °C.

### **3.4.3 Weitere phänotypische Charakterisierung**

#### **3.4.3.1 Wachstum in Flüssigmedium**

Der Nachweis von Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium erfolgte nach MÜLLER (1968) durch Anzucht der Bakterien in 10 ml THB-Röhrchen (3.4.1). Nach 24 h, bzw. 48h bei 37° C im Kerzentopf konnte ein Wachstum unter gleichmäßiger Trübung der gesamten Bouillon als „trüb“ bzw. ein Wachstum unter Sedimentbildung bei klarem Überstand als „klar“, entsprechend den Angaben von WIBAWAN und LÄMMLER (1991), bewertet werden.

### 3.4.3.2 Wachstum in Soft-Agar

Die Überprüfung des Wachstumsverhaltens der Bakterien in Soft-Agar erfolgte nach den Angaben von YOSHIDA (1971). Hierbei wurden die nach 3.4.3.1 in Flüssigmedium angezüchteten Kulturen mit einer NaCl-Lösung (0,14 M) im Verhältnis 1: 1000 verdünnt, 0,1 ml davon in 10 ml Soft-Agar gegeben, sorgfältig vermischt und anschließend für 18 h bei 37 °C inkubiert.

Die Beurteilungen der Kolonienmorphologie in kompakt oder diffus wachsende Kulturen erfolgte nach den Angaben von YOSHIDA (1971) sowie WIBAWAN und LÄMMLER (1991).

### 3.4.3.3 Salz-Aggregationstest

Die Durchführung des Salzaggregationstests (SAT) erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von JOHNSON und WADSTRÖM (1984).

Hierbei wurden die nach 3.4.3.1 in 10 ml Flüssigmedium angezüchteten Bakterienkulturen für 10 min bei 2 500 U/min zentrifugiert, mit 2 ml Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (0,002 mmol/l) gewaschen und in 1 ml Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer resuspendiert. Auf einem Objektträger wurden jeweils 25 µl der Bakteriensuspension mit dem gleichen Volumen einer Ammoniumsulfatlösung ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in unterschiedlicher Molarität (0,1 , 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 , 1 , 1,2 , 1,4 , 1,6 , 1,8 , 2 , 2,2 , 2,4 mol/l) durch rotierendes Schwenken vermischt. Eine positive Reaktion zeigte sich nach 1 min Schwenken in Form einer deutlichen Aggregation der Bakterien. Zum Ausschluss einer Selbstaggregation erfolgte der Versuchsansatz zusätzlich mit dem gleichen Volumen Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer.

#### **3.4.3.4 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten**

Der Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeiten der Isolate erfolgte nach dem vom Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin) empfohlenen Verfahren (Stand VIII `92). Hierzu wurden vier bis fünf Kolonien, die nach 3.4.1 auf Festmedium angezüchteten Bakterien in 3 ml THB inokuliert und für 2 h bei 37 °C im Kerzentopf inkubiert. Nach Ausspatelung von 0,1 ml Bakteriensuspension auf Müller-Hinton-Agar (BBL, Becton Dickinson, Heidelberg) mit Zusatz von 5% defibriertem Schafblut und einer Trockenphase des Inokulums wurden die antibiotikahaltigen Testblättchen mit einer sterilen Pinzette aufgelegt.

Zur Anwendung kamen die in Tabelle 9 aufgeführten antibiotikahaltigen Testblättchen. Nach einer 30 min. Diffusionsphase bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Kerzentopf. Die Beurteilung nach 18 und 48 h aufgrund der Hemmhofgröße richtete sich nach den Angaben der Hersteller (Bayer, Leverkusen; Becton Dickinson, Heidelberg; Rosco) sowie den Angaben des Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) X / 1998 Resistenzbestimmung und ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Angaben zu den verwendeten Antibiotikatestblättchen

Antibiotikum	Abkürzung	sensibel	intermediär	resistent
Amoxicillin/Clavulansäure (20/10 µg) * <sup>1</sup>	AMC 30	< 20 <sup>#</sup>	21 – 27 <sup>#</sup>	> 28 <sup>#</sup>
Bacitracin (0,04 IE) * <sup>2</sup>	-	-	-	> 16
Bacitracin (10 IE) * <sup>3</sup>	B 10	< 8	9 - 12	> 13
Cefacetril (30 µg) * <sup>1</sup>	CAC 30	< 23	24 - 26	> 27
Cefotaxim (30 µg) * <sup>4</sup>	CTX 30	< 14	15 - 22	> 23
Cefoxitin (30 µg) * <sup>4</sup>	FOX 30	< 14	15 - 17	> 18
Clindamycin (2 µg) * <sup>4</sup>	CC 2	< 14	15 - 16	>17
Erythromycin (15 µg) * <sup>1</sup>	ERY 15	< 16	17 - 20	> 21
Gentamicin (10 µg) * <sup>1</sup>	GEN 10	< 14	15 - 20	> 21
Kanamycin (30 µg) * <sup>1</sup>	KAN 30	< 27	-	> 28
Minocyclin (30 µg) * <sup>4</sup>	MI 30	< 14	15 - 18	> 19
Nalidixinsäure (30 µg) * <sup>4</sup>	NA 30	< 13	-	> 14
Ofloxacin (10 µg) * <sup>4</sup>	OFX 10	-	-	> 12
Oxacillin (5 µg) * <sup>1</sup>	OXA 5	< 15	-	> 16
Penicillin G (10 IE) * <sup>1</sup>	PEN 10 IE	< 12	13 - 23	> 24
Piperacillin (30 µg) * <sup>4</sup>	PIP 30	< 13	14 - 19	> 20
Streptomycin (25 IE) * <sup>1</sup>	STM 25 IE	< 14	15 - 16	> 17
Sulfamethoxazol- Trimethoprim (23,75 + 1,25 µg) * <sup>1</sup>	SXT 25	< 10	11 - 15	> 16
Tetracyclin (30 µg) * <sup>1</sup>	TET 30	< 16	17 - 21	> 22

# = Hemmhofgröße in mm

Angaben zu den Hemmhofgrößen für die jeweiligen Antibiotika sind entnommen aus: \*<sup>1</sup> = Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) X / 1998 Resistenzbestimmung, \*<sup>2</sup> = Directions for Bacitracin (0,04 IE), Rosco, \*<sup>3</sup> = Minimale Hemmkonzentrationen, Bayer bzw. \*<sup>4</sup> = Hemmzontentabelle, Becton Dickinson



### **3.4.4 Weitere genotypische Charakterisierung**

#### **3.4.4.1 Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA**

##### **3.4.4.1.1 Präparation der bakteriellen DNA**

Die Präparation der Gesamtzahl-DNA erfolgte modifiziert nach den Methoden von MASLOW et al. (1993a) und THIELE et al. (1993). Zunächst wurden die Kulturen nach 3.4.1 in Flüssigmedium angezüchtet. Nach Abzentrifugieren für 10 min bei 10 000 U/min und 4 °C sowie einem Waschschrift des Pellets mit TE-Puffer (3.4.2.6.1) konnten die Bakterien in TE-Puffer resuspendiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm auf 5% Transmission eingestellt werden. Hieran schloss sich eine Zentrifugation für 10 min bei 13 000 U/min an. Das Volumen der Überstandsmenge wurde bestimmt und anschließend verworfen. Es fand nun eine Resuspendierung des Bakterienpellets in TE-Puffer statt, wobei die Menge des TE-Puffers der Hälfte des verworfenen Überstandes entsprach. Im Weiteren erfolgte ein Mischen der Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1 mit 1 %iger `low melting` InCert-Agarose (BIOzym Diagnostik, Hess. Oldendorf) welche zuvor unter Erhitzen in TE-Puffer gelöst worden war und das Einfüllen des Gemisches in eine Gießkammer. Bis zum Erstarren verblieben die Agaroseblöckchen ca. 15 min auf Eis und anschließend über Nacht zum Aufschluss der Bakterienzellwand in 200 µl Lysispuffer (6 mmol/l Tris [pH 7,6], 1 mol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA [pH 7,6], 0,5% Brij-58 (Sigma), 0,2% Natriumdodecylsulfat (Sigma), 0,5% Natriumlauroylsarcosin (Sigma)) mit 1 mg/ml Lysozym-Zusatz bei 37 °C im Wasserbad. Eine anschließende Deproteinisierung erfolgte durch Zusatz von Proteinase K (Endkonzentration 0,5 µl/ml, Roche Diagnostics GmbH) und eine Inkubation im Wasserbad bei 56 °C über Nacht. Nach zweimaligem Waschen des Blöckchens mit 200 µl TE-Puffer und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur sowie zweimaligem Waschen mit 200 µl TE-Puffer unter

Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid (Endkonzentration 1,0 mmol/l; Sigma) und einer Inkubation für 1 h bei 56°C zur Inaktivierung der Proteinase K schlossen sich nochmals zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl TE-Puffer und eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur an. Bis zur Verwendung verblieben die präparierten DNA Blöckchen in TE-Puffer bei 4°C im Kühlschrank.

#### 3.4.4.1.2 Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Der Restriktionsverdau der nach 3.4.4.1.1. präparierten chromosomalen DNA wurde vergleichend mit den Endonukleasen *ApaI* und *SmaI* für die als *Streptococcus dysgalactiae* susp. *dysgalactiae* identifizierten Kulturen durchgeführt. Für die als *Streptococcus phocae* identifizierten Kulturen kam nur die Endonuklease *ApaI* zur Anwendung. Die Restriktionsansätze wurden in folgender Zusammensetzung verwendet:

1. ca. 1 µl DNA (1 Agarose-Blöckchen)
  - 20 µl Universalpuffer (10 x ; Stratagene, Heidelberg)
  - 2 µl *Apa I* ( 20 U; Boehringer, Ingelheim)
  - 178 µl Aqua bidest

Inkubation : 24h bei 30 °C
  
2. ca. 1 µl DNA (1 Agarose-Blöckchen)
  - 20 µl Universalpuffer (10 x ; Stratagene)
  - 2 µl *Sma I* (20 U; Boehringer)
  - 178 µl Aqua bidest.

Inkubation : 5 h bei 25 °C

### 3.4.4.1.3 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Zum Auftrennen der nach 3.4.4.1.1 präparierten und nach 3.4.4.1.2 geschnittenen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet (1,1 g Agarose ("Molecular Biology Certified"-Agarose, Bio-Rad, München) in 110 ml 0,5x TBE-Puffer (45 mmol/l Tris, 45 mmol/l Borat, 1,0 mmol/l EDTA (pH 8,0) unter Erhitzung gelöst), das in eine 13 x 14 x 0,55 mm Flachbettform (Bio-Rad) gegossen worden war. Nach Verbringen der Blöckchen in die Vertiefungen des Agarosegels und Verschließen der Vertiefungen mit flüssigem 1%igem Agarosegel ("Molecular Biology Certified"-Agarose, Bio-Rad in 0,5x TBE-Puffer) erfolgte anschließend die Elektrophorese im CHEF-DR II "Pulsed Field Electrophoresis System" (BioRad) mit 2 l zuvor auf 14° C gekühltem 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer unter den folgenden Konditionen:

#### 1. Auftrennung des *ApaI* Restriktionsverdaus:

	I. Lauf	II. Lauf
Spannung	6 V/cm	6 V/cm
Anfangsumschaltzeit	0,1 s	5,0 s
Endumschaltzeit	10,0 s	8,0 s
Dauer	13 h	13 h
Temperatur	14 °C	14 °C

## 2. Auftrennung des *Sma*I Restriktionsverdaus:

	I. Lauf	II. Lauf
Spannung	5 V/cm	6 V/cm
Anfangsumschaltzeit	0,1 s	9,0 s
Endumschaltzeit	11,0 s	34,0 s
Dauer	8 h	17 h
Temperatur	14 °C	14 °C

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden Low Range PFGE Marker (0,1-200 kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50 – 1000 kb; beide: Sigma) als Längenstandard mitgeführt.

Anschließend erfolgte das Färben und die Dokumentation des Gels (3.4.2.6.5.2)

### 3.4.4.1.4 Dendrogrammanalyse

Zunächst wurden die Größe der Fragmente anhand der Längenstandards bestimmt. Danach wurde der Verwandtschaftsgrad der Kulturen mit Hilfe der Computersoftware GelCompar 3.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) ermittelt und in Form eines Dendrogramms graphisch dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung der Kulturen

Bei den nach 3.3.2 isolierten 72  $\beta$ -hämolyzierenden Bakterienkulturen handelte es sich um grampositive, katalasenegative, runde bis ovoide Kokken, die in langen Ketten mit bis zu ca. 100 Bakterien pro Kette vorlagen. Nach Anzucht auf Blutagarplatten waren die Kolonien von einer deutlichen Zone einer vollständigen  $\beta$ -Hämolyse umgeben. Die Bakterien bildeten weißgraue Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 1.5 bis 2 mm. Die Bakterien konnten der Gattung *Streptococcus* zugeordnet werden. Der CAMP-Test erwies sich bei allen Kulturen als negativ.

Mit den nach 3.4.2.2.1 gewonnenen gruppenspezifischen Antigenen zeigten 8 von Seehunden (n=7) und Kegelrobbe (n=1) isolierte Streptokokkenkulturen in der nach 3.4.2.2.2 durchgeführten Doppelimundiffusion nach Ouchterlony eine deutliche Präzipitationslinie mit Gruppe C-spezifischem Antiserum und drei von einem Seehund (n=1) und Kegelrobbe (n=2) isolierte Streptokokkenkulturen eine Reaktion mit Gruppe L-spezifischem Antiserum. In Abb. 9 ist eine typische Präzipitationsreaktion einiger untersuchter Kulturen sowie von zwei Referenzkulturen beispielhaft dargestellt. Keine der untersuchten Kulturen reagierte mit Gruppe A-, B-, E-, G-, P-, U-, und V-spezifischem Antiserum.

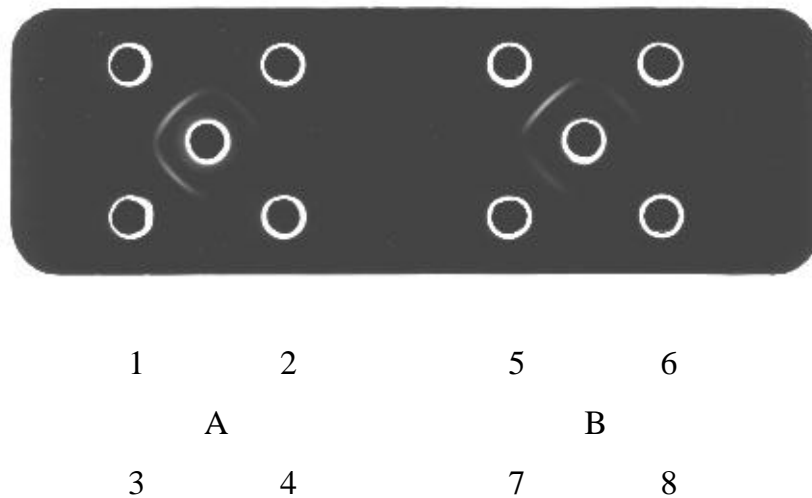


Abb. 9: Präzipitationsreaktionen von Antigenpräparationen der Streptokokkenculturen H2I (1), P35I (2) und der L-Streptokokken-Referenzkultur ATCC 9932 (3) mit Gruppe L-spezifischem Antiserum (A) sowie der Streptokokkenculturen H4K (5), P18A (6) und der C-Streptokokken-Kultur *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60 (7) mit Gruppe C-spezifischem Antiserum (B); fehlende Reaktion der Kultur P4M (4, 8).

In der nach 3.4.2.2.3 durchgeführten Staphylokokken-Koagglutination erwiesen sich alle acht Kulturen, die bereits durch Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony mit Gruppe C-spezifischem Antiserum reagierten ebenfalls als C-positiv. Auch die drei Kulturen, die bereits zuvor der serologischen Gruppe L zugeordnet worden waren, reagierten mit Gruppe L-spezifischem Antiserum. Beide Verfahren ergaben identische Ergebnisse.

Eine Untersuchung der Kulturen mit dem kommerziellen Streptokokken-Identifizierungstest (3.4.2.2.4) ermöglichte eine Zuordnung von 61 Streptokokkenculturen, isoliert von Seehunden (n=53) und

Kegelrobben (n=8), in die serologische Gruppe F. In Abbildung 10 ist eine Agglutinationsreaktion bzw. eine negative Reaktion beispielhaft dargestellt.

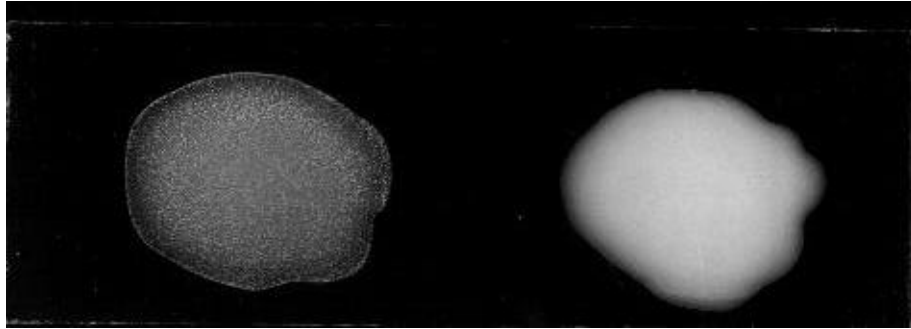


Abb. 10: Typische Agglutinationsreaktion der Streptokokkenkultur P4M (links) mit Serogruppe F-spezifischen Latexpartikeln des Streptokokken-Identifizierungstests; negative Reaktion der L-Streptokokkenreferenzkultur ATCC 9932 (rechts).

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der serologischen Gruppenbestimmung der von Seehunden und Kegelrobben stammenden Streptokokkenkulturen mittels der drei Verfahren zusammenfassend dargestellt.

Tab. 10: Serologische Gruppenbestimmung der 72 von Seehunden (n=61) und Kegelrobben (n=11) isolierten Kulturen

Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony									Staphylokokken-Koagglutination		Streptokokken-Identifizierungstest mit Latexsuspension
Antiserum									Antiserum		
A	B	C	E	G	L	P	U	V	C	L	
0*	0	8 <sup>1</sup>	0	0	3 <sup>2</sup>	0	0	0	8 <sup>1</sup>	3 <sup>2</sup>	61

\* = Anzahl der Kulturen mit positiven Reaktionen

<sup>1</sup> = identische Kulturen

<sup>2</sup> = identische Kulturen

Die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der 69 Isolate, die zuvor den serologischen Gruppen C und F zugeordnet worden waren, ergab ein weitestgehend einheitliches biochemisches Profil und wurde daher gemeinsam dargestellt. Die biochemischen Eigenschaften, ermittelt mit dem kommerziellen System api 50 CH (3.4.2.3.1), zeigten bei allen 69 von Seehunden (n=60) und Kegelrobben (n=9) isolierten Bakterienkulturen einen Abbau von Glucose und N-Acetyl-Glucosamin sowie bei keiner dieser Kulturen einen Abbau von Erythrit, D-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonit,  $\beta$ -Methyl-D-Xylosid, Sorbose, Rhamnose, Dulcit, Inosit, Sorbit,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid,  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosid, Amygdalin, Cellobiose, Melibiose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Xylit, Gentiobiose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabit, L-Arabit, Gluconat, 2-Keto-Gluconat und 5-Keto-Gluconat.

Glycerol wurde von vier Kulturen (5,8%), L-Arabinose von einer Kultur (1,4%), Ribose von 63 Kulturen (91,3%), Galactose von 11 Kulturen (15,9%), Fructose von 68 Kulturen (98,6%), Mannose von 67 Kulturen (97,1%), Mannit von



sechs Kulturen (8,7%), Arbutin von einer Kultur (1,4%), Äskulin von drei Kulturen (4,4%), Salicin von einer Kultur (1,4%), Maltose von 68 Kulturen (98,6%), Lactose von 12 Kulturen (17,4%), Saccharose von 12 Kulturen (17,4%), Trehalose von 7 Kulturen (10,1%), Stärke von 15 Kulturen (21,7%), Glycogen von 17 Kulturen (24,6%) und D-Turanose von sechs Kulturen (8,7%) abgebaut. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Die verbleibenden drei L-Streptokokkenisolate der vorliegenden Arbeit, die von einem Seehund und zwei Kegelrobben stammten, wurden ebenfalls mit dem kommerziellen System api 50 CH untersucht. Hierbei erwiesen sich die biochemischen Eigenschaften aller drei Bakterienkulturen als nahezu einheitlich. Alle Kulturen zeigten einen Abbau von Ribose, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, N-Acetyl-Glucosamin, Maltose, Saccharose, Trehalose, Stärke und Glycogen. Keine der Kulturen zeigte einen Abbau von Glycerol, Erythrit, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonit,  $\beta$ -Methyl-D-Xylosid, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbit,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid,  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosid, Amygdalin, Arbutin, Äskulin, Salicin, Zellobiose, Melibiose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Xylit, Gentiobiose, D-Turanose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabit, L-Arabit, Gluconat, 2-Keto-Gluconat und 5-Keto-Gluconat. Eine Kultur (33,3%) baute Lactose ab (Tab. 11).

Tab. 11: Biochemische Eigenschaften der 72 Seehund- (n=61) und Kegelrobben-Isolate (n=11) ermittelt mit dem api 50 CH-System

	C- (n=8) und F-(n=61) Streptokokken		L-Streptokokken	
	n = 69	in %	n = 3	in %
Glycerol	4*	5,8	0*	0
Erythrit	0	0	0	0
D-Arabinose	0	0	0	0
L-Arabinose	1	1,4	0	0
Ribose	63	91,3	3	100
D-Xylose	0	0	0	0
L-Xylose	0	0	0	0
Adonit	0	0	0	0
β-Methyl-D-Xylosid	0	0	0	0
Galactose	11	15,9	3	100
Glucose	69	100	3	100
Fructose	68	98,6	3	100
Mannose	67	97,1	3	100
Sorbose	0	0	0	0
Rhamnose	0	0	0	0
Dulcit	0	0	0	0
Inosit	0	0	0	0
Mannit	6	8,7	0	0
Sorbit	0	0	0	0
α-Methyl-D-Mannosid	0	0	0	0
α-Methyl-D-Glucosid	0	0	0	0
N-Acetyl-Glucosamin	69	100	3	100
Amygdalin	0	0	0	0
Arbutin	1	1,4	0	0
Äskulin	3	4,4	0	0
Salicin	1	1,4	0	0
Zellobiose	0	0	0	0
Maltose	68	98,6	3	100
Lactose	12	17,4	1	33,3
Melibiose	0	0	0	0
Saccharose	12	17,4	3	100
Trehalose	7	10,1	3	100
Inulin	0	0	0	0
Melezitose	0	0	0	0
Raffinose	0	0	0	0

Fortsetzung: Tab. 11:

Stärke	15	21,7	3	100
Glycogen	17	24,6	3	100
Xylit	0	0	0	0
Gentiobiose	0	0	0	0
D-Turanose	6	8,7	0	0
D-Lyxose	0	0	0	0
D-Tagatose	0	0	0	0
D-Fucose	0	0	0	0
L-Fucose	0	0	0	0
D-Arabit	0	0	0	0
L-Arabit	0	0	0	0
Gluconat	0	0	0	0
2-Keto-Gluconat	0	0	0	0
5-Keto-Gluconat	0	0	0	0

n = Anzahl der untersuchten Kulturen

\* = Anzahl der Kulturen mit positiven bzw. negativen Reaktionen

Bei den nach 3.4.2.3.2 vergleichend durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigten alle 69 von Seehunden (n=60) und Kegelrobben (n=9) isolierten Kulturen der serologischen Lancefield Gruppen C und F einen Abbau von Fructose und D-Mannose aber keinen Abbau von Lactose, Salicin, Sorbit und Trehalose. Das Kohlenhydrat Ribose wurde von 68 (98,6%) Bakterienkulturen abgebaut. Beim Abbau von Fructose, Lactose, D-Mannose, Salicin und Trehalose zeigten sich zum Teil Abweichungen zum api 50 CH System.

Alle drei von Seehunden (n=1) und Kegelrobben (n=2) isolierten L-Streptokokkenkulturen zeigten einen Abbau von Fructose, D-Mannose, Ribose und Trehalose. Bei keiner der drei Kulturen konnte ein Abbau von Salicin und Sorbit nachgewiesen werden. Nur die Kultur vom Seehund zeigte einen Abbau von Lactose. Die nach 3.4.2.3.2 ermittelten Ergebnisse erwiesen sich als identisch mit denen des api 50 CH-Systems.

Der nach 3.4.2.3.3 vergleichend durchgeführte Nachweis der hydrolytischen Spaltung von Äskulin erwies sich bei allen untersuchten Kulturen als negativ.

Hinsichtlich des Na-Hippuratabbaus (3.4.2.3.4 bis 3.4.2.3.5) war bei keiner der Kulturen, bei der Spaltung von Arginin (3.4.2.3.5) lediglich bei den 3 Kulturen der serologischen Gruppe L eine positive Reaktion nachweisbar.

In Tabelle 12 sind die nach 3.4.2.3.2 ermittelten biochemischen Ergebnisse der getesteten Kulturen aufgeführt.

Tabelle 12: Biochemische Eigenschaften der 72 Seehund- (n=61) und Kegelrobben-Isolate (n=11)

	C-(n=8) und F-Streptokokken (n=61)		L-Streptokokken (n=3)	
	n = 69	in %	n = 3	in %
Äskulin	0*	0	0*	0
Arginin	0	0	3	100
Fructose	69	100	3	100
Lactose	0	0	1	33,3
D-Mannose	69	100	3	100
Na-Hippurat	0	0	0	0
Ribose	68	98,6	3	100
Salicin	0	0	0	0
Sorbit	0	0	0	0
Trehalose	0	0	3	100

n = Anzahl der Kulturen

\* = Anzahl der Kulturen mit positiven bzw. negativen Reaktionen

Anhand der kulturellen, serologischen und biochemischen Eigenschaften der 72 Streptokokkenkulturen wurden die 69 den serologischen Gruppen C und F zugeordneten Isolate als *Streptococcus phocae* und die drei Kulturen, die der serologischen Gruppe L zugeordnet wurden, als *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L identifiziert.

Zum Nachweis von Kohlenhydratstrukturen der bakteriellen Oberfläche wurden die Lektine von *Arachis hypogaea* und *Dolichos biflorus* (3.4.2.4) eingesetzt. Eine Agglutinationsreaktion mit dem Lektin von *Arachis hypogaea* zeigten 70 von Seehunden und Kegelrobben isolierte Kulturen. Zwei Kulturen (P31B, P37J), die von Seehunden stammten, wiesen eine Selbstagglutination auf. Mit dem Lektin von *Dolichos biflorus* agglutinierten alle 8 Kulturen (100%), die

zuvor der serologischen Lancefieldgruppe C zugeordnet werden konnten. Alle anderen Kulturen erwiesen sich mit diesem Lektin als negativ. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse des Lektin-Agglutinationstest zusammenfassend dargestellt.

Tab. 13: Agglutinationsreaktion der 72 untersuchten Kulturen mit den Lektinen von *Arachis hypogaea* und *Dolichos biflorus*

	Lektine von	
	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Dolichos biflorus</i>
C-Streptokokken (n = 8)	8* (100%)	8*(100%)
F-Streptokokken (n = 61**)	59 (96,7%)	0 (0%)
L-Streptokokken (n = 3)	3 (100%)	0 (0%)

n = Anzahl der Kulturen

\* = Anzahl der Kulturen mit positiven bzw. negativen Reaktionen

\*\* = zwei Kulturen wiesen eine Selbstagglutination auf

Alle 72 Streptokokkenkulturen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der monospezifischen B-Streptokokken-Typenantigen-Antiseren (3.4.2.5) durch Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony auf das Vorhandensein der B-Streptokokken-Polysaccharidantigene Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII bzw. der B-Streptokokken-Proteinantigene X, R, Rib, c $\alpha$  und c $\beta$  untersucht. Dabei war bei 61 der 72 von Seehunden und Kegelrobben isolierten Kulturen (84,7 %) eine Reaktion mit Polysaccharidantigen Ia-spezifischem-Antiserum nachweisbar. Diese 61 Kulturen waren zuvor alle der Serogruppe F zugeordnet worden. Bei keiner der 72 untersuchten Kulturen konnten Präzipitationsreaktionen mit

Typenantigen Ib-, II-, III-, IV-, V-, VI-, VII-, VIII- oder Proteinantigen X, R-, Rib-,  $\alpha$ - oder  $\beta$ -spezifischen Antisera nachgewiesen werden.

## 4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)-vermittelte Nachweisverfahren

Eine weitergehende Charakterisierung der zuvor als *S. phocae* identifizierten C- und F-Streptokokken erfolgte mittels PCR. Hierzu wurde zunächst das 16S ribosomale RNA-Gen des *S. phocae*-Referenzstammes 8399 H1 (NCTC 12719) mit den angegebenen Oligonukleotidprimern (3.4.2.6.3.1) amplifiziert und das Amplikon mit einer Größe von 1547 Basenpaaren sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abb. 11 dargestellt und wurde in der Gendatenbank unter der Zugangsnummer AF235052 abgelegt.

Abb. 11: Basensequenz des 16S rRNA-Gens des *S. phocae* Referenzstammes 8399 H1; der Bereich der V2-Region (26 Basen) des 16S rRNA-Gens ist markiert (————)

1	GAT	CCT	GGC	TCA	GGA	CGA	ACG	CTG	GCG
28	GCG	TGC	CTA	ATA	CAT	GCA	AGT	AGA	ACG
55	CCT	CTT	GCT	TAG	TGC	TTG	CAC	TAA	GTA
82	AGA	GSA	GTT	GCA	GAY	ACG	GGT	GAG	TAA
109	CGC	GTA	GGT	AAC	CTA	CCT	TAT	AGC	GGG
136	GGA	TAA	CTA	TTG	GAA	ACG	ATA	GCT	AAT
163	ACC	GCA	<u>TAA</u>	<u>GAA</u>	<u>GAG</u>	<u>TTA</u>	<u>ACA</u>	<u>CAT</u>	<u>GTT</u>
190	<u>AAT</u>	<u>TCT</u>	TTA	AAA	GGG	GCA	ATT	GCT	CCA
217	CTA	TGA	GAT	GGA	CCT	GCG	TTG	TAT	TAG
244	CTA	GTT	GGT	GAG	GTA	ACG	GCT	CAC	CAA
271	GGC	AAC	GAT	ACA	TAG	CCG	ACC	CTG	AGA
298	GGG	TGA	TCG	GCC	ACA	CTG	GGA	CTG	AGA
325	CAC	GGC	CCA	GAC	TCC	TAC	GGG	ATG	GCA
352	GCA	GTA	GGG	AAT	CTT	CGG	CAA	TGG	ACC
379	GMM	AGT	CTG	ACC	GAG	CAA	CGC	CGC	GTG
406	AGT	GAA	GMA	SGT	TTT	CGG	ATC	GTA	AAG

433 CTC TGT GTT AGA GAA GAA TGA TGG TGG  
 460 GAG TGG AAA ATC CAC CAT GTG ACG GTA  
 487 ACT AAC CAG AAA GGG ACG GCT AAC TAC  
 514 GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA CGT AGG  
 541 TCT GCG AGC GTT GTC CGG ATT TAT TGG  
 568 GCG TAA AGC GAG CGC AGG CGG TTT GAT  
 595 AAG TCT GAA GTT AAA GGC CGT GGC TCA  
 622 ACC ATG GTT CGC TTT GGA AAC TGT CAA  
 649 ACT TGA GTG CAG AAG GGG AGA GTG GAA  
 676 TTC CAT GTG TAG CGG TGA AAT GCG TAG  
 703 ATA TAT GGA GGA ACA CCG GTG GCG AAA  
 730 GCG GCT CTC TGG TCT GTA ACT GAC GCT  
 757 GAG GCT CGA AAG CGT GGG GAG CAA ACA  
 784 GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAC GCC  
 811 GTA AAC GAT GAG TGC TAG GTG TTA GAC  
 838 CCT TTC CGG GGT TTA GTG CCG TAG CTA  
 865 ACG CAT TAA GCA CTC CGC CTG GGG AGT  
 892 ACG ACC GCA AGG TTG AAA CTC AAA GGA  
 919 ATT GAC GGG GGC CCG CAC AAG CGG TGG  
 946 AGC ATG TGG TTT AAT TCG AAG CAA CGC  
 973 GAA GAA CCT TAC CAG GTC TTG ACA TCC  
 1000 TTC TGA CCC GGC CTA GAG ATA GGC TTT  
 1027 CTC TTC GGA GCA GAA GTG ACA GGG TGG  
 1054 TGC ATG GTT GTC GTC AGC TCG TGT CGT  
 1081 GAG ATG TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA  
 1108 GCG CAA CCC CTA TTG TCT AGT TGC CAT  
 1135 CAT TAA GTT GGG CAC TCT AGC GAG ACT  
 1162 GCC GGT AAT AAA CCG GAG GAA GGT GGG  
 1189 GAT GAC GTC A A A T C A T C A T G C C C C T T A  
 1216 TGA CCT KGG GCT ACA CAC GTG CTA CAA  
 1243 TGG TTG GTA CAA CGA GTT CGC AAG CCG  
 1270 GTG ACG GCA AGC TAA TCT CTT AAA GCC  
 1297 AAT CTC AGT TCG GAT TGT AGG CTG CAA  
 1324 CTC GCC TAC ATG AAG TCG GAA TCG CTA  
 1351 GTA ATC GCG GAT CAG CAC GCC GCM GGT  
 1378 GAA TAC GTT CCC GGG GCT TGT ACM ACA  
 1405 CCG CCC GTB ACA CCA CGA GAG TTT GTA  
 1432 ACA CCC GAA GTC GGT GAG GTA ACC TTT  
 1459 TAG GAG CCA GCC GCC TAA GGT GGG ATA  
 1486 GAT GAT TGG GGT GAA GTC GTA ACA AGG  
 1513 TAG CCG TAT CGG AAG GTG CGG CTG GAT  
 1540 CAC CTC C



Zur weitergehenden Analyse des 16S rRNA-Gens der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 wurde das 16S rRNA-Gen von *S. phocae* mit den 16S rRNA-Genen der Streptokokkenspezies *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* und *S. iniae* vergleichend betrachtet. Dieser Vergleich der 16S rRNA-Gene ist in Abbildung 12 dargestellt.

Abb. 12: Vergleich des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* mit den 16S rRNA-Genen von *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* und *S. iniae*. Die Sequenzen wurden der Gendatenbank entnommen: *S. agalactiae* (Zugangsnummer X59032), *S. dysgalactiae* (Zugangsnummer X59030), *S. canis* (Zugangsnummer X59061), *S. uberis* (Zugangsnummer AB002526), *S. parauberis* (Zugangsnummer X89967), *S. pyogenes* (Zugangsnummer X59029), *S. pneumoniae* (Zugangsnummer X58312), *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Zugangsnummer AB002516), *S. iniae* (Zugangsnummer X58316); die im Vergleich zur Sequenz von *S. phocae* abweichenden Nukleotidsequenzen sind schwarz markiert; der Bereich der V2-Region (26 Basen) des 16S rRNA-Gens ist markiert (  )

	1	60
<i>S. phocae</i>	GAT-CCTG-----GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAT	
<i>S. agalactiae</i>	-----	
<i>S. dysgalactiae</i>	-----	
<i>S. canis</i>	GA-----	
<i>S. uberis</i>	GAGGACTG-----GTGCTGCAC-----	
<i>S. parauberis</i>	CGG-CCTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGCTGAAGAC-----	
<i>S. pyogenes</i>	GA-----	
<i>S. pneumoniae</i>	-----	
<i>S. equi</i>	CAG-ATTG-----ATACGAGCT-----	
<i>S. iniae</i>	-----	

61 120  
*S. phocae* ACATGCAAGTAGAACGCCTCTTGCTTAGTG---CTTGCACATAAGTAAGAGSAGTTGCAGA  
*S. agalactiae* -----G  
*S. dysgalactiae* -----G  
*S. canis* -----G  
*S. uberis* -----TG---TCCTAAA---GGAGTTGC--G  
*S. parauberis* -----TGGTGCTTGCACT-AGTCAGATGAGTTGC--G  
*S. pyogenes* -----G  
*S. pneumoniae* -----G  
*S. equi* -----TG---CCTACAATTATTCCTGTGAGTTCGC--G  
*S. iniae* -----G

121 180  
*S. phocae* YACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTACCTTATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. agalactiae* AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTNCCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. dysgalactiae* AACGGGTGAGTNAACGCGTAGGTAACCTNCCTCATAGCGGGGGATAACTNTTGGAAACGAT  
*S. canis* -ACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTNCCTNATAGCGGGGGATAACTNTTGGAAACGAT  
*S. uberis* AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAAGTAACCGCATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. parauberis* AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTACCTCATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. pyogenes* -ACGGGTGAGTNAACGCGTAGGTAACCTGCCTNATAGCGGGGGATAACTNTTGGAAACGAT  
*S. pneumoniae* AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. equi* AACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTAGCTTATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGAT  
*S. iniae* AACGGGTGAGTNAACGCGTAGGTAACCTNCCTCATAGCGGGGGATAACTNTTGGAAACGAT

181 240  
*S. phocae* AGCTAATACCGCATFAAGAAGAGTTAACACATGTTAATTC TTTAAAAGGGGCAATTGCTCC  
*S. agalactiae* AGCTAATACCGCATNAGAGTANITTAACNCATGTNAGTNN TTTAAAAGGAGCAATTGCTNC  
*S. dysgalactiae* AGCTAATACCGCATGACAATNGAGGACNCATGTNNTICATTTAAAAGGTGCAACTGCATC  
*S. canis* AGCTNATACCGCATNAAAGTGTNAACACATGTTAAGA ACTTAAAAGGGGCAACTNCTCC  
*S. uberis* AGCTAATACCGCATGACAATAGTTACACCATGTACCCTA TTTAAAAGGGGCAAAATGCTTC  
*S. parauberis* AGCTAATACCGCATGACAATTAAGTACTCATGTACTAAA TTTAAAAGGAGCAATTGCTTC  
*S. pyogenes* AGCTAATACCGCATFAAGAGAGACTAACGCATGTNAGTNA TTTAAAAGGGGCAATTGCTNC  
*S. pneumoniae* AGCTAATACCGCATFAAGACTAGATGTTGCAATGACATTTGCTTTAAAAGGTGCACTTGCATC  
*S. equi* AGCTAATACCGCATFAAAAGTGTGACCCATGTAACTA TTTAAAAGGGGCAACAGCTCC  
*S. iniae* AGCTNATACCGCATGACNCTAGAGTACACATGTACTNAA GTTTAAAAGGAGCAATTGCTTC

241 300  
*S. phocae* ACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAA  
*S. agalactiae* ACTG TGAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTNGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCCGA  
*S. dysgalactiae* ACTATGAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTNGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCGA  
*S. canis* ACTATGAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTNGTTGGTGAGGTNAAGGCTCACCAAGGCCGA  
*S. uberis* ACTATGAGATGGACCTACGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCGA  
*S. parauberis* ACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCA  
*S. pyogenes* ACTATGAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACNAAGGCCGA  
*S. pneumoniae* ACTACAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTAGTTGGTG GGTAAACGGCTCACCAAGGCCGA  
*S. equi* ACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGTTAAAGGCTTACCAAGGCCGA  
*S. iniae* ACTATGAGATGGACCTNCGTNGTATTAGCTNGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCGA

301 360  
*S. phocae* CGATACATAGCCGACCCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
*S. agalactiae* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTNATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCNGA  
*S. dysgalactiae* CGATACNTAGCCGACC-TGAGAGGGGTNAACGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCNGA  
*S. canis* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
*S. uberis* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
*S. parauberis* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
*S. pyogenes* CGATACNTAGCCGACC-TGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCNGA  
*S. pneumoniae* CGATACNTAGCCGACC-TGAGAGGGGTNATCGGCCACACTGGGACTNAGACNCGGCCNNGN  
*S. equi* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTGAAACGGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
*S. iniae* CGATACATAGCCGACC-TGAGAGGGGTNATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA

361 420

*S. phocae* CTCCACGGGATGGCAGCANGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACCGMMAGTCTGACCGAGC  
*S. agalactiae* CTCCTACGGGA-GGCAGCA-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGA-CGGAAGTCTGACCGAGC  
*S. dysgalactiae* CTCCTACGGGA-GGCAGCN-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGA-CGGAAGTCTNACCGAGC  
*S. canis* CTCCTACGGGA-GGCAGCN-GTNGGGAATCTTCGGCAATGGG-GGGAACCCCTGACCGAGC  
*S. uberis* CTCCTACGGGA-GGCAGCA-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGG-GGGAACCCCTGACCGAGC  
*S. parauberis* CTCCTACGGGA-GGCAGCA-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGG-GGCNACCCCTGACCGAGC  
*S. pyogenes* CTCCTACGGGA-GGCAGCN-GTAGGGAATCTTCGGCNATGGG-GGNNACCCNNACCGAGC  
*S. pneumoniae* CTCCTACGGGA-GGCNGCN-GTNGGGAATCTTCGGCAATGGA-CGGAAGTCTGACCGAGC  
*S. equi* CTCCTACGGGA-GGCAGCA-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGG-GGGAACCCCTGACCGAGC  
*S. iniae* CTCCTACGGGA-GGCNGCN-GTAGGGAATCTTCGGCAATGGA-CGGAAGTCTGACCGAGC

421 480

*S. phocae* AACGCCGCGTGAGTGAAGMASGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAATGA  
*S. agalactiae* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGT  
*S. dysgalactiae* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAATGA  
*S. canis* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG  
*S. uberis* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG  
*S. parauberis* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG  
*S. pyogenes* AACGCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAATGA  
*S. pneumoniae* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAATGA  
*S. equi* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAG  
*S. iniae* AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGG

481 540

*S. phocae* TGGTGGGAGTGGAAAATCCACCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. agalactiae* TGGTAGGAGTGGAAAATCTACCAAGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. dysgalactiae* TGGTGGGAGTGGAAAATCCACCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. canis* TAAATGGGAGTGGAAAACCCATTATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. uberis* TAAATGGGAGTGGAAAATCCATTACGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. parauberis* TAAATGGGAGTGGAAAATCCATTACGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. pyogenes* TGGTGGGAGTGGAAAATCCACCAAGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. pneumoniae* GTGTGAGAGTGGAAAAGTTACACTGTNACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. equi* TGATGGGAGTGGAAAATCCATCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC  
*S. iniae* TAAATGGGAGTGGAAAATCCATTACGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGGCTNACTAC

541 600

*S. phocae* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCTGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
*S. agalactiae* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CNAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
*S. dysgalactiae* GTGCCAGCAGCCGCGGTTNATACGTAGGTCC-CNAGCGTTGTCCGGATNNATTGGGCGTNA  
*S. canis* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CNAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTNA  
*S. uberis* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
*S. parauberis* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCT-CGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
*S. pyogenes* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CNAGCGTTGTCCGGATNNATTGGGCGNNN  
*S. pneumoniae* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CNAGCGTTGTCCGGATNNATTGGGCGTNA  
*S. equi* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCC-CGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
*S. iniae* GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCT-CGAGCGTTGTCCGGATNNATTGGGCGTNA

601 660

*S. phocae* AGCGAGCGCAGGCGGTTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCCGTGGCTCAACCATGGTTCGC  
*S. agalactiae* AGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGAAGTTAAAGGCCAGTGGCTNAACCAATTGTACGC  
*S. dysgalactiae* AGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTNAAGTTAAAGGCCAGTGGCTCAACCACTNTACGC  
*S. canis* AGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGAAGTTNAAGGCATGGCTCAACCAATGTATGC  
*S. uberis* AGCGAGCGCAGGCGGTTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCCGTGGCTTAACCATAGTACGC  
*S. parauberis* AGCGAGCGCAGGCGGTTATTTAAGTCTGAAGTTAAAGGCCGTGGCTCAACCATGGTTCGC  
*S. pyogenes* AGCGAGCGCAGGCGGTTNNTTTAAGTCTNAAGTTAAAGGCCATTGGCTNAACCAATGTACGC  
*S. pneumoniae* AGCGAGCGCAGGCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCCGTGGCTCAACCATAGTAGGC  
*S. equi* AGCGAGCGCAGGCGGTTTTGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCCAGTGGCTTAACCAATGTATGC  
*S. iniae* AGCGAGCGCNGGCGGTTCTATAAGTCTGAAGTTAAAGGCCNGTGGCTCAACCATNGTATGC

	661		720
<i>S. phocae</i>	TTTGAAACTGTCAA	ACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. agalactiae</i>	TTTGAAACTG	GAGCACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. dysgalactiae</i>	TTTGAAACTG	GAGCACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. canis</i>	TTTGAAACTG	GAGCACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. uberis</i>	TTTGAAACTGTCAA	ACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. parauberis</i>	TTTGAAACTG	GATAACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. pyogenes</i>	TTTGAAACTG	GAGCACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. pneumoniae</i>	TTTGAAACTGT	TAACTTGAGTGCAGAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. equi</i>	TTTGAAACTGT	TAACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
<i>S. iniae</i>	TTTGAAACTGT	TAACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGA	
	721		780
<i>S. phocae</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. agalactiae</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. dysgalactiae</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCT	NGTCTGTA	ACTGAC
<i>S. canis</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. uberis</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. parauberis</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. pyogenes</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCT	NGTCTGTA	ACTGAC
<i>S. pneumoniae</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGG	CTNGTA	ACTGAC
<i>S. equi</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA	ACTGAC	
<i>S. iniae</i>	AATGCGTAGATATATGGAGGAAC	CCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCT	NGTCTGTA
	781		840
<i>S. phocae</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. agalactiae</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. dysgalactiae</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. canis</i>	GCTGAGGCTCGN	AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. uberis</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. parauberis</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. pyogenes</i>	GCTGAGGCTNG	GAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. pneumoniae</i>	GCTGAGGCTCGN	AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. equi</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA	
<i>S. iniae</i>	GCTGAGGCTCGAAA	AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTNGTAGTCCACGCCGTA	
	841		900
<i>S. phocae</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGACCC	TTTCCGGGGTTTAGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
<i>S. agalactiae</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. dysgalactiae</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. canis</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. uberis</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. parauberis</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. pyogenes</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. pneumoniae</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. equi</i>	AACGCTGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
<i>S. iniae</i>	AACGATGAGTGCTAGGTGTTAGCC	CTTTCCGGGGCTTAGTGCCGAGCTAACGCATTAA	
	901		960
<i>S. phocae</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCG		
<i>S. agalactiae</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		
<i>S. dysgalactiae</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		
<i>S. canis</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		
<i>S. uberis</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCG		
<i>S. parauberis</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCG		
<i>S. pyogenes</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		
<i>S. pneumoniae</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		
<i>S. equi</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCG		
<i>S. iniae</i>	GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-G		

961 1020

*S. phocae* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. agalactiae* CACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGNAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. dysgalactiae* CACAAGCGGTNGAGCATGTGTTNAATTCGAAGNAACGCGAAGAACCTNACCAGGTCTNG  
*S. canis* CACNAGCGGTGGAGCNITGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. uberis* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAACCGAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. parauberis* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. pyogenes* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTNNAATTCGAAGNAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. pneumoniae* CACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTNAATTCGAAGNAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. equi* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACAGCAGGAACCTTACCAGGTCTTG  
*S. iniae* CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTNNAATTCGAAGNAACGCGAAGAACCTNACCAGGTCTNG

1021 1080

*S. phocae* ACATCCTTCTGACCCGGCCTAGAGATAGGCTTTCTCTTCGGAGCAGAAGTGACAGGGTGG  
*S. agalactiae* ACATCCTTCTG-ACCGGCCTAGAGATAGGCTTTCTCTTCGGAGCAGAAGTGACAGG-TGG  
*S. dysgalactiae* ACATCCTCCTG-ACCGGTCTAGAGATAGACTNT--CTTCGGGGCAGGAGTGACAGG-TGG  
*S. canis* ACATCCCGATG-CCCGCTCTAGAGATAGAGTNTACTTCCGGTACATCGGTGACAGG-TGG  
*S. uberis* ACATCCCGATG-CCCGCTCTAGAGATAGAGCTTTACTTCCGGTACATCGGTGACAGG-TGG  
*S. parauberis* ACATCCTTCTG-ACCGTCTTAGAGATAGGACTTTCCTTCGGGACAGAGGTGACAGG-TGG  
*S. pyogenes* ACATCCCGATG-CCCGCTNTAGAGATAGAGTNTACTTCCGGTNCATCGGTNACAGG-TNG  
*S. pneumoniae* ACATCCTTCTG-ACGACTCTAGAGATAGAGTNTTNCCTTCGGGACAGAGGNGACAGG-TGG  
*S. equi* ACATCCCGATG-CTATTCTTAGAGATAAGAGTTACTTCCGGTAGATTGGAGACAGG-TGG  
*S. iniae* ACATCCTTNG-ACCGTCTTAGAGATAGGCTTNTCTTCGGGACAGAGGAGACAGG-TGG

1081 1140

*S. phocae* TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. agalactiae* TGCATNGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. dysgalactiae* NGCATNGTNGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. canis* TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. uberis* TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. parauberis* TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. pyogenes* NGCATNGTNGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. pneumoniae* NGCATNGTNGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. equi* TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGLAACGAGCGCAA  
*S. iniae* NGCATGGTNGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTNAGTCCCGLAACGAGCGCNA

1141 1200

*S. phocae* CCCCTATTGTCTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAA  
*S. agalactiae* CCCCTATTGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATNAA  
*S. dysgalactiae* CCCCTNITGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTINATNAA  
*S. canis* CCCCTNITGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAA  
*S. uberis* CCCCTATTGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAA  
*S. parauberis* CCCCTATTGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAA  
*S. pyogenes* CCCCTNITGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTINATNAA  
*S. pneumoniae* CCCNITATTGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATNAA  
*S. equi* CCCCTATTGT-TAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAAA  
*S. iniae* CCCCTNITGT-TAGTTGCCATCATNAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTINATAAAA

1201 1260

*S. phocae* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTKGGGCTACACAC  
*S. agalactiae* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-NGGCTACACAC  
*S. dysgalactiae* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-NGGCTACACAC  
*S. canis* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-GGGCTACACAC  
*S. uberis* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-GGGCTACACAC  
*S. parauberis* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-GGGCTACACAC  
*S. pyogenes* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTNATGACCT-NGGCTACACAC  
*S. pneumoniae* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-GGGCTACACAC  
*S. equi* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-GGGCTACACAC  
*S. iniae* CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT-NGGCTACACNC

	1261		1320
<i>S. phocae</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGTTCGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAA		
<i>S. agalactiae</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAA		
<i>S. dysgalactiae</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAA		
<i>S. canis</i>	GTGCTACATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAA		
<i>S. uberis</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAA		
<i>S. parauberis</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAAA		
<i>S. pyogenes</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTANAA		
<i>S. pneumoniae</i>	GTGCTACATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTTAA		
<i>S. equi</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACAACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAA		
<i>S. iniae</i>	GTGCTACAATGGTTGGTACACGAGT-CGCAAGCCGGTGACGGCAAGCTAATCTCTGAAA		
	1321		1380
<i>S. phocae</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. agalactiae</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. dysgalactiae</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. canis</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. uberis</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. parauberis</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. pyogenes</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. pneumoniae</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. equi</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
<i>S. iniae</i>	GCCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTA		
	1381		1440
<i>S. phocae</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGCMGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACMACACCGCCCGTB		
<i>S. agalactiae</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. dysgalactiae</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. canis</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. uberis</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. parauberis</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. pyogenes</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. pneumoniae</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. equi</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
<i>S. iniae</i>	ATCGCGGATCAGCACGCCGC-GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA-CACCGCCCGTC		
	1441		1500
<i>S. phocae</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCC		
<i>S. agalactiae</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
<i>S. dysgalactiae</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
<i>S. canis</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
<i>S. uberis</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCC		
<i>S. parauberis</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGANGTCCGGTGAGGTAACCTAATAGGAGCC-----		
<i>S. pyogenes</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
<i>S. pneumoniae</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
<i>S. equi</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTAATAGGAGCCAGCCGCC		
<i>S. iniae</i>	ACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGA-----		
	1501		1560
<i>S. phocae</i>	TAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGG		
<i>S. agalactiae</i>	-----		
<i>S. dysgalactiae</i>	-----		
<i>S. canis</i>	-----		
<i>S. uberis</i>	TAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-----		
<i>S. parauberis</i>	-----		
<i>S. pyogenes</i>	-----		
<i>S. pneumoniae</i>	-----		
<i>S. equi</i>	TAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-----		
<i>S. iniae</i>	-----		

	1561	1573
<i>S. phocae</i>	CTGGATCACCTCC	
<i>S. agalactiae</i>	-----	
<i>S. dysgalactiae</i>	-----	
<i>S. canis</i>	-----	
<i>S. uberis</i>	-----	
<i>S. parauberis</i>	-----	
<i>S. pyogenes</i>	-----	
<i>S. pneumoniae</i>	-----	
<i>S. equi</i>	-----	
<i>S. iniae</i>	-----	

Eine weitergehende Analyse des 16S rRNA-Gens der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 erfolgte durch Vergleich der Sequenz der V2-Region mit der Sequenz von 33 weiteren V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies und Subspezies. Die Basensequenzen der V2-Regionen sind in Abbildung 13 dargestellt. Dabei zeigte die V2-Region von *S. phocae* 8399 H1 einen Unterschied von vier Basenpaaren im Vergleich zur V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. sobrinus* DSM 20742 (geringster Unterschied) und einen Unterschied von 16 Basenpaaren im Vergleich zur V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. macacae* NCTC 11558 (größter Unterschied).

Abb. 13: Vergleich der Nukleotidsequenzen der V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* mit 33 weiteren V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies.

Sequenz der V2-Region	Spezies und Stammnamen*
TAAGAAGAGTAAACACATGTTAATTC . . . . .	<i>S. phocae</i> NCTC 12719
TAAGAGTAAATTAACACATGTTAGTTT . . . . .	<i>S. agalactiae</i> NCDO 1348
TAATAGTGTTTACTGTCATGGTNAACA . . . . .	<i>S. acidominimus</i> NCDO 2025
TAACAGCTTTTGACACATGTTAGAAG . . . . .	<i>S. alactolyticus</i> NCDO 1091
TAACAGTATGTAACACATGTTAGATG . . . . .	<i>S. anginosus</i> NCTC 10713
TAACAGCATTTAACACATGTTAGATG . . . . .	<i>S. bovis</i> NCDO 597
TAAAAGTGCTTAAACACATGTTAAGAA . . . . .	<i>S. canis</i> DSM 20770
TNAGAACATTTACTGTCATNGTAGATG . . . . .	<i>S. constellatus</i> NCTC 11324
TAATAGTGATCAACTCATGTCAATNA . . . . .	<i>S. cricetus</i> NCDO 2720
TGAGAGTGTTTAACACATGTTAGAGA . . . . .	<i>S. downei</i> NCTC 11391
TGACAATGGAGGACCCATGTCTTTCA . . . . .	<i>S. dysgalactiae</i> NCDO 2023
TAAAAGTGGTTGACCCATGTTAACCA . . . . .	<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> 19
TAAAAGTGGTTGACCCATGTTAACTA . . . . .	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 500
TAAAAGCCAATGACCCATGTCAATTGG . . . . .	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 631
TAACAGCATTTAACACATGTTAGATG . . . . .	<i>S. equinus</i> NCDO 1037
TAAGAGGTAATNACACATGTTNTTNG . . . . .	<i>S. hyointestinalis</i> NCTC 20770
TGACACTAGAGTACACATGTACTNAA . . . . .	<i>S. iniae</i> NCDO 2722
TAAGAACATTTACTGTCATNGTAGATG . . . . .	<i>S. intermedius</i> NCTC 11324
TAATATCTCTCTAAGCCTTTAGAGGG . . . . .	<i>S. macacae</i> NCTC 11558
TAATATTNATTATTGCATGATNATNN . . . . .	<i>S. mutans</i> NCTC 10449
TAAGAGTAGATGTTGCATGACATTTA . . . . .	<i>S. oralis</i> NCTC 11427
TAAAAGTCGATATCGCATGATATTGA . . . . .	<i>S. parasanguis</i> GIFU 8099
TGACAATTAAGTACTCATGTACTAAA . . . . .	<i>S. parauberis</i> 1348
TAAGAGTAGATGTTGCATGACATTTG . . . . .	<i>S. pneumoniae</i> NCTC 7465
TGAAAGTAGAAGACACATGTCAICTN . . . . .	<i>S. porcinus</i> NCDO 600
TAAGAGAGACTAACGCATGTNAGTNA . . . . .	<i>S. pyogenes</i> NCDO 2381
TAAGAGAGTTNAACACATGTTAGACG . . . . .	<i>S. rattus</i> NCDO 2723
TAACAATGGATGACACATGTCAITTA . . . . .	<i>S. salivarius</i> NCDO 1779
TAAAATAGATTTNTTGCATGATNANNN . . . . .	<i>S. sanguis</i> AF003928
TAAGAGGAGTTAACTCATGTTAACTG . . . . .	<i>S. sobrinus</i> DSM 20742
TAACAGTATTTACCGCATGGTAGATC . . . . .	<i>S. suis</i> NCTC 10237
TAACNATGGATGACACATGTNATNNN . . . . .	<i>S. thermophilus</i> NCDO 573
TGACAATAGGGTACACATGTACCCTA . . . . .	<i>S. uberis</i> ATCC 27958
TAACAATAGGTGACACATGTCAITTA . . . . .	<i>S. vestibularis</i> NCTC 12166

Die im Vergleich zur V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* abweichenden Nukleotidsequenzen sind schwarz markiert

\* Zugangsnummern der Gendatenbank und Referenzen siehe Tab. 14



Tabelle 14: Zugangsnummern der Gendatenbank und Referenzen

Spezies und Stammnamen	Zugangs-Nr.	Referenzen
<i>S. phocae</i> NCTC 12719	AF235052	Vossen / Abdulmawjood, 1999
<i>S. agalactiae</i> NCDO 1348	X59032	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. acidominimus</i> NCDO 2025	X58301	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. alactolyticus</i> NCDO 1091	X58301	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. anginosus</i> NCTC 10713	X58309	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. bovis</i> NCDO 597	X58317	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. canis</i> DSM 20770	X59061	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. constellatus</i> NCTC 11324	X58310	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. cricetus</i> NCDO 2720	X58305	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. downei</i> NCTC 11391	X58306	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. dysgalactiae</i> NCDO 2023	X59030	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> 19	AF073812	Abdulmawjood / Lämmler, 2000
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 500	AF073814	Abdulmawjood / Lämmler, 2000
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> 631	AF07381	Abdulmawjood / Lämmler, 2000
<i>S. equinus</i> NCDO 1037	X58318	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. hyointestinalis</i> NCTC 20770	X58313	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. iniae</i> NCDO 2722	X58316	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. intermedius</i> NCTC 11324	X58311	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. macacae</i> NCTC 11558	X58302	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. mutans</i> NCTC 10449	X58303	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. oralis</i> NCTC 11427	X58308	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. parasanguis</i> GIFU 8099	AB006125	Sultana et al., 1998
<i>S. parauberis</i> 1348	X89967	Domenech et al., 1996
<i>S. pneumoniae</i> NCTC 7465	X58312	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. porcinus</i> NCDO 600	X58315	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. pyogenes</i> NCDO 2381	X59029	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. rattus</i> NCDO 2723	X58304	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. salivarius</i> NCDO 1779	X58320	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. sanguis</i> AF003928	AF003928	Elmer et al., 1997
<i>S. sobrinus</i> DSM 20742	X58307	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. suis</i> NCTC 10237	X59031	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. thermophilus</i> NCDO 573	X59028	Bentley / Leigh, 1995
<i>S. uberis</i> ATCC 27958	U41048	Brown / Brown, 1995
<i>S. vestibularis</i> NCTC 12166	X58321	Bentley / Leigh, 1995

In einer Dendrogrammanalyse der 26 Basen der V2-Region der 16S rRNA-Gene ergab sich die größte Ähnlichkeit in der Sequenz von *S. phocae* innerhalb von 32 V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies und Subspezies zu der Sequenz von *S. sobrinus*. Den größten euklidischen Abstand von 118,2 wies die V2-Region von *S. phocae* zu der V2-Region von *S. macacae* auf. Die Dendrogrammanalyse ist in Abbildung 14 dargestellt.

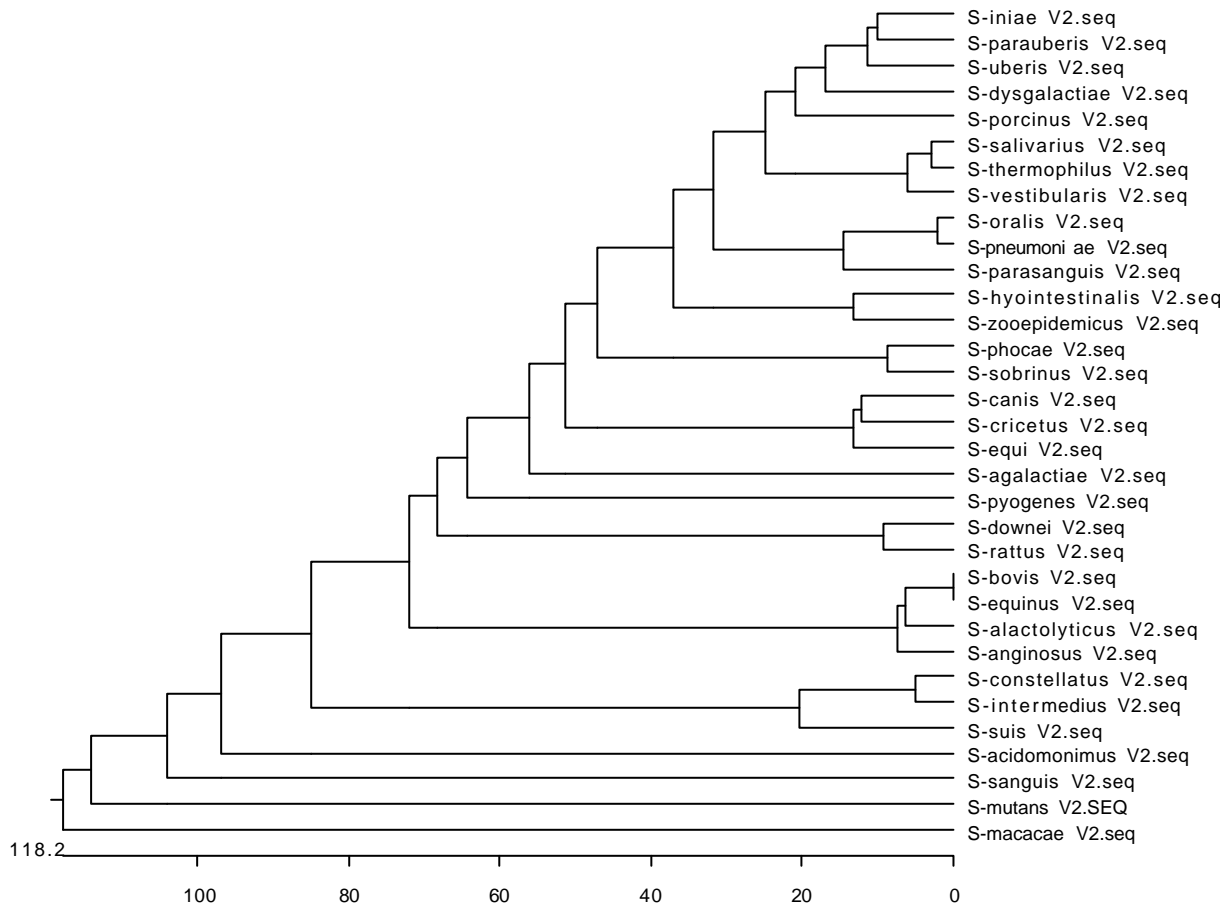


Abb. 14: Dendrogrammanalyse der V2-Region von *S. phocae* und von 32 weiteren Streptokokkenspezies

Das 16S rRNA-Gen ermöglichte im Weiteren eine Charakterisierung der 69 zuvor als *S. phocae* und der drei als *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L identifizierten Kulturen. Mit den unter 3.4.2.6.4.1 angegebenen universellen Oligonukleotidprimern konnte bei allen Bakterienkulturen der vorliegenden Arbeit das 16S rRNA-Gen durch PCR amplifiziert werden. Die Amplikons aller untersuchten C-, F- und L-Streptokokken waren einheitlich und wiesen eine Größe von ca. 1450 Basenpaaren auf (Abbildung 15 und 16).

Eine Überprüfung der Spezifität der 16S rRNA-Amplifikate erfolgte durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *EaeI* und *HincII*. Die 16S rRNA-Gene aller untersuchten C- und F-Streptokokkenkulturen der vorliegenden Arbeit sowie der *S. phocae*-Referenzkulturen 8399 H1 und 8190 R2 zeigten, entsprechend der Computeranimation, mit dem Enzym *EaeI* zwei Schnittstellen. Die Größe der entstandenen drei DNA-Fragmente betrug 180, 370 und 900 Basenpaare (Abb. 15). Das 16S rRNA-Gen aller drei L-Streptokokkenkulturen, die von Kegelrobben (n=2) und einem Seehund (n=1) isoliert worden waren, zeigte mit dem Enzym *EaeI* nur eine Schnittstelle. Die beiden Fragmente waren 550 und 900 Basenpaare groß.

Bei Verdau mit dem Enzym *HincII* zeigte das 16S rRNA-Gen aller untersuchten C- und F-Streptokokkenkulturen sowie der *S. phocae*-Referenzkulturen 8399 H1 und 8190 R2 eine Schnittstelle und zwei Fragmente mit einer Größe von 180 und 1270 Basenpaaren (Abb. 16). Der Verdau des 16S rRNA-Gens der L-Streptokokkenkulturen mit dem Enzym *HincII* ergab ebenfalls zwei Fragmente mit einer Größe von 550 und 900 Basenpaaren.

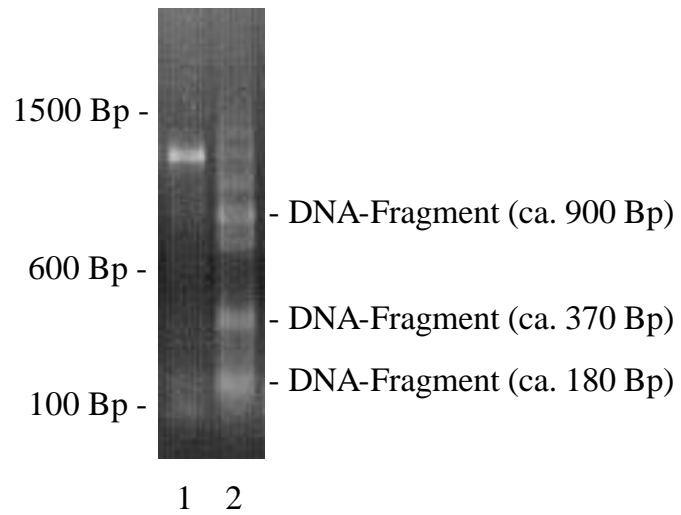


Abb. 15: Amplikon des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* vor und nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *EarI*; *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 vor (1) und nach Restriktionsverdau (2). Als Marker diente ein Molekulargewichtsstandard (100 Bp DNA Ladder, Gibco, Eggenstein).

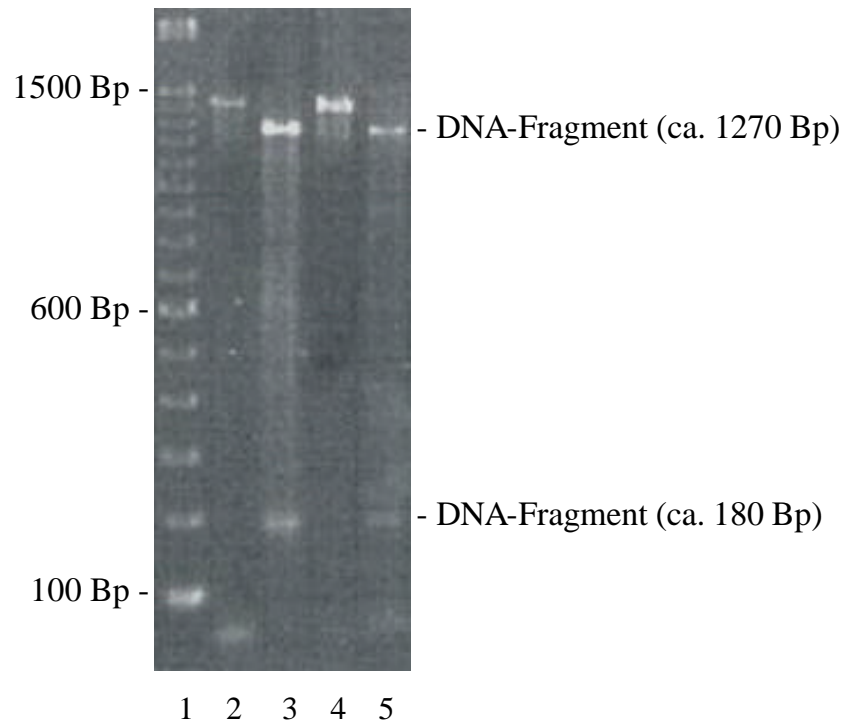


Abb. 16: Amplikon des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* vor und nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *HincII*; *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 vor (2) und nach Restriktionsverdau (3); *S. phocae*-Referenzkultur 8190 R2 vor (4) und nach Restriktionsverdau (5). Marker (1) siehe Abb. 15.

Eine weitere Charakterisierung der *S. phocae*-Kulturen erfolgte mit Hilfe der beiden unter 3.4.2.6.6 beschriebenen *S. phocae*-spezifischen Oligonukleotidprimer PX 1 und PX 2. Die Primer wurden nach Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens (3.4.2.6.3.2) mit Hilfe des Programms OLIGO Primer Analysis Software erstellt. Mit diesen Primern konnten speziesspezifische Abschnitte des 16S rRNA-Gens der *S. phocae*-Referenzkulturen 8399 H1 und 8190 R2 und bei allen zuvor als *S. phocae* identifizierten Kulturen mit einer Größe von 560 Basenpaaren amplifiziert werden. Bei den vergleichsweise untersuchten Kulturen *S. agalactiae* 18RS 21 (II), *S. agalactiae* 090 (Ia), *S. canis* G2176, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 50, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar G 22, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L 2074, *S. equi* subsp. *equi* 66, *S. equi* subsp. *equi* 69, *S. equi* subsp. *equi* CF32, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* 68, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60, *S. parauberis* NCDO 2020, *S. parauberis* M33, *S. porcinus* E ATCC 12390, *S. porcinus* P 9824, *S. porcinus* U 1790, *S. porcinus* V 63940, *S. pyogenes* 282, *S. suis* SS1, *S. suis* SS2, *S. uberis* NCDO 2022 und *S. uberis* NCDO 2038 ließ sich kein Amplikon darstellen (Abb. 17).

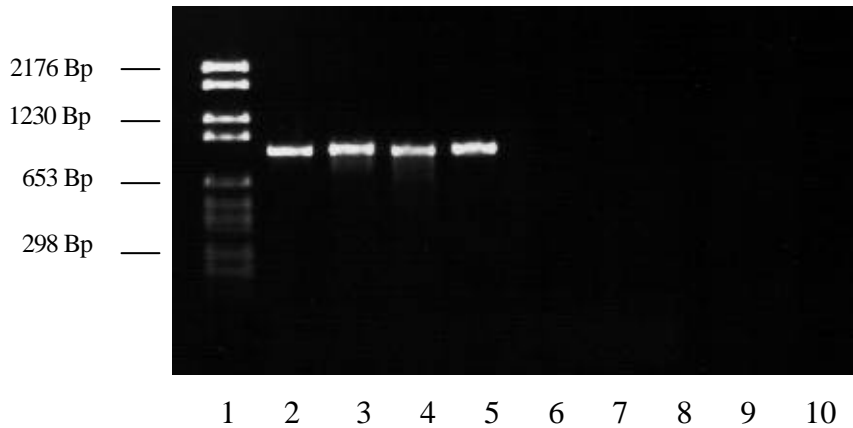


Abb. 17: Typisches Amplikon der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 (2), der *S. phocae*-Serogruppe F-Kultur P4M, isoliert von einem Seehund (3), der *S. phocae*-Serogruppe C-Kultur P37J, isoliert von einem Seehund (4) und der *S. phocae*-Serogruppe F-Kultur H1J, isoliert von einer Kegelrobbe (5); als Kontrolle dienten *S. equi* subsp. *equi* CF32 (6), *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60 (7), *S. agalactiae* 18RS21 (8), *S. canis* G2176 (9) und ein Leerwert (10). Als Marker (1) dienten pBR328 DNA/*Bgl* I und pBR328 DNA/*Hinf* I Fragmente (0,15-2,1 kbp, Roche).

### 4.3 Weitere phänotypische Eigenschaften

Nach Anzucht der 72 Streptokokkenkulturen nach 3.4.1 in Flüssigmedium (THB) konnten zwei verschiedene Wachstumsformen unterschieden werden. Von den 69 *S. phocae*-Kulturen zeigten 66 Kulturen (95,7 %) nach 24h und 62 Kulturen (89,9 %) nach 48h in Flüssigmedium ein Wachstum mit wattigem bis körnigen Bodensatz bei gleichzeitig klarem Überstand (klar). Im Gegensatz dazu bildeten drei Kulturen (4,3%) nach 24h und 7 Kulturen (10,1%) nach 48h einen Bodensatz, wobei der Überstand gleichzeitig leicht getrübt war (klar-trüb).

Von den drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen zeigten zwei Kulturen (66,7%) nach 24h und 48h in Flüssigmedium ein Wachstum mit wattigem bis körnigen Bodensatz bei gleichzeitig klarem Überstand (klar). Im Gegensatz dazu bildete eine Kultur (33,3%) nach 24h und 48h einen Bodensatz, wobei der Überstand gleichzeitig leicht getrübt war (klar-trüb).

Bei der Anzuchtung in Soft-Agar (3.4.3.3) zeigten 66 der 69 *S. phocae*-Kulturen (95,7%) ein kompaktes und drei *S. phocae*-Kulturen (4,3%) ein kompakt-diffuses Wachstum (Abb. 18). Von den drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen wiesen zwei Kulturen (66,7%) ein kompaktes und eine Kultur (33,3%) ein kompakt-diffuses Wachstum auf. In Abbildung 17 sind die zwei unterschiedlichen Wachstumsformen dargestellt.



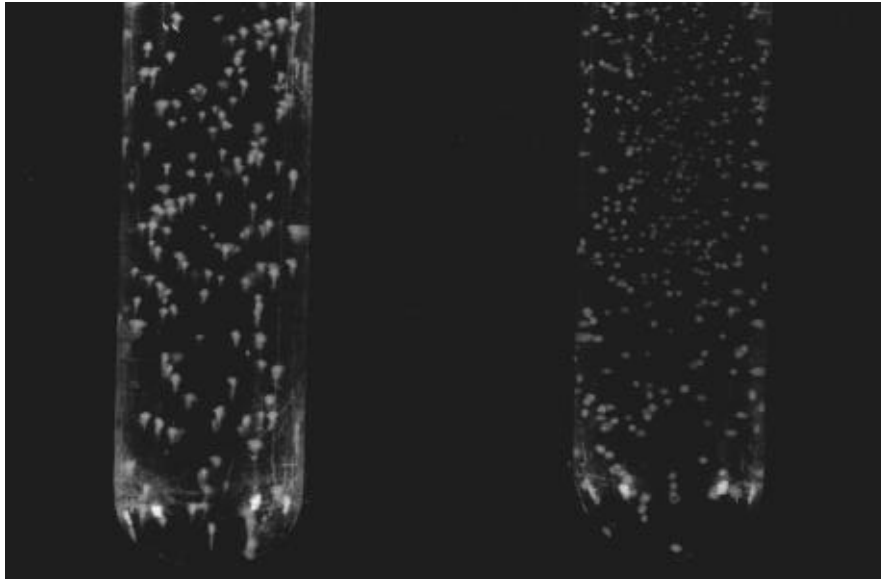


Abb. 18: Kolonienmorphologie der *S. phocae*-Kulturen nach Anzuchtung in Soft-Agar mit kompakt-diffusem Kolonienwachstum (links) sowie kompaktem Kolonienwachstum (rechts).

Die Beziehungen der Wachstumsformen in Flüssigmedium und Soft-Agar zueinander sind in Tabelle 15 dargestellt. Die *S. phocae*-Kulturen mit watteartigem bis körnigem Bodensatz und klarem Überstand in Flüssigmedium zeigten überwiegend ein kompaktes Wachstum in Soft-Agar.

Tab. 15: Beziehungen zwischen den Wachstumsformen der 69 *S. phocae*- und der drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolate in Flüssigmedium und Soft-Agar

Wachstum in Flüssigmedium nach 24h		Kolonienmorphologie in Soft-Agar		
			kompakt	kompakt-diffus
<i>S. phocae</i>		n=69	66 (95,7%)	3 (4,3%)
	klar	66 (95,7%)*	64	2
	klar-trüb	3 (4,3%)	2	1
<hr/>				
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> Serovar L		n=3	2 (66,7%)	1 (33,3%)
	klar	2 (66,7%)	2	0
	klar-trüb	1 (33,3%)	0	1

n = Anzahl der Kulturen

\* = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

Zur Untersuchung von Oberflächeneigenschaften der Kulturen wurde der Salzaggregationstest (3.4.3.3) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wiesen 34 der *S. phocae*-Kulturen (49,3%) bereits eine Aggregation in Phosphatpuffer auf. Weitere 29 Kulturen (42,0%) aggregierten bei der getesteten Ammoniumsulfatkonzentration von 0,1 mol/l. Bei einer Konzentration von 0,2 mol/l aggregierten drei weitere Kulturen (4,3%), bei 0,4 mol/l zeigten zwei

weitere Kulturen (2,9%) und bei einer Konzentration von 1,8 mol/l eine weitere Kultur (1,4%) eine Aggregation.

Von den drei L-Streptokokken aggregierte eine Kultur (33,3%) in Phosphatpuffer und die zwei weiteren Kulturen (66,7%) bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,1 mol/l. Die Beziehung zwischen dem Wachstum der Kulturen in Flüssigmedium und den Ergebnissen des Salz-Aggregationstests sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Beziehungen zwischen den Wachstumsformen der Isolate in Flüssigmedium und den Ergebnissen des Salzaggregationstests

Wachstum in Flüssigmedium nach 24h			Salzaggregation				
			Phosphatpuffer	0,1 mol/l**	0,2 mol/l	0,4 mol/l	1,8 mol/l
<i>S. phocae</i>		n=69	34(49,3%)	29 (42%)	3(4,3%)	2(2,9%)	1(1,4%)
	klar	66 (95,7%)*	32	28	3	2	1
	klar-trüb	3 (4,3%)	2	1	0	0	0
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> Serovar L		n=3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	klar	2 (66,7%)	0	2	0	0	0
	klar-trüb	1 (33,3%)	1	0	0	0	0

n = Anzahl der Kulturen

\* = Anzahl der Kulturen (%) mit den jeweiligen Eigenschaften

\*\* = Molaritäten der verwendeten Ammoniumsulfatlösungen

#### 4.4 Antibiotikaempfindlichkeiten

Alle nach 3.4.3.4 untersuchten 69 *S. phocae*-Kulturen waren empfindlich gegenüber Amoxicillin / Clavulansäure, Bacitracin (0,04 IE), Bacitracin (10 IE), Cefacetil, Cefotaxim, Cefoxitin, Clindamycin, Erythromycin, Minocyclin, Ofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Piperacillin, Sulfamethoxazol / Trimethoprim und Tetracyclin. Im Weiteren wiesen alle 69 Kulturen eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Nalidixinsäure auf. Gegenüber Gentamicin konnte bei 37 der *S. phocae*-Kulturen (53,6 %) eine intermediäre Reaktion und bei 32 Kulturen (46,4 %) eine Empfindlichkeit festgestellt werden. Eine Streptomycin-Resistenz zeigten nahezu alle *S. phocae*-Kulturen (68 Kulturen, 98,6 %). Nur eine Kultur (1,4 %) wies eine intermediäre Reaktion gegenüber diesem Antibiotikum auf.

Die untersuchten L-Streptokokken waren empfindlich gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Bacitracin (0,04 IE), Bacitracin (10 IE), Cefacetil, Cefotaxim, Cefoxitin, Clindamycin, Erythromycin, Minocyclin, Ofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Piperacillin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Tetracyclin. Im Weiteren zeigten alle L-Streptokokken eine Resistenz gegenüber Kanamycin, Nalidixinsäure und Streptomycin. Gegenüber Gentamicin war eine Kultur (33,3 %) empfindlich und 2 Kulturen (66,7 %) resistent.

In Tabelle 17 sind die Antibiotikaempfindlichkeiten der untersuchten Kulturen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 17: Antibiotikaempfindlichkeiten der 69 untersuchten *S. phocae*- und der drei untersuchten *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen

Antibiotikum	<i>S. phocae</i> (n=69)			<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> Serovar L (n=3)		
	resistent	intermediär	empfindlich	resistent	intermediär	empfindlich
Amoxicillin / Clavulansäure	0* (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Bacitracin (0,04 IE)	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Bacitracin (10 IE)	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Cefacetril	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Cefotaxim	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Cefoxitin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Clindamycin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Erythromycin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Gentamicin	0 (0 %)	37 (53,6%)	32 (46,4%)	2 (66,7 %)	0 (0 %)	1 (33,3 %)
Kanamycin	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Minocyclin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Nalidixinsäure	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Ofloxacin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Oxacillin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Penicillin G	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Piperacillin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Streptomycin	68 (98,6%)	1 (1,4 %)	0 (0 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0%)
Sulfamethoxazol / Trimethoprim	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)
Tetracyclin	0 (0 %)	0 (0 %)	69 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (100 %)

\* = Anzahl der Kulturen (%)

#### 4.5 Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA

Die chromosomale DNA der 69 *S. phocae*-Kulturen konnte nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *ApaI* mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt und verglichen werden. Die DNA-Fragmentmuster der isolierten Kulturen waren teilweise identisch, bei Isolaten eines Tieres und bei Isolaten verschiedener Tiere. Die meisten DNA-Fragmentmuster, auch bei Isolaten eines Tieres, waren nicht identisch.

Insgesamt zeigte ein Vergleich der DNA-Bandenmuster von 66 untersuchten *S. phocae*-Kulturen, die von Kegelrobben und Seehunden isoliert worden waren, 29 verschiedene DNA-Fragmentmuster. Bei drei Kulturen war kein PFGE-Muster erstellbar (Tabelle 18).

Tab. 18: DNA-Restriktionsgruppenzugehörigkeit der 69 *S. phocae*-Kulturen, isoliert von Seehunden und Kegelrobben, nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*

<b>Kulturschlüssel</b>	<b>Organ</b>	<b>Restriktions- gruppe</b>
P1J	Lunge	I
P2L	Milz	II
P3I	Leber	III
P3L	Milz	III
P4I	Leber	III
P4J	Lunge	III
P4L	Milz	III
P4M	Niere	III
P5I	Leber	IV
P6C	Darm	III

Fortsetzung Tab. 18

<b>Kulturschlüssel</b>	<b>Organ</b>	<b>Restriktions- gruppe</b>
P7J	Lunge	V
P8J	Tp. Lunge	-
P9J	Lunge	VI
P10J	Lunge	VII
P11G	Tp. Gelenk	VII
P11J	Lunge	VIII
P12J	Tp. Lunge	-
P13E	Hinterextremität	I
P14G	Tp. Gelenk	IX
P15G	Tp. Gelenk	X
P16G	Tp. Gelenk	II
P16I	Leber	XI
P16J	Lunge	II
P17J	Tp. Lunge	XII
P18A	After	X
P19J	Lunge	XIII
P20I	Leber	XIV
P21J1	Lunge	IV
P21J2	Tp. Lunge	IV
P22I	Leber	XIII
P22J	Lunge	XIII
P22L	Milz	XV
P23H	Haut	XI
P24B	Tp. Auge	VI
P25N	Tp. Zunge	I
P26J	Lunge	XVI
P27B	Auge	XVII
P27F	Fett	XVIII
P27J	Lunge	XVIII
P27L	Milz	XVIII
P28B	Tp. Auge	XIX
P29B	Tp. Auge	VIII
P30N	Lungenabszeß	XX
P31B	Tp. Auge	XXI
P32I	Leber	X

Fortsetzung Tab. 18

<b>Kulturschlüssel</b>	<b>Organ</b>	<b>Restriktions- gruppe</b>
P33J1	Lunge	VII
P33J2	Lunge	XXII
P34I	Leber	XXIII
P34J	Lunge	VII
P34M	Niere	VII
P35J1	Lunge	II
P35J2	Lunge	XXV
P35H	Hautabszeß	XXIV
P36C	Darm	XVI
P37J	Lunge	X
P38I	Leber	XVIII
P38J1	Lunge	XVIII
P38J2	Lunge	XX
P38B	Tp. Auge	XVIII
P39B	Tp. Auge	-
H1J	Lunge	XXVI
H2D	Darm/Daly	XXVII
H2I1	Leber	XXVII
H2J1	Lunge	XXVII
H2J2	Lunge	XXVII
H2M	Niere	XXVIII
H2N	Zunge	XXVIII
H3J	Lunge	XXVII
H4K	Tp. Maul	XXIX

Tp. = Tupfer; -= DNA der Kultur mittels PFGE nicht auftrennbar

Ein Vergleich der DNA-Fragmentmuster der *S. phocae*-Kulturen von Seehunden und Kegelrobben, die aus unterschiedlichen Organen eines Tieres isoliert worden waren (Tab. 7), zeigte bei drei Tieren (P11, P33, P35) Fragmentmuster, die sich jeweils voneinander unterschieden. In Abbildung 19 sind beispielhaft die



unterschiedlichen Restriktionsmuster der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P35, dargestellt. Bei sechs Tieren (P16, P22, P27, P34, P38, H2), bei denen aus unterschiedlichen Organen *S. phocae*-Kulturen isoliert werden konnten, waren sowohl Kulturen mit völlig identischem DNA-Fragmentmuster, als auch Kulturen mit unterschiedlichen DNA-Fragmentmustern nachweisbar. In Abbildung 20 sind verschiedene und identische Restriktionsmuster der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus unterschiedlichen Organen des Seehund P27, aufgeführt. Außerdem wurden *S. phocae*-Kulturen von Tieren aus verschiedenen Organen isoliert, die alle identische DNA-Fragmentmuster aufwiesen. Letzteres war bei drei Tieren (P3, P4, P21) der Fall (Abb. 21).

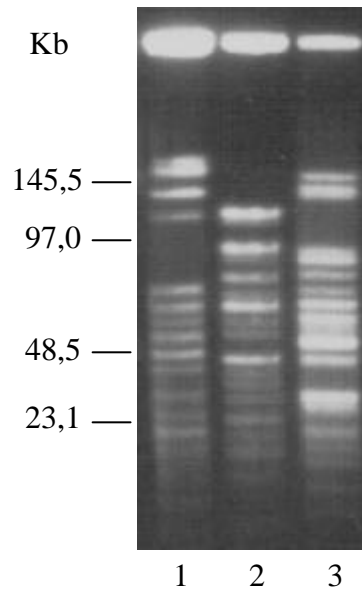


Abb. 19: Unterschiedliche DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von drei *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P35 (siehe Tab. 7) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I. P35H (1), P35J1 (2) und P35J2 (3).

Als Marker dienten  $\lambda$  DNA/*Hind* III Fragmente (0,1-200) kb, Sigma) und  $\lambda$  DNA Konkatemere (50-1000 kb, Sigma).

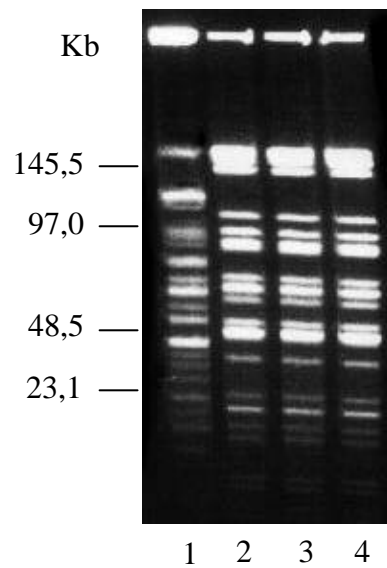


Abb. 20: DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P27 (siehe Tab. 7) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*; abweichendes DNA-Fragmentmuster: P27B (1), übereinstimmende DNA-Fragmentmuster: P27L (2), P27J (3) und P27F (4).  
Marker siehe Abb. 19.

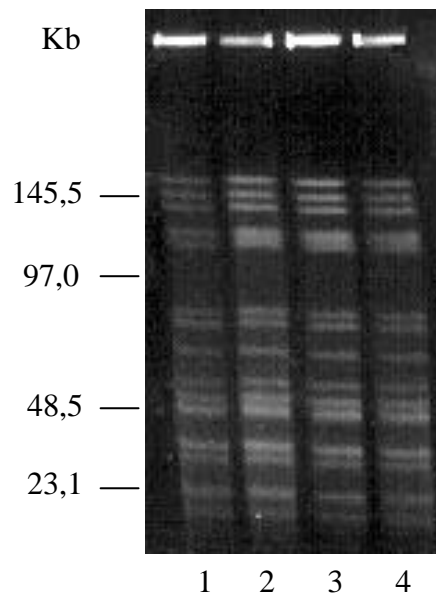


Abb. 21: Typisches einheitliches DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P4 (siehe Tab. 7) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I. P4M (1), P4J (2) P4I (3) und P4L (4).  
Marker siehe Abb. 19.

Bei *S. phocae*-Kulturen, die von unterschiedlichen Tieren stammten, waren teilweise vollständig identische, überwiegend aber verschiedene DNA-Fragmentmuster nachweisbar. In Abbildung 22 sind zwei vollständig identische DNA-Fragmentmuster dargestellt, die aus unterschiedlichen Organen verschiedener Tiere isoliert worden waren. Abbildung 23 zeigt DNA-Fragmentmuster von Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Tiere, die sich alle unterschieden.

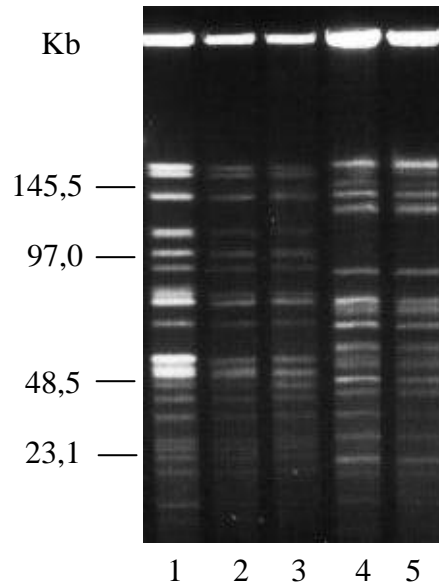


Abb. 22: Identische DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus unterschiedlichen Organen verschiedener Seehunde (P5, P21, P26 und P36) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I. Identisch sind die Isolate P21J2 (1), P21J1 (2) und P5I (3) bzw. die Isolate P36C (4) und P26J (5).  
Marker siehe Abb. 19.

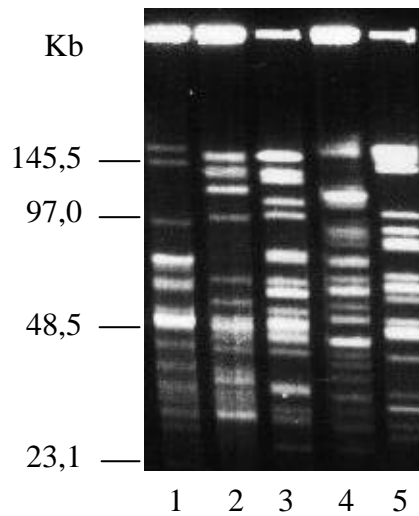


Abb. 23: Unterschiedliche DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Seehunde (P24, P27, P30 und P37) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*. P30N (1), P37J (2), P24B (3), P27B (4) und P27L (5).

Marker siehe Abb. 19.

Die 9 *S. phocae*-Kulturen, die von vier Kegelrobben isoliert worden waren, wurden ebenso nach Restriktionsverdau der chromosomalen DNA mit dem Enzym *ApaI* untersucht. Dabei wurden vier verschiedene DNA-Fragmentmuster nachgewiesen.

Bei einer Kegelrobbe (Tier H2) konnten sechs *S. phocae*-Kulturen aus verschiedenen Organen isoliert werden. Innerhalb dieser sechs Kulturen wiesen die Kulturen H2M und H2N ein vollständig übereinstimmendes DNA-Fragmentmuster auf. Ebenfalls vollständig übereinstimmend waren die DNA-Fragmentmuster der verbleibenden vier Kulturen von Tier H2 (H2I1, H2J1, H2J2, und H2D). Bei der Kegelrobbe H2 konnten somit zwei unterschiedliche Bakterienstämme nachgewiesen werden (Abbildung 24).

Eines der beiden DNA-Fragmentmuster der *S. phocae*-Kulturen, die von der Kegelrobbe H2 isoliert worden waren, zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit dem DNA-Fragmentmuster der *S. phocae*-Kultur, die von Kegelrobbe H3 isoliert werden konnte (Abbildung 24).

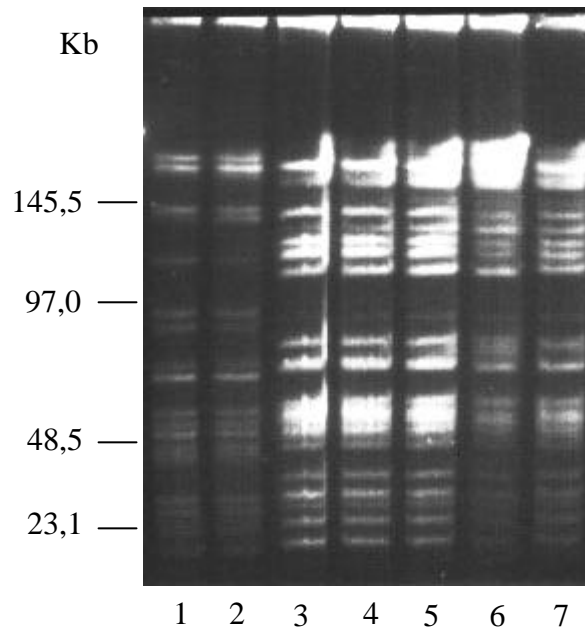


Abb. 24: DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Kegelrobbe H2 und H3 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I. Identisch waren die Isolate H2M (1) und H2N (2) sowie die Isolate H2I1 (3), H2J2 (4), H2J1 (5), H2D (6) und H3J (7).  
Marker siehe Abb. 19.

Die Fragmentmuster der beiden weiteren von den Kegelrobben H1 und H4 isolierten *S. phocae*-Kulturen H1J und H4K zeigten keine Übereinstimmung

untereinander und zu den Fragmentmustern der anderen von Kegelrobben isolierten *S. phocae*-Kulturen.

Für einen Vergleich der drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolate (P35I, H2I2, H2L), die in der vorliegenden Arbeit von einem Seehund und einer Kegelrobbe isoliert worden waren, wurde zunächst ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *ApaI* durchgeführt. Die beiden DNA-Fragmentmuster der zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolate aus Leber (H2I2) und Milz (H2L) der Kegelrobbe H2 zeigten eine vollständige Übereinstimmung. Das Fragmentmuster des L-Streptokokkenisolates P35I vom Seehund P35 unterschied sich von denen, die von der Kegelrobbe H2 isoliert worden waren. Es zeigte sich keine Beziehung zwischen den Fragmentmustern von dem L-Streptokokkenisolat aus der Nordsee (P35I) und den L-Streptokokkenisolaten aus der Ostsee (H2I2 und H2L) (Abbildung 25).

Die DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Arbeit wurden mit DNA-Fragmentmustern von drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, die von einem Schweinswal aus der Nordsee (Schweinswal P; Leber 18865) und zwei Schweinswalen aus der Ostsee (Schweinswal C, Lunge 17408 und Schweinswal H, Lunge 18263) isoliert worden waren, vergleichend untersucht.

Ein Vergleich des DNA-Fragmentmusters des *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolates P35I von Seehund P35 mit dem Fragmentmuster des L-Streptokokkenisolates vom Schweinswal P (Leber 18865) aus der Nordsee zeigte einen Unterschied von vier DNA-Fragmenten (Abbildung 25).

Zwischen den DNA-Fragmentmustern der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen (H2I2, H2L) der Kegelrobbe H2 aus der Ostsee und den DNA-Fragmentmustern der L-Streptokokkenkulturen der beiden



Schweinswale C (Lunge 17408) und Schweinswal H (Lunge 18263) aus der Ostsee war ein Unterschied von mehr als 19 DNA-Fragmenten erkennbar. Die beiden DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von den beiden Schweinswalen C und H aus der Ostsee, zeigten untereinander mit dem Enzym *ApaI* (Abb.25) einen Fragmentunterschied von sechs DNA-Fragmenten.

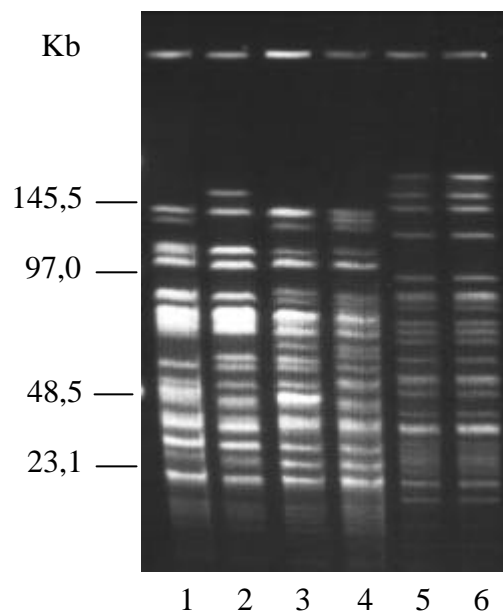


Abb. 25: DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von sechs *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Seehund P35, Kegelrobbe H2, Schweinswal P, Schweinswal C und Schweinswal H nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*. Die DNA-Fragmentmuster der Isolate des Schweinswals P Leber 18865 (1) und des Seehunds P35I (2) unterschieden sich durch vier DNA-Fragmente. Die Fragmentmuster der Kegelrobbeisolate H2I2 (5) und H2L (6) waren untereinander identisch, aber unterschiedlich zu den Fragmentmustern der Kulturen von Schweinswal C Lunge 17408 (3) und Schweinswal H Lunge 18263 (4), Marker siehe Abb. 19.

Um einen weiteren Vergleich der DNA-Fragmentprofile der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen durchzuführen, wurde das Restriktionsenzym *SmaI* verwendet. Hierbei wurde die gleiche Reihenfolge der Kulturen, wie bei dem entsprechenden Verdau mit dem Enzym *ApaI* (siehe Abbildung 25) eingehalten.

Bei Verdau mit dem Restriktionsenzym *SmaI* zeigten, wie bereits zuvor bei dem Restriktionsverdau mit *ApaI* beschrieben, beide DNA-Fragmentmuster der zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolate aus Leber (H2I2) und Milz (H2L) der Kegelrobbe H2 eine vollständige Übereinstimmung. Das DNA-Fragmentprofil des *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolates P35I von Seehund P35 aus der Nordsee zeigte keine Beziehung zu den DNA-Profilen von den *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, die von der Kegelrobbe H2 aus der Ostsee isoliert worden waren.

Der Vergleich des DNA-Fragmentmusters des *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolates P35I von Seehund P35 aus der Nordsee mit dem Fragmentmuster des *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Isolates von Schweinswal P (Leber 18865) aus der Nordsee zeigte nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *SmaI* eine nahezu vollständige Identität der DNA-Fragmente; ein Unterschied war nur in einem DNA-Fragment feststellbar (Abbildung 26).

Das DNA-Fragmentprofil der zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der Kegelrobbe H2 aus der Ostsee und die DNA-Fragmentprofile der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der beiden Schweinswale aus der Ostsee unterschieden sich auch mit dem Enzym *SmaI* in zahlreichen DNA-Fragmenten. Die beiden DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von zwei Schweinswalen (C und H) aus der Ostsee, zeigten mit dem Enzym *SmaI* einen Fragmentunterschied von zwei DNA-Fragmenten (Abbildung 26).

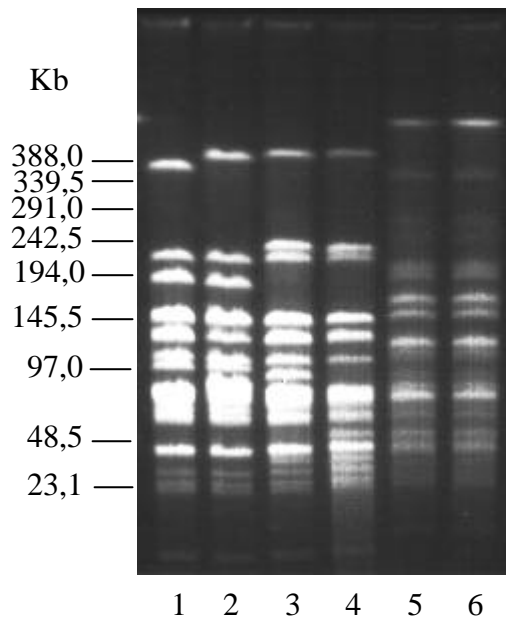


Abb. 26: DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Seehund P35, Kegelrobbe H2, Schweinswal P, Schweinswal C und Schweinswal H nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I. Die DNA-Fragmentmuster der Isolate des Schweinswals P Leber 18865 (1) und des Seehunds P35I (2) unterschieden sich nur in der Größe eines DNA-Fragments. Die Fragmentmuster der Kegelrobbeisolate H2I2 (5) und H2L (6) waren untereinander identisch, aber unterschiedlich zu den teilweise identischen Fragmentmustern des Schweinswals C Lunge 17408 (3) und des Schweinswals H Lunge 18263 (4), Marker siehe Abb. 19.

Zur Beurteilung der verwandtschaftlichen Beziehungen der drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen (P35I (Nordsee), H2I2 (Ostsee), H2L (Ostsee)) der vorliegenden Arbeit, der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kultur, isoliert von Schweinswal P aus der Nordsee und der zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von den

Schweinswalen C und H aus der Ostsee wurden zwei Dendrogramme der Fragmentmuster nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *ApaI* (Abbildung 27) bzw. *SmaI* (Abbildung 28) mittels des Computerprogramms `GelCompar` erstellt.

Die Dendrogrammanalyse ergab nach Restriktionsverdau mit beiden Enzymen ebenso eine Identität der Kulturen H2I2 und H2L, die von der Kegelrobbe H2 aus der Ostsee isoliert worden waren. Der euklidische Abstand zwischen den Kulturen des Schweinswals P (Leber 18865) und des Seehunds P35I aus der Nordsee betrug mit dem Enzym *Apa I* etwa 24 und mit dem Enzym *Sma I* etwa 15. Ebenfalls mit beiden Enzymen war ein euklidischer Abstand von etwa 24 zwischen den Kulturen des Schweinswals C (Lunge 17408) und des Schweinswals H (Lunge 18263) aus der Ostsee nachweisbar (Abbildung 27, Abbildung 28).

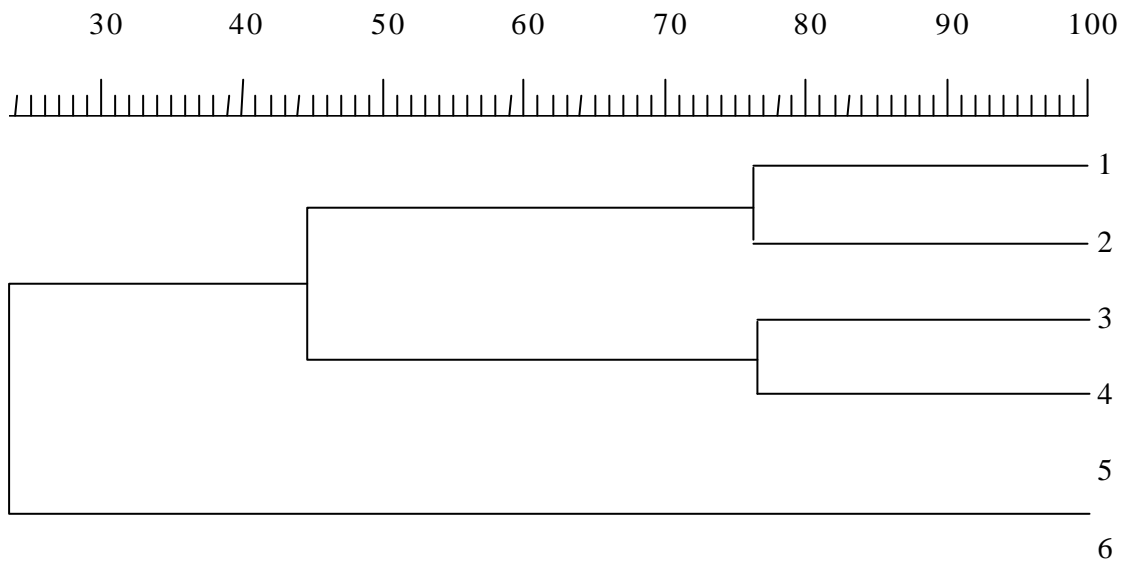


Abb. 27: Dendrogramm der DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*; Schweinswal C (Lunge 17408, Ostsee) = 1, Schweinswal H (Lunge 18263, Ostsee) = 2, Schweinswal P (Leber 18865, Nordsee) = 3, Seehund P35 (P35I, Nordsee) = 4, Kegelrobbe H2 (H2I2, Ostsee) = 5 und (H2L, Ostsee) = 6.

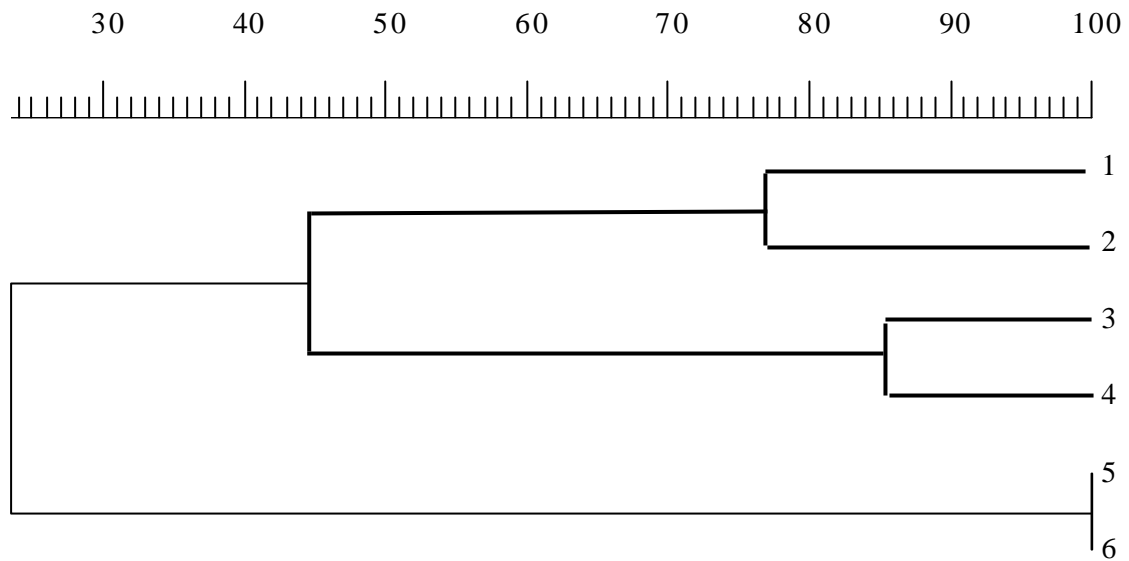


Abb. 28: Dendrogramm der DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I; Schweinswal C (Lunge 17408, Ostsee) = 1, Schweinswal H (Lunge 18263, Ostsee) = 2, Schweinswal P (Leber 18865, Nordsee) = 3, Seehund P35 (P35I, Nordsee) = 4, Kegelrobbe H2 (H2I2, Ostsee) = 5 und (H2L, Ostsee) = 6.

## 5 Diskussion

Aufgrund kultureller, biochemischer und serologischer Eigenschaften konnten innerhalb der 72 untersuchten Streptokokkenkulturen 69 Kulturen als *Streptococcus phocae* und 3 Kulturen als *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L identifiziert werden.

Alle untersuchten Kulturen beider Streptokokkenspezies erwiesen sich als grampositiv und katalasenegativ, wuchsen nach Anzüchtung für 48h auf Schafblutagar in 1,5 bis 2mm großen, weißgrauen Kolonien und waren von einer deutlichen Zone vollständiger ( $\beta$ )-Hämolyse umgeben. Diese Eigenschaften waren bereits typisch für Bakterien der Gattung *Streptococcus* (LÄMMLER und HAHN, 1994).

Die *S. phocae*-Kulturen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich als CAMP-negativ. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von KUNTER (1968), der bisher als einziger eine entsprechende Reaktion bei L-Streptokokken beschrieb, konnte bei keiner der untersuchten *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen eine CAMP- oder CAMP-ähnliche Reaktion nachgewiesen werden. Auch SWENSHON (1997) beschrieb bei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L keine vergleichbare synergistische Hämolysereaktion.

Durch Doppelimmundiffusion von Antigenextrakten der Kulturen mit gruppenspezifischen Antiseren waren acht Bakterienkulturen der vorliegenden Arbeit in die serologische Gruppe C und drei Kulturen in die serologische Gruppe L zuzuordnen. Diese Ergebnisse ließen sich durch Staphylokokken-Koagglutination mit Gruppe C- und Gruppe L-spezifischem Antiserum bestätigen. Mit Hilfe eines kommerziellen Latex-Objekträgeragglutinationstests konnten die Bakterienkulturen im weiteren hinsichtlich der Gruppenpolysaccharidantigene der serologischen Gruppe F überprüft werden. Hierbei wurden 61 Bakterienkulturen der serologischen Gruppe F zugeordnet.

Entgegen den Beschreibungen von JELINKOVA et al. (1967) und KARAKAWA et al. (1971) zeigte sich keine Kreuzreaktion zwischen dem Gruppenantigen von Streptokokken der serologischen Gruppe L und Gruppe A-spezifischem Antiserum. SCHAUFUSS (1986) und SIPPEL (1994) konnten ebenfalls keine Kreuzreaktionen zwischen diesen beiden Serogruppen nachweisen.

Das zur Identifizierung der Kulturen im Weiteren verwendete kommerzielle System api 50 CH erwies sich in Kombination mit der serologischen Gruppenbestimmung zur Differenzierung von Streptokokken, isoliert von Seehunden und Kegelrobben, als geeignet. Alle untersuchten Kulturen konnten anhand ihrer serologischen Gruppe und ihrer biochemischen Eigenschaften einer Spezies zugeordnet werden.

Dabei wiesen alle 69 Kulturen der serologischen Lancefield Gruppen F und C ein weitestgehend einheitliches biochemisches Profil auf. Sie zeigten eine Säurebildung aus Glucose und einen Abbau von N-Acetyl-Glucosamin, jedoch keinen Abbau von Erythrit, D-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonit,  $\beta$ -Methyl-D-Xylosid, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Sorbit,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid und  $\beta$ -Methyl-D-Glucosid. Einheitlich negativ reagierten alle Kulturen ferner hinsichtlich des Abbaus von Amygdalin, Cellobiose, Melibiose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Xylit, Gentibiose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabit, L-Arabit, Gluconat, 2-Keto-Gluconat und 5-Keto-Gluconat. Bei 5,8% der als *S. phocae* identifizierten Kulturen war ein Abbau von Glycerol, bei 1,4% ein Abbau von L-Arabinose und bei 91,3% der Kulturen ein Abbau von Ribose nachweisbar. Hinsichtlich des Abbaus von Galactose erwiesen sich 15,9% als positiv, 98,6% bauten Fructose, 97,1% Mannose, 8,7% Mannit, 1,4% Arbunit, 4,3 % Äskulin, 1,4% Salicin, 98,6% Maltose, 17,4% Lactose, 17,4% Saccharose, 10,1% Trehalose, 21,7% Stärke, 24,6% Glycogen und 8,7% D-Turanose ab.

Die drei Kulturen der serologischen Gruppe L zeigten alle eine Ribose-, Galactose-, Glucose-, Fructose-, Mannose-, N-Acetyl-Glucosamin-, Maltose-,

Saccharose-, Trehalose-, Stärke- und Glycogen-Abbau. Hinsichtlich des Abbaus von Glycerol, Erythrit, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonit,  $\beta$ -Methyl-D-Xylosid, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Mannit, Sorbit,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannosid,  $\alpha$ -Methyl-D-Glucosid, Amygdalin, Arbutin, Äskulin, Salicin, Zellobiose, Melibiose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Xylit, Gentiobiose, D-Turanose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabit, L-Arabit, Gluconat, 2-Keto-Gluconat und 5-Keto-Gluconat erwiesen sich die Kulturen als einheitlich negativ. Bei einer der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen war Lactoseabbau feststellbar. Vergleichend dazu erfolgte eine Überprüfung einiger Reaktionen des api 50 CH Systems durch weitere biochemische Untersuchungen. Entsprechend den Angaben von SKAAR et al. (1994) und HENTON et al. (1999) wiesen die *S. phocae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen alle einen Abbau von Fructose und D-Mannose, jedoch keine Säurebildung aus Arginin, Äskulin, Lactose, Na-Hippurat, Salicin, Sorbit und Trehalose auf. Bei 98,6% der Kulturen zeigte sich eine Säurebildung aus Ribose. Bei einem geringen Prozentsatz der *S. phocae*-Kulturen wurde, wie auch in den Untersuchungen von SKAAR et al. (1994), eine Säurebildung aus Galactose, Glycerol, Glycogen, Melezitose, Saccharose und D-Turanose sowie eine Hydrolyse von Stärke nachgewiesen. Die Überprüfung einiger der biochemischen Reaktionen ergab nicht in allen Fällen eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen des kommerziellen Identifizierungssystems api 50 CH.

Die *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich alle als, fructose-, D-mannose-, und trehalosepositiv sowie als äskulin-, salicin- und Sorbitnegativ. Einen Abbau von Lactose zeigte eine der drei Kulturen. Die biochemischen Eigenschaften der L-Streptokokken entsprachen den Angaben von THAL und MOBERG (1953), RIISING (1976), RIISING et al. (1976), SCHAUFUSS (1986), HOMMEZ et al. (1991), SIPPEL (1994) und SWENSHON (1997).

Im weiteren zeigten die L-Streptokokkenkulturen eine Säurebildung aus Mannit, Raffinose und L-Arabinose. Vergleichbares beschrieben bereits die Autoren



WEIGT und GRUNERT (1964), KUNTER (1968), BEVANGER und STAMMES (1979) sowie SWENSHON (1997).

Ebenso wie bei den *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen konnten die Enzyme Arginindihydrolase und  $\beta$ -Glucuronidase sowie eine Säurebildung aus Ribose, Saccharose, Glycogen und Maltose von zahlreichen Autoren bei Streptokokken der serologische Gruppe L nachgewiesen werden (THAL und MOBERG, 1953; WEIGT und GRUNERT, 1964; KRANTZ and DUNNE, 1965; KUNTER, 1968; RIISING, 1976; BEVANGER and STAMMES, 1979; SCHAUFUSS, 1986; HOMMEZ et al., 1991; SIPPEL, 1994; SWENSHON, 1997).

Entsprechend den von SWENSHON et al. (1998) untersuchten L-Streptokokken wurde bei dieser Bakterienspezies auch in den vorliegenden Studien keine Hippurathydrolyse nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von THAL und MOBERG (1953), RIISING (1976), SCHAUFUSS (1986), HOMMEZ et al. (1991) und SIPPEL (1994), die innerhalb der jeweils untersuchten L-Streptokokken bei bis zu 100% der Kulturen eine Hippurathydrolyse beschrieben.

Die *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchung zeigten das Vorkommen des Enzyms N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase. Dies bestätigten die Untersuchungen von SIPPEL (1994), in denen bei L-Streptokokken von Rind, Schwein, Pute und Mensch das Vorkommen dieses Enzyms beschrieben worden war.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichten letztlich eine Identifizierung der Bakterienspezies *S. phocae* mittels 10 biochemischer Tests sowie durch eine serologische Gruppenbestimmung. Die biochemischen Verfahren, die auch zukünftig zur Identifizierung von *S. phocae* und zur Abgrenzung weiterer  $\beta$ -hämolytischer Streptokokken eingesetzt werden könnten, umfassten die Säurebildung aus Fructose, D-Mannose und Ribose sowie eine negative Reaktion hinsichtlich des Abbaus von Lactose, Salicin, Sorbit,

Trehalose, Äskulin, Arginin und Na-Hippurat. Die biochemischen Eigenschaften von *S. phocae* würden durch eine Zuordnung zur serologische Gruppe C oder F ergänzt.

Mit Hilfe der biochemischen Untersuchungen und der serologischen Gruppenbestimmung gelang es, alle 72 Streptokokken der vorliegenden Arbeit einer Bakterienspezies zuzuordnen. Dabei konnten 69 dieser 72 Streptokokkenkulturen als *S. phocae* identifiziert werden. Die Spezies *S. phocae* wurde erstmals von SKAAR et al. (1994) beschrieben. Zuvor wurden von einigen Autoren (ANDERSSON et al., 1979; KATAFOS et al., 1979; GERACI et al., 1982)  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken, isoliert von Robben, beschrieben, die nicht weiter identifiziert werden konnten und keiner bekannten Streptokokkenspezies zuzuordnen waren. SKAAR et al. (1994) beschrieben schließlich eine neue Spezies  $\beta$ -hämolyisierender Streptokokken, isoliert von Seehunden, die untereinander eine große Übereinstimmung in der DNA-DNA Hybridisierung zeigten. Verglichen mit Referenzstämmen anderer Streptokokkenspezies zeigte diese Gruppe von  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken jedoch nur eine geringe DNA-Übereinstimmung. Diese  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken nannten SKAAR et al. (1994), in Anlehnung an die wissenschaftliche Bezeichnung *Phoca vitulina* für den Seehund, von denen sie isoliert worden waren, *Streptococcus phocae*.

Ferner wiesen HENTON et al. (1999) eine Isolierung von *S. phocae* beim Südafrikanischen Seebären (*Arctocephalus pusillus pusillus*) nach. Dies war die erste Beschreibung über das Vorkommen dieser Spezies beim Südafrikanischen Seebären. In den vorliegenden Untersuchungen wurden *S. phocae*-Kulturen von Seehunden und Kegelrobben isoliert. Dies ist der erste Nachweis über das Vorkommen dieser Spezies bei Kegelrobben. Die neue Streptokokkenspezies *S. phocae* wurde somit bisher bei drei verschiedenen Robbenarten nachgewiesen und es ist zu vermuten, dass sie auch bei weiteren Robbenarten auftritt.

Drei der 72 Streptokokken der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund biochemischer Untersuchungen und der serologischen Gruppenbestimmung als Bakterien der Spezies *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L identifiziert. Die Taxonomie dieser Streptokokken war in der Vergangenheit einigen Veränderungen unterworfen. SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984, 1987) sowie SCHLEIFER et al. (1985) schlugen vor, die Gattung *Streptococcus* in die Gattung *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* und *Lactococcus* zu unterteilen. Danach gehörte die Spezies *S. dysgalactiae* (Serogruppe C) zu den Pyogen-Streptokokken innerhalb der Gattung *Streptococcus sensu stricto*. Aufgrund homologer DNA-Strukturen sowie einer Übereinstimmung biochemischer Eigenschaften waren nach FARROW und COLLINS (1984)  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken der serologischen Gruppe L ebenfalls der Spezies *S. dysgalactiae* zuzuordnen. Daher bezeichneten HOMMEZ et al. (1991) sie auch als *S. dysgalactiae* Serovar L. DEVRIESE (1991) beschrieb L-Streptokokken, die häufig von Schweinen isoliert wurden, als schweinespezifisches Ecovar von *S. dysgalactiae*.

Die Ergebnisse der Untersuchung von Gesamtzellproteinen durch Elektrophorese wurden von VANDAMME et al. (1996) für die taxonomische Einordnung von Streptokokken der Spezies *S. dysgalactiae* verwendet. In Abhängigkeit dieser Gesamtzellproteinuntersuchungen teilten diese Autoren die Spezies *S. dysgalactiae* in *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* und *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* auf. Die Subspezies *dysgalactiae* umfasste alle  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hämolisierenden Streptokokken der serologischen Gruppen C und L, die ausschließlich von Tieren isoliert wurden. Zur Subspezies *equisimilis* rechneten die Autoren nur  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken der serologischen Gruppen C und G, die ausschließlich von Menschen stammten. G-Streptokokken, die von Tieren isoliert wurden, ordneten sie der Spezies *S. canis* zu.

Eine weitere Möglichkeit zur Einordnung der Streptokokken der serologischen Gruppe C der vorliegenden Untersuchungen erfolgte durch Agglutinationsreaktionen mit dem Lektin von *Dolichos biflorus*. Alle C-

Streptokokken agglutinierten mit diesem Lektin, wobei alle übrigen Kulturen keine Reaktionen aufwiesen. Diese Ergebnisse waren mit den Untersuchungen von KÖHLER und PROKOP (1967), SCHAUFUSS (1986), NIEWERTH et al. (1987), NAGAI et al. (1994), SWENSHON (1997) und ABDULMAWJOOD (1999) vergleichbar. Die Reaktion beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung des Lektins von *Dolichos biflorus* mit dem C-Polysaccharidantigen N-Acetyl-D-Galactosamin (NIEWERTH, 1987).

Die bereits von NIEWERTH (1987), SCHAUFUSS et al. (1987) und SWENSHON et al. (1998) nachgewiesene Agglutination von Streptokokken der serologischen Gruppe L mit dem Lektin von *Arachis hypogaea* konnte auch bei den L-Streptokokken der vorliegenden Untersuchungen festgestellt werden. Da mit diesem Lektin auch Agglutinationsreaktionen mit den untersuchten *S. phocae*-Kulturen nachgewiesen werden konnten, ist dieses Lektin zum spezifischen Nachweis der beiden Spezies nicht einsetzbar.

Bei den weiteren serologischen Untersuchungen dieser Arbeit wiesen alle Kulturen, die zuvor der serologischen Gruppe F zugeordnet werden konnten, eine Kreuzreaktion mit dem spezifischen Antiserum, hergestellt gegen das B-Streptokokken-Polysaccharidantigen Ia, auf. Das B-Streptokokken-Polysaccharidantigen Ia wurde erstmals von LANCEFIELD (1934) beschrieben und von WILKINSON (1975) näher charakterisiert. Nach Untersuchungen von WILKINSON (1975) enthielt das Polysaccharidantigen Ia die Zucker Galactose und N-Acetylglucosamin im molaren Verhältnis 3 : 1. Weitere Angaben machten die Autoren WESSELS et al. (1991). Nach ihnen bestand das Polysaccharidantigen Ia aus Neuraminsäure (=α-D-NeupNac), Galactopyranosyl (=β-D-Galp), N-Acetyl-Glucosamin (=β-D-GlcpNAc) sowie Glucose (=β-D-Glcp) und die Struktur gaben sie mit -α-D-NeupNac-(2-3)-β-D-Galp-(1-4)-β-D-GlcpNAc-(1-3)-β-D-Glcp-(1-4)-β-D-Galp- an. Das Polysaccharidantigen F untersuchten PRITCHARD et al. (1987) und gaben als Bestandteile

Glucose (=β-D-Glcp) und Rhamnose (=α-L-Rhap) in der Struktur -α-L-Rhap-(1-2)-α-D-Glcp-(1-3)-α-L-Rhap- an. Aufgrund der Untersuchungen von WESSELS et al. (1991) und PRITCHARD et al. (1987) enthielten die Polysaccharidantigene Ia und F beide das Molekül Glukose. Die Gemeinsamkeit des Glukosemoleküls und mögliche weitere bislang noch nicht bekannte Ähnlichkeiten könnten eine Erklärung für die Kreuzreaktion der F-Streptokokken mit dem spezifischen Antiserum, hergestellt gegen das B-Streptokokken-Polysaccharidantigen Ia, sein. Das Vorkommen eines Typenantigens Ia, unabhängig von dem eigentlichen F-Gruppenpolysaccharidantigen, ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Im weiteren war bei den *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Arbeit keine Reaktion mit B-Streptokokken-Polysacchariden Ib, II, III, IV, V, VI, VII und VIII sowie keine Reaktion mit spezifischem Antiserum, hergestellt gegen die Proteinantigene X, R, Rib, α und β, nachweisbar.

Das Proteinantigen X wurde erstmals bei β-hämolysierenden Streptokokken der serologischen Gruppe B von PATTISON et al. (1955a, b) beschrieben. In weiteren Untersuchungen gelang der Nachweis dieses Proteinantigens auch bei anderen β-hämolysierenden Streptokokken (BERGNER-RABINOWITZ et al., 1981; PASARIBU et al., 1985; LÄMMLER und BLOBEL, 1987; GÜRTÜRK, 1989; WIBAWAN und LÄMMLER, 1990; REINARD et al., 1991a, b; DÜLFFER-SCHNEITZER, 1993). LANCEFIELD und PERLMANN (1952) konnten bei Streptokokken erstmals das Proteinantigen R als Oberflächenantigen feststellen. Andere Autoren wiesen das Proteinantigen R bei weiteren β-hämolysierenden Streptokokken nach (MAXTED, 1949; LANCEFIELD, 1957; CURTIS and KRAUSE, 1964; PERCH und OLSEN, 1964; LINDEN, 1983; LINDEN et al., 1983; WIBAWAN und LÄMMLER, 1990; FLORES and FERRIERI, 1993; SIPPEL, 1994).

Die Ribosomen wurden Ende der 30er Jahre mittels Dunkelfeld-Mikroskopie von Albert Claude entdeckt. Es sind kugelförmige Partikel aus zwei ungleichen Untereinheiten (WATSON et al., 1987), die bei allen Lebewesen aus der ribosomalen RNA bestehen und die für das Leben essentiell sind. Die kleine 30S Untereinheit setzt sich aus der 16S ribosomalen RNA und einer „spacer“-Region (Spacer-1), die große 50S Untereinheit aus einer 23S rRNA, einer weiteren „spacer“-Region (Spacer-2) und einer 5S rRNA zusammen. Bei den Bakterien existieren innerhalb des die 16S rRNA kodierenden Gens hochkonservierte Regionen und variable sowie hypervariable Bereiche, die sich innerhalb verschiedener Spezies, Genera oder Familien unterscheiden (LANE et al., 1985; WOESE, 1987; AMANN et al., 1995; LEWIN, 1998). Die hochkonservierten Regionen wurden genutzt, um mittels universeller PCR-Primer bestimmte rRNA-Gensequenzen zu erkennen und die dazwischenliegenden variablen Regionen zu amplifizieren. Ein variabler Bereich innerhalb des 16S rRNA-Gens ist die aus 26 Nukleotiden bestehende V2-Region. BENTLEY und LEIGH (1995) erkannten die Speziesspezifität dieser V2-Region für 31 verschiedene Streptokokken und nutzten diese Region zur Differenzierung der untersuchten Streptokokkenspezies. Weitere Autoren (BARRY et al., 1991; KOSTMAN et al., 1992; JENSEN et al., 1993) charakterisierten ebenfalls die 16S rRNA, insbesondere die variablen Regionen, so dass dies eine Standardmethode zur Identifizierung zahlreicher Bakterienspezies darstellt. Aktiv wachsende Zellen besitzen eine große Anzahl der 16S rRNA, die bei *E. coli*-Zellen bis zu 20 000 mal vorhanden sein können (VOET und VOET, 1994). Daher wird auch in der Routinediagnostik diese Art der Charakterisierung genutzt, um Bakterien schnell und direkt aus klinischem Untersuchungsmaterial zu identifizieren (KOLBERT und PERSING, 1999).

Für *S. phocae* liegen hinsichtlich der 16S rRNA und der V2-Region noch keine Untersuchungen vor. Daher erfolgte eine weitergehende Charakterisierung der 16S rRNA bzw. des entsprechenden Gens der Isolate der vorliegenden Untersuchungen. Das Gen der 16S rRNA der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 (NCTC 12719) konnte mit Hilfe von universellen PCR-Primern durch PCR mit

einer Größe von 1547 Basenpaaren amplifiziert werden. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der 16S rRNA der *S. phocae*-Referenzkultur 8399 H1 und der Vergleich der Sequenzen mit Sequenzen von *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. equi* und *S. iniae*. Innerhalb der 16S rRNA erwies sich die V2-Region von *S. phocae*, entsprechend der V2-Region anderer Streptokokkenarten (BENTLEY und LEIGH, 1995), als speziesspezifisch und eignete sich als Sequenzabschnitt zur Identifizierung dieser Streptokokkenart. Eine Dendrogrammanalyse der Sequenz der V2-Region von *S. phocae* mit der Sequenz von 32 weiteren V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies ergab einen deutlichen Unterschied von *S. phocae* zu allen anderen Streptokokkenspezies.

Die weitere Überprüfung der Spezifität der 16S rRNA-Amplifikate erfolgte durch „Restriction Fragment Length Polymorphism“-Analyse (RFLP). Dieses Verfahren basiert auf der selektiven PCR-Amplifizierung von Genabschnitten, wie z.B. der 16S rRNA und dem anschließenden Verdau des Amplikons durch ein spezifisches Restriktionsenzym. Es folgt eine Elektrophorese in der die jeweiligen Restriktionsfragmente, in Abhängigkeit der vorhandenen oder nichtvorhandenen spezifischen Schnittstellen, aufgetrennt werden und das Restriktionsmuster bilden (NEWTON und GRAHAM, 1997).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Restriktionsenzyme *EarI* und *HincII* aufgrund der nunmehr bekannten Sequenz der *S. phocae*-V2-Region und dem Vergleich dieser Region mit von verschiedenen Autoren (DOMENECH et al., 1994; BENTLEY und LEIGH, 1995; ELMER et al., 1997; SULTANA et al., 1998; ABDULMAWJOOD und LÄMMLER, 2000) angegebenen 33 weiteren V2-Regionen unterschiedlicher Streptokokkenspezies ausgewählt. Anschließend erfolgte eine Simulation des *EarI*- bzw. *HincII*-Restriktionsverdaus durch das Computerprogramm Clone Manager Version 4.0. Dadurch wurden Kreuzreaktionen mit anderen Streptokokkenspezies ausgeschlossen. Die 16S rRNA-Gen-Amplifikate der 69 *S. phocae*-Kulturen dieser Untersuchungen,

der *S. phocae*-Referenzkulturen und die 16S rRNA-Gen-Amplifikate der drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Wie zuvor durch Computersimulation ermittelt, zeigten alle 69 *S. phocae*-Kulturen zwei Schnittstellen mit drei Fragmenten. Alle *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen wiesen mit diesem Enzym eine Schnittstelle und zwei Fragmente auf. Das Fragmentmuster der *S. phocae*-Kulturen erwies sich als speziesspezifisch.

Zur weiteren Bestätigung der ermittelten 16S rRNA-Sequenz, insbesondere der V2-Region, wurden die Amplifikate der 69 *S. phocae*-Kulturen der vorliegenden Arbeit, der beiden *S. phocae*-Referenzkulturen sowie der drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen mit dem Restriktionsenzym *HincII* untersucht. Bei Verwendung dieses Enzyms wiesen alle *S. phocae*- bzw. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, wie durch Computersimulation bereits ermittelt, jeweils eine Schnittstelle mit zwei Fragmenten auf. Die Fragmente der *S. phocae*-Kulturen wiesen eine Grösse von ca. 180 und 1270 Basenpaaren und die entsprechenden Fragmente der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen eine Grösse von ca. 550 und 900 Basenpaaren auf. Die jeweiligen Fragmentmuster erwiesen sich für die beiden Bakterienarten ebenfalls als spezifisch.

Die vorgestellte RFLP-Analyse erwies sich als geeignet zur Identifizierung von *S. phocae* bzw. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L und zur Abgrenzung von anderen Streptokokkenspezies. Die hierzu erforderliche Amplifizierung des 16S rRNA-Gens und der anschließende Restriktionsverdau war jedoch zeitaufwendig und umständlich, so dass diese Methode sich nur bedingt eignete.

JAYARAO et al., 1992 konnten mittels RFLP-Analyse des 16S rRNA-Gens 12 verschiedene Bakterienspezies der Gattungen *Streptococcus* und *Enterococcus* differenzieren. In den Untersuchungen von ABDULMAWJOOD et al. (1998) wurden *S. porcinus*, in den Untersuchungen von LÄMMLER et al. (1998a; b), ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999), und HASSAN et al. (2000)



Streptokokken der serologischen Gruppen B sowie *S. uberis* und *S. parauberis* durch RFLP-Analyse des 16S rRNA-Gens unterschieden.

Eine weitere Strategie zur Identifizierung der Bakterienspezies *S. phocae* war die Etablierung speziesspezifischer Oligonukleotidprimer. Aufgrund der Sequenzierungsergebnisse und des Vergleichs der V2-Region von *S. phocae* mit 33 weiteren V2-Regionen unterschiedlicher Streptokokkenspezies gelang die Erstellung *S. phocae*-spezifischer Oligonukleotidprimer. Dabei war der Primer PX1 in einem *S. phocae*-spezifischen Abschnitt der V2-Region lokalisiert. Der zweite Primer PX2 setzte in einem weiteren *S. phocae*-spezifischen Abschnitt des 16S rRNA-Gens an. Mittels dieser Primer PX 1 und PX 2 konnte ein *S. phocae*-spezifischer-Abschnitt des 16S rRNA-Gens von etwa 860 Basenpaaren bei allen *S. phocae*-Kulturen dieser Untersuchungen und den beiden *S. phocae*-Referenzkulturen amplifiziert werden. Mit diesen Oligonukleotidprimern gelang keine Amplifizierung eines vergleichbaren Genabschnitts bei den drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen und bei zahlreichen weiteren Streptokokkenspezies. Die Primer PX 1 und PX 2 ermöglichten somit eine Identifizierung der Bakterienspezies *S. phocae* mittels PCR.

Die Unterschiede in der Sequenz des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* zu anderen Streptokokkenarten und die fehlende Variation von *S. phocae*, bestätigt durch RFLP-Analyse und durch Verwendung von Oligonukleotidprimern in diesem Bereich, unterstrich die bisherige taxonomische Einordnung dieser Spezies als eigenständige Streptokokkenart.

Eine weitere phänotypische Charakterisierung der Streptokokken der vorliegenden Untersuchungen erfolgte durch die Überprüfung des Wachstumsverhaltens der Bakterien in Flüssigmedium und Soft-Agar. Die *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen wiesen überwiegend ein einheitliches Wachstumsverhalten auf. Die Mehrzahl der *S. phocae*-Kulturen und die Mehrzahl der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Serovar L-Kulturen zeigten in Flüssigmedium ein Wachstum als Sediment mit klarem Überstand. In Soft-Agar wiesen die *S. phocae*-Kulturen, wie auch die *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, überwiegend ein kompaktes Kolonienwachstum auf.

In verschiedenen Studien an Streptokokken der serologischen Gruppe B konnten bereits Unterschiede im Wachstumsverhalten der Bakterien in Flüssigmedien beschrieben werden. Dies zeigte sich in einem Wachstum der Kulturen mit gleichmäßiger Trübung des Flüssigmediums bzw. in einem Wachstum als Sediment mit ansonsten klarem Überstand. Diese Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium hatten eine Beziehung zu den Wachstumseigenschaften der Kulturen in Soft-Agar. Die Kulturen, die in Flüssigmedium als Sediment mit klarem Überstand wuchsen, bildeten in Soft-Agar kompakte Kolonien. Demgegenüber zeigten Kulturen mit trübem Wachstum in Flüssigmedium ein diffuses Wachstum der Kolonien in Soft-Agar (WIBAWAN und LÄMMLER, 1991). Auch SIPPEL (1994) konnte bei L-Streptokokkenkulturen eindeutige Beziehungen zwischen dem Wachstum in Flüssigmedium einerseits und dem Wachstum in Soft-Agar andererseits nachweisen.

Nach YOSHIDA und TAKEUCHI (1970) sowie YOSHIDA et al. (1974) deutete diffuses Wachstum in Soft-Agar auf eine Bekapselung der Bakterien hin. Bei Streptokokken der serologischen Gruppe B zeigte sich, dass die Wachstumsunterschiede in Flüssigmedium nicht von der Herkunft der Streptokokkenkulturen, sondern von dem Vorkommen der B-Streptokokkenmikrokapsel abhängig waren (WIBAWAN und LÄMMLER, 1990; WIBAWAN, 1993). Auch BOPP (1994) stellte eine Korrelation zwischen den Wachstumseigenschaften und dem Vorkommen bzw. dem Fehlen von Polysaccharidantigenen der B-Streptokokkenkulturen fest. Hierbei zeigten Kulturen ohne Polysaccharidantigen überwiegend ein Wachstum als Sediment mit klarem Überstand im Flüssigmedium und kompakte Kolonien im Soft-Agar. Das überwiegende Wachstum der *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchung als Sediment

mit klarem Überstand in Flüssigmedium und das gleichzeitig auftretende überwiegende kompakte Wachstum in Soft-Agar könnten auf das Fehlen vergleichbarer Polysaccharidantigene sowie einer Mikrobekapselung bei diesen Bakterien hinweisen.

Nach WIBAWAN und LÄMMLER (1991) waren die Wachstumseigenschaften von Streptokokken der serologischen Gruppe B in Flüssigmedium und Soft-Agar mit der Oberflächenladung der Kulturen korreliert. Zur Bestimmung der Oberflächenladung der *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen kam der Salzaggregationstest zur Anwendung. Dieser Test wurde bereits zum Nachweis der Oberflächenhydrophobizität anderer Bakterienarten verwendet. Oberflächenproteine, wie der Clumping-Faktor, das fibronektinbindende Protein und auch das Protein A, schienen für die Oberflächenhydrophobizität von *S. aureus* von Bedeutung zu sein (KUUSELA, 1978; LINDAHL et al., 1981; JONSSON und WADSTRÖM, 1984).

Die Mehrheit aller *S. phocae*-Kulturen und auch der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen zeigte im Salzaggregationstest bereits eine Aggregation mit einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,1 mol/l. Dies weist auf eine eher hydrophobe Oberfläche der Kulturen hin.

Das Wachstum in Flüssigmedium und in Soft-Agar sowie die Ergebnisse des Salzaggregationstests korrelierten mit der überwiegend langen streptokokkentypischen Kettenformation der *S. phocae*-Kulturen. Auf eine Beziehung zwischen Kettenlänge, Oberflächenhydrophobizität und Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium und Soft-Agar wurde bereits von WIBAWAN und LÄMMLER (1990), WIBAWAN et al. (1992) und WIBAWAN (1993) bei Streptokokken der serologischen Gruppe B hingewiesen.

Bei der Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeiten der *S. phocae*-Kulturen erwiesen sich alle Kulturen als empfindlich gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Bacitracin (0,04 IE), Bacitracin (10 IE), Cefacetril,

Cefotaxim, Cefoxitin, Clindamycin, Erythromycin, Minocyclin, Ofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Piperacillin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Tetracyclin. Die Ergebnisse der Bacitracinempfindlichkeit entsprachen den Untersuchungen von SKAAR et al. (1994) und HENTON et al. (1999). Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Taxo A-Testblättchen wurden bisher zur Abgrenzung von Streptokokken der serologischen Gruppe A und anderer  $\beta$ -hämolisierender Streptokokken verwendet. Streptokokken der serologischen Gruppe A weisen gegenüber Bacitracin (0,04 IE) fast immer einen Hemmzonendurchmesser von = 15 mm auf. Andere Streptokokken wiesen meist einen kleineren Hemmzonendurchmesser oder keine Hemmzone auf. Die *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen zeigten gegenüber Bacitracin (0,04 IE) ebenfalls einen Hemmzonendurchmesser von = 15 mm. Auch SWENSHON (1997) wies bei nahezu allen untersuchten L-Streptokokken, isoliert von Schweinswalen aus der deutschen Nord- und Ostsee, eine Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin (0,04 IE) nach. *S. phocae* und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L zeigten somit ein ähnliches Verhalten wie Streptokokken der serologischen Gruppe A. Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse der bisherigen, vor allem serologischen Untersuchung ist eine falsche Zuordnung der *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen allerdings auszuschließen.

Die Mehrzahl der Kulturen zeigte eine intermediäre Reaktion gegenüber Gentamicin und eine Resistenz gegenüber Streptomycin. Alle *S. phocae*-Kulturen zeigten eine Resistenz gegenüber Kanamycin und Nalidixinsäure. Über Antibiotikaempfindlichkeiten von *S. phocae* liegen bisher außer zu Bacitracin und Optochin (SKAAR et al., 1994) keine Informationen vor.

Alle drei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchung zeigten eine Empfindlichkeit gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Bacitracin (0,04 IE), Bacitracin (10 IE), Cefacetril, Cefotaxim, Cefoxitin, Clindamycin, Erythromycin, Minocyclin, Ofloxacin,

Oxacillin, Penicillin G, Piperacillin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Tetracyclin. Gegenüber Gentamicin war eine Kultur empfindlich, zwei Kulturen waren resistent. Alle *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen zeigten eine Resistenz gegenüber Kanamycin, Nalidixinsäure und Streptomycin. Diese Ergebnisse entsprachen im wesentlichen den Untersuchungen von SWENSHON et al. (1998). Eine Empfindlichkeit von *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen gegenüber Penicillin G wurde bereits von MANTOVANI et al. (1961), LORENZEN (1968), DUMA et al. (1969), ELLNER (1970), RIISING (1976), RIISING et al. (1976) BROOME et al. (1976) sowie BOCKLISCH und ZEPEZAUER (1979) beschrieben. Entsprechend den vorliegenden Untersuchungen stellten außerdem zahlreiche Autoren bei Streptokokken der serologischen Gruppe L eine Tetracyclinempfindlichkeit fest (WEIGT und GRUNERT, 1964; DUMA et al., 1969; BOCKLISCH und ZEPEZAUER, 1979). Im Gegensatz hierzu wies SIPPEL (1994) bei L-Streptokokken unterschiedlicher Herkunft häufig Resistenzen gegenüber Clindamycin, Erythromycin, Minocyclin und Tetracyclin nach. Die Resistenzen gegenüber Minocyclin und Tetracyclin korrelierten mit dem Vorkommen spezifischer Tetracyclinresistenzgene, die von BROWN und ROBERTS (1991) sowie SCHWARZ et al. (1994) bei Streptokokken der serologischen Gruppe B beschrieben wurden. SOEDERMANTO et al. (1995) konnten ebenso bei Streptokokken der serologischen Gruppen G und L die Resistenzgene *tet* (M) und *tet* (O) nachweisen. Die Gene kodierten ribosomale Schutzproteine und bedingten somit eine gemeinsame Resistenz gegenüber Minocyclin und Tetracyclin (SCHWARZ et al., 1992).

Die Resistenzsituation der untersuchten *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen zeigte eine überwiegende Empfindlichkeit gegenüber allen getesteten Antibiotika. Dies läßt sich möglicherweise mit dem fehlenden Kontakt der Seehunde und Kegelrobben zu antibiotischen Wirkstoffen erklären, der zur Selektion von resistenten Streptokokkenkulturen hätte führen können.

Die Ähnlichkeit der untersuchten *S. phocae*- und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Arbeit bezüglich der kulturellen, biochemischen und serologischen Eigenschaften sowie ihrer Antibiotikaresistenzen, gab Anlass zur weitergehenden Charakterisierung und Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehungen dieser von Seehunden und Kegelrobben isolierten Kulturen. Dies erfolgte mittels Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA der Kulturen durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Die PFGE ermöglichte, im Vergleich zur konventionellen Elektrophorese, eine wesentlich bessere Interpretierbarkeit der Fragmentmuster. Die Zahl der Fragmente beruhte auf der Wahl selten schneidender Endonukleasen (GORDILLO et al., 1993a).

Die PFGE hat sich zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge unter anderem auch bei verschiedenen Streptokokken- und Enterokokkenspezies bewährt. Sie wurde bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, B und C (MARTIN and SINGLE, 1993; GORDILLO et al., 1993a; GREEN et al., 1994; DIPERSIO et al., 1996; SOEDERMANTO et al., 1996), bei *S. pneumoniae* (LEVÈVRE et al., 1994; CARVALHO et al., 1996; HALL et al., 1996), bei *E. faecium* (MIRANDA et al., 1991) und auch bei *E. faecalis* (GORDILLO et al., 1993b; SABRIA-LEAL et al., 1994; KÜHN et al., 1995) zur Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen eingesetzt. LEFÈVRE et al. (1994) und CARVALHO et al. (1996) untersuchten mit Hilfe der PFGE klonale Beziehungen zwischen penicillinresistenten *S. pneumoniae*-Stämmen aus Frankreich und anderen Ländern. SOEDERMANTO et al. (1996) stellten eine klonale Beziehung von *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kulturen fest, die einen Seuchenausbruch bei Schweinen und Affen in Indonesien ausgelöst hatten. Da fast alle untersuchten *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kulturen in der Makrorestriktionsanalyse ein identisches DNA-Fragmentmuster zeigten, vermuteten die Autoren, dass die Seuche von einem einzelnen Bakterienklon verursacht worden war.

SWENSHON et al. (1998) untersuchten mittels PFGE die Beziehung von *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Schweinswalen, in Abhängigkeit vom Fundort und dem Funddatum. Hierbei fiel auf, dass identische „DNA-Fingerprints“ bei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Schweinswalen aus der deutschen Nord- und Ostsee, auftraten, die im gleichen Zeitraum und/oder in der gleichen Region gefunden wurden. Daher vermuteten die Autoren eine direkte Übertragung der untersuchten L-Streptokokken von einem Tier auf das andere (SWENSHON et al., 1998).

Die im vorliegenden durchgeführten Untersuchungen zur Genotypisierung von *S. phocae* und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L, isoliert von Seehunden und Kegelrobben, durch Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA erwiesen sich unter den von MASLOW et al. (1993a) für Typisierungsverfahren geforderten Eigenschaften, wie Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, diskriminatorische Fähigkeit, einfache und klare Interpretation der Ergebnisse sowie praktikable Handhabung, als durchaus geeignet.

Die PFGE der vorliegenden Untersuchungen erfolgte mit Hilfe des CHEF-DR II Systems. In Abhängigkeit des verwendeten Restriktionsenzym wurden verschiedene Lauf- und Pulszeiten sowie unterschiedliche Stärken des elektrischen Feldes gewählt. Für die Wahl der selten schneidenden Restriktionsendonukleasen war der GC-Gehalt der Bakterien-DNA und die Länge der Erkennungssequenz des Enzyms ausschlaggebend. Enzyme mit einer GC-reichen Erkennungssequenz schneiden selten DNA mit niedrigem GC-Gehalt und Enzyme mit einer Erkennungssequenz von acht Basenpaaren schneiden seltener als solche mit einer Erkennungssequenz von sechs Basenpaaren (MASLOW et al., 1993b). Streptokokken besitzen laut FARROW und COLLINS (1984) sowie DEVRIESE et al. (1986) einen relativ niedrigen GC-Gehalt. Daher wurden in den vorliegenden Untersuchungen die Enzyme *Apa* I und *Sma* I

ausgewählt, die als Erkennungsequenzen 5'GGGCC/C3' bzw. 5'CCC/GGG3' besitzen. Für die Analyse der chromosomalen DNA von Streptokokken unterschiedlicher Spezies und Serogruppen mittels PFGE wurden bisher die Restriktionsenzyme *Eag* I, *Kpn* I, *Not* I, *Rgr* II, *Sac* II, *Sa* II *Sfi* I, *Spe* I, *Sst* I, *Xba* I verwendet (GORDILLO et al., 1993a, b; STANLEY et al., 1995).

Nach TENOVER et al. (1995) waren zur Analyse von DNA-Fragmentmustern keine standardisierten Kriterien vorhanden. Die Autoren GORDILLO et al. (1993a), MASLOW et al. (1993b), HARTSTEIN et al. (1995), SANCHES et al. (1995a, b), und THONG et al. (1995) bezeichneten Stämme als identisch, wenn sie keine Unterschiede im Bandenmuster aufwiesen. Nach EISENACH (1992) galten Kulturen bei einer Übereinstimmung von 90-99 % als klonal verwandt. Als genetisch unterschiedlich waren nach THONG et al. (1995) *Salmonella enteritidis*-Kulturen bereits ab einem Unterschied von einem DNA-Fragment. Mögliche Varianten eines Ursprungsstammes nannten GORDILLO et al. (1993a) Streptokokken der serologischen Gruppe B, die sich innerhalb ihrer PFGE-Muster in nicht mehr als zwei Fragmenten unterschieden. MASLOW et al. (1993b) bezeichneten Kulturen, deren DNA-Fragmentmuster in ein bis zwei Fragmenten differierten, als 'klonal verwandt' und bei drei oder mehr Unterschieden sprachen sie von 'genetisch unterschiedlichen' Kulturen. Erst ab einem PFGE-Musterunterschied von vier oder mehr Fragmenten wurden nach HARTSTEIN et al. (1995) und SANCHES et al. (1995a) Kulturen als genetisch unterschiedlich beurteilt. Im Gegensatz hierzu stehen die Aussagen von SCHMITZ et al. (1997), die aufgrund gleicher Restriktionsmuster keine klonale Identität von Kulturen, sondern lediglich eine enge Verwandtschaft dieser Kulturen beschrieben.

Nach TENOVER et al. (1995) waren die Kriterien für eine Verwandtschaft nicht so eng festgelegt. Diese Autoren bezogen sich bei der Beschreibung von Verwandtschaftsbeziehungen auf den ursprünglich für den Ausbruch einer Epidemie verantwortlichen Keim (Ausbruchskeim). Als 'nah verwandt' mit dem



Ausbruchskeim wurden nur Isolate eingestuft, die Veränderungen zeigten, die durch ein einziges genetisches Ereignis zu erklären waren, welches zu zwei bis drei Fragmentunterschieden führte. Isolate, die vier bis sechs Fragmentunterschiede im Vergleich zum Ausbruchskeim zeigten, wurden, da diese Differenzen nur durch mindestens zwei genetische Ereignisse zu erklären waren, als 'möglicherweise verwandt' eingeordnet. Erst bei mehr als sechs Fragmentunterschieden zum Ausbruchskeim wurden die Kulturen als 'genetisch unterschiedlich' bezeichnet. Die Ursache für Fragmentunterschiede bei z.B. 'nah verwandten' Isolaten konnten nach TENOVER et al. (1995) auf Punktmutationen zurückzuführen sein. Hierbei könnten neue Schnittstellen für das jeweilige Restriktionsenzym entstehen, die eine Auftrennung eines DNA-Fragments in zwei kleinere DNA-Fragmente oder einen Verlust einer Schnittstelle bedingen, wodurch ein größeres DNA-Fragment aus zwei kleineren entstehen kann. Solche Punktmutationen führten zu einem Unterschied von drei Fragmenten im Vergleich zum Ausbruchskeim. Außerdem besteht die Möglichkeit der Einfügung oder des Verlustes einer DNA-Sequenz, wodurch sich die Größe eines Fragmentes veränderte. Hier besteht der Unterschied des DNA-Fragmentmusters im Vergleich zum Ausbruchskeim aus zwei Fragmenten (TENOVER et al., 1995).

Mittels Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA der Kulturen der vorliegenden Untersuchung zeigte ein Vergleich der DNA-Bandenmuster von 66 *S. phocae*-Kulturen, isoliert von 36 Seehunden und vier Kegelrobben, 29 verschiedene DNA-Fragmentmuster. Drei Kulturen ließen sich mittels PFGE-Analyse nicht untersuchen. Es konnten überwiegend keine Übereinstimmungen der DNA-Fragmentmuster festgestellt werden und die untersuchten *S. phocae*-Kulturen ließen keine Beziehung zueinander erkennen. Dies gab zu der Vermutung Anlaß, daß Kreuzinfektionen von *S. phocae* zwischen einzelnen Tieren eher selten auftraten. Bei einem Vergleich der DNA-Fragmentmuster der *S. phocae*-Kulturen, die aus unterschiedlichen Organen jeweils eines Tieres

isoliert werden konnten, erwiesen sich bei drei Tieren die Fragmentmuster sogar als unterschiedlich (P11, P16, P33 und P35). Weitere sechs Tiere (P22, P27, P34, P38 und H2), bei denen jeweils mehrere *S. phocae*-Kulturen isoliert werden konnten, zeigten sowohl Kulturen mit völlig identischen DNA-Fragmentmustern, als auch Kulturen mit unterschiedlichen DNA-Fragmentmustern. Aufgrund sorgfältiger Probenentnahme, Registrierung, Transport und Kultivierung ist eine Kreuzkontamination verschiedener Erreger auszuschließen. Der Infektionsweg und die Bedeutung des Auftretens von verschiedenen *S. phocae*-Kulturen bei einem Tier für das Erkrankungsbild des jeweiligen Tieres ist bislang noch unklar. Dies stand im Gegensatz zu den Untersuchungen von SWENSHON et al. (1998), die bei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Schweinswalen eines Tieres bzw. verschiedener Tiere, übereinstimmende, das heißt identische oder nah verwandte Restriktionsmuster und somit Bakterienklone nachweisen konnten.

Bei drei Tieren der vorliegenden Untersuchungen konnten *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen jeweils eines Tieres, nachgewiesen werden, deren DNA-Fragmentmuster eine vollständige Übereinstimmung aufwies. Die Todesursache zweier dieser Tiere war eine durch *S. phocae* verursachte Sepsis und das dritte Tier starb an einer sekundär durch *S. phocae* verursachten Bronchopneumonie.

HARTSTEIN et al. (1995) untersuchten Bakterienkulturen verschiedener Spezies, die von Personen im zeitlichen Abstand von mehreren Tagen von den selben Körperstellen der Patienten isoliert worden waren. Der überwiegende Teil der Kulturen zeigte keine Veränderung der DNA-Fragmentmuster. Auch DNA-Fragmentmuster von Subkulturen einer methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Kultur, die eine Epidemie in Portugal ausgelöst hatten, waren nach zwei Jahren nicht verändert oder wiesen Unterschiede von weniger als drei Fragmenten zum Ursprungsmuster auf (SANCHES et al., 1995b).

Im Weiteren konnten in den vorliegenden Untersuchungen vereinzelt *S. phocae*-Kulturen isoliert werden, die von unterschiedlichen Tieren stammten und ein identisches DNA-Restriktionsmuster aufwiesen. Anhand des Vorberichts ließen sich keine epidemiologischen Zusammenhänge zwischen diesen Tieren nachweisen. Unter Berücksichtigung der pathologisch-anatomischen und histologischen Befunde der untersuchten Seehunde und Kegelrobben schienen ferner keine *S. phocae*-Isolate mit spezifischem Restriktionsmuster für spezielle Erkrankungen verantwortlich zu sein. Im Gegensatz dazu waren bei methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA), isoliert vom Menschen und bei *S. aureus*, isoliert von Rindermastitiden, einzelne Bakterienklone für das jeweilige Erkrankungsbild verantwortlich (KREISWIRTH et al., 1993; SANCHES et al., 1995 a, b; FITZGERALD et al., 1997; LÄMMLER et al., 1997; SCHMITZ et al., 1997; VAN BELKUM et al., 1995, 1997; WICHELHAUS et al., 1997; ANNEMÜLLER, 1999).

Nach Makrorestriktionsanalyse der in dieser Arbeit beschriebenen *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen und der vergleichsweise untersuchten *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Schweinswalen aus der Nord- und Ostsee (SWENSHON et al., 1998), mit den Restriktionsenzymen *Apa* I und *Sma* I erfolgte eine Analyse der Fragmentunterschiede, getrennt für jedes Enzym, nach den Angaben von TENOVER et al. (1994). Für beide Enzyme konnten innerhalb der untersuchten L-Streptokokken jeweils fünf unterschiedliche DNA-Fragmentmuster gefunden werden. Die Restriktionsmuster des Enzyms *Apa* I zeigten eine größere Anzahl an Fragmentunterschieden als die entsprechenden Muster des Enzym *Sma*I. Auch andere Autoren fanden bei verschiedenen Enzymen eine unterschiedliche Diskriminationsfähigkeit (HALL et al., 1996; FEIZABADI et al., 1996; PANTUCEK et al., 1996).

Die beiden *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von einer Kegelrobbe aus der Ostsee, die ein identisches DNA-Fragmentmuster

aufwiesen, erwiesen sich, sowohl nach Untersuchungen mit dem Enzym *ApaI* als auch mit dem Enzym *SmaI*, als mit keiner anderen Kultur genetisch verwandt.

Die vergleichsweise untersuchten zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von zwei Schweinswalen aus der Ostsee, waren nach den Kriterien von TENOVER et al. (1995) untereinander 'nah verwandt' und wurden bereits von SWENSHON (1997) beschrieben.

Nach den Kriterien von TENOVER et al. (1995) waren die L-Streptokokken-Kultur (P35 I) der vorliegenden Arbeit, isoliert von einem Seehund aus der Nordsee, und die L-Streptokokken-Kultur des Schweinswals P (Leber 18865), beschrieben von SWENSHON (1997), die von einem Schweinswal aus der Nordsee isoliert worden war, 'nahe verwandt' oder zumindest 'möglicherweise verwandt'. Dies konnte mit den Restriktionsmustern nach Verdau mit dem Enzym *ApaI* als auch nach Verdau mit dem Enzym *SmaI* festgestellt werden. Dieser Befund war überraschend, da bei unterschiedlichen Tierarten auch unterschiedliche Bakterienklone erwartet würden. Bei Betrachtung des Funddatums dieser beiden Tiere fiel auf, dass sie im zeitlichen Abstand von etwa drei Jahren (1995/1998) gefunden wurden. Diese *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von einem Seehund und einem Schweinswal aus der Nordsee, veränderten sich über einen Zeitraum von etwa drei Jahren nicht oder nahezu nicht. Ferner fiel bei der Betrachtung des Fundortes auf, daß beide Tiere aus der selben Nordseeregion zwischen Amrum und Sylt stammten. Das Vorkommen beider Tierarten im selben Habitat, kann möglicherweise zu einer Übertragung der L-Streptokokken geführt haben.

Auch von zahlreichen anderen Autoren wurde eine lange Stabilität der bakteriellen DNA nachgewiesen (MIRANDA et al., 1991; GEORGE und KLOOS, 1994; LEFÈVRE et al., 1994; SCHWARZ und LIEBISCH, 1994; SANCHES et al., 1995a, b; BUSCH et al., 1996; KLUYTMANS et al., 1998; SWENSHON et al., 1998). Über die Häufigkeit von Mutationen, die sich auf die DNA-Fragmentmuster auswirken, liegen bei den verschiedenen Bakterienspezies noch keine Untersuchungen vor. Die Untersuchungen von BUSCH et al. (1996)

sprachen für eine jahrelange Stabilität der DNA von *Borrelia burgdorferi*, da nach einem Isolierungsabstand von 4 Jahren identische DNA-Fragmentmuster festgestellt werden konnten. Auch LEFÈVRE et al. (1994) wiesen bei *S. pneumoniae* nach mehreren Jahren noch ein identisches DNA-Fragmentmuster nach. SCHWARZ und LIEBISCH (1994) untersuchten einen Impfstamm von *Salmonella typhimurium*, der nach 22 Monaten und Tierpassage ein unverändertes DNA-Fragmentmuster aufwies. Bei *Enterococcus faecium*-Kulturen beschrieben MIRANDA et al. (1991) die Stabilität der DNA-Fragmentmuster von über einem Jahr. Ebenso fanden SANCHES et al. (1995a) *Staphylococcus aureus* DNA-Fragmentmuster, die sich trotz intensiver Subkultivierung nicht veränderten. Auch GEORGE und KLOOS (1994) zeigten nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *Sma*I fast identische PFGE-Muster bei *Staphylococcus capitis*- und *Staphylococcus caprae*-Isolaten aus verschiedenen Ländern mit mehreren Jahren Abstand zwischen den Isolierungen. SWENSHON et al. (1998) beschrieben identische DNA-Fragmentmuster bei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Schweinswalen, die in 3 ½ jährigem Abstand gefunden worden waren. Diese *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen von Schweinswalen wiesen jedoch keine Verwandtschaft zu *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von landlebenden Tieren bzw. vom Menschen, auf.

Im Weiteren wurden die verwandtschaftlichen Beziehungen der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen der vorliegenden Untersuchung durch die Erstellung von Dendrogrammen für die *Apa*I- bzw. *Sma*I-Fragmentmuster untersucht. Die beiden Dendrogramme basieren auf dem Vergleich der Fragmentmuster und geben den euklidischen Abstand der DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der untersuchten *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen zueinander wieder. In einem Koordinatensystem ist der euklidische Abstand zweier Punkte geometrisch darstellbar mit der Länge der direkten Verbindungslinien der zu vergleichenden Punkte. Dabei haben Isolate

einer Restriktionsgruppe den Abstand Null, da sie völlig identische DNA-Fragmentmuster aufweisen. Die Untersuchung von epidemiologischen bzw. genetischen Beziehungen erfolgte mittels solcher Analysen unter anderem bereits bei *Saphylococcus aureus* (GOULOUMÉS et al., 1996; PANTUCEK et al., 1996), *Campylobacter fetus* (FUJITA et al., 1995), *Listeria monocytogenes* (PROCTOR et al., 1995) und *Salmonella typhi* (THONG et al., 1995). Ein Dendrogramm, das auf den prozentualen Unterschieden der DNA-Fragmentmuster mittels PFGE basierte, erstellten FEIZABADI et al. (1996) und WONG et al. (1996). Vergleiche der 'DNA-Fingerprints' in Prozent der Gemeinsamkeiten stellten TALON et al. (1996) dar.

Bei Betrachtung der Dendrogramme der *ApaI*- und *SmaI*-Fragmentmuster fiel ein Abstand von Null zwischen den *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von einer Kegelrobbe aus der Ostsee, auf. Dies war aufgrund der identischen Fragmentmuster zu erwarten. Die zwei *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von zwei Schweinswalen aus der Ostsee wiesen eine vergleichbare Beziehung zueinander auf, wie die beiden *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von einem Seehund aus der Nordsee und einem Schweinswal aus der Nordsee. Dies war mit den *ApaI*- und *SmaI*-Fragmentmustern feststellbar. Die Dendrogramme der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, die aufgrund der *ApaI*- und *SmaI*-Restriktionsmuster erstellt worden waren, bestätigten und ergänzten die PFGE-Analysen.

Die Bakterienspezies *S. phocae* konnte bisher ausschließlich bei Seehunden und Südafrikanischen Seebären nachgewiesen werden. Die Isolierung dieser Bakterienspezies bei der Kegelrobbe wurde in den vorliegenden Untersuchungen erstmals beschrieben. Bei Schweinswalen (SWENSHON, 1997), jedoch bei keinen weiteren marinen Säugetieren, wurde bisher die Bakterienspezies *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L beschrieben, und der Nachweis bei Seehunden und Kegelrobben gelang ebenfalls in den vorliegenden

Untersuchungen erstmalig. Die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Streptokokken, *S. phocae* und *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L, isoliert von marinen Säugetieren, im Vergleich zu Streptokokken, isolierbar von terrestrischen Säugetieren, insbesondere die unterschiedlichen Resistenzmuster gegenüber verschiedenen Antibiotika, lassen auf eine evolutionäre ökologische Nische dieser Streptokokken im Meer bzw. bei den dort lebenden Säugetieren schließen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen ermöglichten eine Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von 72  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken, isoliert von Seehunden und Kegelrobben aus der deutschen Nord- und Ostsee. Aufgrund kultureller, biochemischer, serologischer und auch molekularer Untersuchungen konnten 69 Kulturen als *S. phocae* und drei Kulturen als *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L identifiziert werden. Dies ist der erste Nachweis über das Vorkommen der Spezies *S. phocae* bei Kegelrobben. Von den 69 *S. phocae*-Kulturen wurden acht Kulturen der serologischen Gruppe C und 61 Kulturen der serologischen Gruppe F zugeordnet. Einige typische biochemische Eigenschaften der untersuchten *S. phocae*-Kulturen waren eine positive Fructose-, D-Mannose- und Ribose-Reaktion sowie der fehlende Abbau von Lactose, Salicin, Sorbit, Trehalose, Äskulin, Arginin und Na-Hippurat.

Eine molekulare Charakterisierung der *S. phocae*-Isolate erfolgte, nach Sequenzierung, durch Amplifizierung des 16S ribosomalen RNA-Gens. Die Restriktionsmuster unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EaeI* und *HincII* erwiesen sich als speziesspezifisch. Eine zweite Strategie zum PCR-vermittelten Nachweis lag in der Entwicklung von *S. phocae*-spezifischen Oligonukleotidprimern, die unter Einbeziehung der *S. phocae*-spezifischen V2-Region entwickelt wurden. Mit diesen speziesspezifischen Oligonukleotidprimern war eine eindeutige Spezieszuordnung aller 69 *S. phocae*-Kulturen sowie der *S. phocae*-Referenzkulturen möglich.

Weitere phänotypische Eigenschaften der überwiegenden Zahl der *S. phocae*-Kulturen waren eine lange streptokokkentypische Kettenformationen, ein Wachstum in Flüssigmedium mit wattigem bis körnigem Bodensatz bei gleichzeitig klarem Überstand, ein kompaktes Wachstum in Soft-Agar und eine



Aggregation mit einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,1 mol/l. Die *S. phocae*-Kulturen waren ferner empfindlich gegenüber den meisten untersuchten Antibiotika.

DNA-Fragmentmuster von 66 *S. phocae*-Kulturen konnten durch Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA der Kulturen mittels Pulsfeldgelelektrophorese erstellt werden. Dies ergab 29 verschiedene DNA-Fragmentmuster. Es konnten überwiegend keine Übereinstimmungen der DNA-Fragmentmuster festgestellt werden. Kreuzinfektionen zwischen einzelnen Tieren scheinen somit eher selten aufzutreten. DNA-„Fingerprints“ der isolierten *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen ergaben einen deutlichen Unterschied von Isolaten aus der Nord- und Ostsee. Im Weiteren zeigte ein L-Streptokokken-Nordsee-Isolat, isoliert von einem Seehund und ein vergleichsweise untersuchtes L-Streptokokken-Isolat von einem Schweinswal aus der Nordsee, eine teilweise Verwandtschaft. Das Vorkommen beider Tierarten im selben Habitat, lässt eine Übertragung der L-Streptokokken vermuten.

## 7. Summary

The present study allowed an identification and further characterisation of 72  $\beta$ -haemolytic streptococci isolated from harbour seals and grey seals of the German North and Baltic Seas. As a result of cultural, biochemical, serological and also molecular methods 69 bacterial cultures could be identified as *S. phocae* and three cultures as *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L. This is the first evidence of the species *S. phocae* occurring in grey seals. Eight of the 69 *S. phocae*-cultures belonged to the serological group C and 61 cultures to the serological group F. Some typical biochemical properties of the *S. phocae*-cultures, investigated in the present study, were a positive fructose, D-mannose and ribose reaction as well as a missing reaction with lactose, salicin, sorbitol, trehalose, esculin, arginine and hippurate.

A molecular characterisation of the *S. phocae*-isolates resulted from an amplification of the 16S ribosomal RNA-gene after sequencing. The amplicons were proven to be species specific using the restriction enzymes *EaeI* and *HincII*. A second strategy for a PCR arranged species identification were the design of *S. phocae*-specific oligonucleotide primers in consideration of the *S. phocae*-specific V2-region. Using this species specific oligonucleotide primers a clear species affiliation of all 69 *S. phocae*-cultures as well as the *S. phocae*-reference cultures were possible.

Further phenotypic properties of most of the *S. phocae*-cultures were a long streptococci typical chain formation, growing as a cotton-granular sediment in fluid media with a simultaneously clear supernatant, compact growing in soft agar and an aggregation reaction in a 0,1 mol/l ammonium sulfate concentration. In addition the *S. phocae*-cultures were susceptible to most of the antibiotics investigated.

DNA-fragment patterns of 66 *S. phocae*-cultures were created by macrorestriction analysis of chromosomal DNA of the bacterial cultures using pulsed-field gel electrophoresis. This resulted in 29 different DNA-fragment patterns. Predominantly there was no consistence of the DNA-fragment patterns realised. Consequently cross infections between particular animals seems to occur rarely. DNA-„fingerprints” of the isolated *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-cultures resulted in an obvious distinction of isolates from the North and Baltic Seas. Furthermore a group L-streptococci-North Sea isolate, isolated from a harbour seal, showed a partial relationship to a comparatively investigated group L-streptococci-isolate from a harbour porpoise of the North Sea. The occurrence of both animal species in the same habitat might have caused a transmission of the group L-streptococci.

## 8. Literarurverzeichnis

### **Abdulmawjood, A.:**

Phäno- und genotypische Charakterisierung von *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1999.

### **Abdulmawjood, A., und Lämmler, C.:**

Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B.

Res. Vet. Sci., **67**, 159-162, 1999.

### **Abdulmawjood, A., und Lämmler, C.:**

Determination of intraspecies variations of the V2 region of the 16S rRNA gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Res. Vet. Sci., **68**, 33-39, 2000.

### **Abdulmawjood, A., Weiß, R., und Lämmler, C.:**

Species identification of *Streptococcus porcinus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA.

Res. Vet. Sci., **65**, 85-86, 1998.

### **Abt, K.F.:**

Kegelrobben (*Halichoerus grypus*) und Seehund (*Phoca vitulina*).

Fartmann T., Gunnemann, H., Salm, P., und Schröder, E.: Berichtspflichten in Natura-2000-Gebieten – Empfehlungen zur Erfassung der Arten des Anhang II und Charakterisierung der Lebensraumtypen des Anhangs I der FFH-Richtlinie.

Bundesamt für Naturschutz, Bonn-Bad Godesberg, 2001.

**Abt, K., Bandomir, B., Marxen, S., Siebert, U., und Adelong, D.:**

Robbenmonitoring und –forschung in Schleswig-Holstein 1997.

Bericht an das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Büsum, 1998.

**Abt, K.F., Hoyer, N., Koch, L., und Adelong, D.:**

The dynamics of grey seals (*Halichoerus grypus*) of Amrum in south eastern North Sea – evidence of an open population.

J. Sea. Res., **47**, 55-67, 2002.

**Amann, R.I., Ludwig, W., und Schleifer, K.H.:**

Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.

Microbiol. Rev., **59**, 143-169, 1995.

**Annemüller, C.:**

Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*, isoliert von Vögeln der Ordnung Psittaciformes und Passeriformes.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1999.

**Andersson, S.S., Baker, J.R., Prime, J.H., und Baird, A.:**

Mortality in grey seal pups: incidence and causes.

J. Zoo., **189**, 3, 407-417, 1979.

**Arbeit, A.D., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R.K., und Goldstein, R.:**

Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: The application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology.

J. Infect. Dis., **161**, 230-235, 1990.

**Bandomir, B., Marxen, S., Taylor, J., Siebert, U., und Adelung, D.:**

Totfundmonitoring von Robben in Schleswig-Holstein 1998.

Bericht an das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Büsum, 1999.

**Bandomir, B., Siebert, U., und Adelung, D.:**

Untersuchungen zum Gesundheitszustand von Robben in Schleswig-Holstein 1999.

Bericht an das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Büsum, 2000a.

**Bandomir, B., Siebert, U., und Adelung, D.:**

Untersuchungen zum Gesundheitszustand von Robben in Schleswig-Holstein 2000.

Bericht an das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Büsum, 2000b.

**Barry, T., Collieran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., und Gannon, F.:**

The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria.

PCR. Methods. Appl., **1**, 149, 1991.

**Belkum van, A., Eriksen, N.H.R., Sijmons, M., van Leeuwen, W., van den Bergh, M., Kluytmans, J., Espersen, F., und Verbrugh, H.:**

Coagulase and protein A polymorphism do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*.

J. Med. Microbiol., **46**, 222-223, 1997.

**Belkum van, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koeleman, H., Melchers, W., Meis, J., Elaichouni, A., Vaneechoutte, M., Moonens, F., Maes, N., Struelens, M., Tenover, F., und Verbrugh, H.:**

Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains.

J. Clin. Microbiol., **33**, 1537-1547, 1995.

**Bentley, R.W., und Leigh, J.A.:**

Development of PCR-based hybridisation protocol for identification of streptococcal species.

J. Clin. Microbiol., **33**, 1296-1302, 1995.

**Bergner-Rabinowitz, S., Ferne, M., Fleidermann, S., Zip, G., Saran, A., und Winkler, M.:**

Group G type X: A new antigenic combination in streptococci isolated from cases of bovine mastitis in Israel.

Vet. Microbiol., **6**, 383-387, 1981.

**Bevanger, L., und Stammes, T.I.:**

Group L streptococci as the cause of bacteraemia and endocarditis.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B), **87**, 301-302, 1979.

**Blixenkroner-Møller, M., Svansson, V., Have, P., Botner, A., and Nielsen, J.:**

Infection studies in mink with seal-derived morbillivirus.

Arch. Virol., **106**, 165-170, 1989.

**Bocklisch, H., and Zepezauer, V.:**

Zur Streptokokkeninfektion des Schweines.

Monatsh. Veterinärmed., **34**, 841-846, 1979.

**Bonner, W.N.:**

The Natural History of Seals.

Christopher Helm, London, Great Britain, 1989.

**Bopp, V.:**

Vergleichende Untersuchungen von Streptokokken der serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), isoliert von Rindern in Thüringen und Hessen.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1994.

**Bostock, C.J., Barrett, T., and Crowther, J.R.:**

Characterisation of the European seal morbillivirus.

Vet. Microbiol., **23**, 351-360, 1990.

**Bressem van, M.F., van Waerebeek, K., Raga, J.A., Godfroid, J., Brew, S.D., and MacMillan, A.P.:**

Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south pacific and the mediterranean.

Vet. Rec., **148**, 657-661, 2001.

**Breuer, E.M., Hofmeister, R., Ernst, R., Horchner, F., and Hoppner, I.:**

Seal deaths in the Wadden Sea by Sylt in 1988: significance of the high degree of lungworm cases with a hypersensitivity reaction.

Zentralbl. Veterinärmed., **35**, 467-473, 1988.



**Broome, C.V., Moellering, R.C.Jr., und Watson, B.K.:**

Clinical signification of Lancefield groups L-T streptococci isolated from blood and cerebospinal fluid.

J. Infect. Dis., **133**, 382-392, 1976.

**Brown, D.R., und Brown, M.B.:**

16S rRNA gene nucleotide sequences of the bovine mastitis bacterial pathogens *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*.

Zugangsnummern der Gendatenbank: U41048, 1995.

**Brown, M.B., und Roberts, M.C.:**

Tetracyclin resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland.

Vet. Microbiol., **29**, 173-180, 1991.

**Brückler, J., Schwarz, S., und Untermann, F.:**

Staphylokokken-Infektionen und –Enterotoxine.

Blobel, H., und Schließer, T., (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.

Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, Bd. II, Teil 1, 2. Aufl., 1994.

**Burns, J.J., und Fay, F.H.:**

Comparative morphology of the skull of the ribbon seal, *Histriophoca fasciata*, with remarks on systematics of Phocidae.

J. Zool., **161**, 363-394, 1970.

**Busch, U., Hizo-Teufel, C., Boehmer, R., Fingerle, V., Nitschko, H., Wilske, B., und Preac-Mursic, V.:**

Three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed field gel electrophoresis and PCR.

J. Clin. Microbiol., **34**, 1072-1078, 1996.

**Carvalho, C., Geslin, P., und Vaz Pato, M.V.:**

Pulsed-field gel electrophoresis in *Streptococcus pneumoniae* isolated in France and Portugal.

Pathol. Biol., **44**, 430-434, 1996.

**Christensen, P., Kahlmeter, G., Jonsson, S., und Kronvall, G.:**

New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies absorbed from protein A-containing staphylococci.

Infect. Immun., **7**, 881-885, 1973.

**Christie, R., Atkins, N.E., und Munch-Petersen, E.:**

A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., **22**, 197-200, 1944.

**Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., und Godfroid, J.:**

Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus.

Microbes. Infect., **3**, 729-738, 2001.

**Collins, M.D., Jones, D., und Schofield, G.M.:**

Reclassification of *Corynebacterium haemolyticum* in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev. comb. nov..

J. Gen. Microbiol., **128**, 1279-1281, 1982.

**Cosby, S.L., McQuaid, S., Duffy, N., Lyons, C., Rima, B.K., Allan, G.M., McCullough, S.J., Kennedy, S., Smyth, J.A., McNeilly, F., und Craig, C.:**

Humoral immune responses in seals infected by phocine distemper virus.

Nature, **336**, 115, 1988.

**Curran, M.D., O'Loan, D., Rima, B.K., und Kennedy, S.:**

Nucleotide sequence analysis of phocine distemper virus reveals its distinctness from canine distemper virus.

Vet. Rec., **127**, 430-431, 1990.

**Curtis, S.N., und Krause, R.M.:**

Antigenic relationship between groups B and G streptococci.

J. Exp. Med., **120**, 629-637, 1964.

**Deimer, P.:**

Das Buch der Robben.

Rasch und Röhring Verlag, Hamburg, 1. Aufl., 267-270, 1987.

**Devriese, L.A.:**

Streptococcal ecovars associated with different animal species: Epidemiological significance of serogroups and biotypes.

J. Appl. Bacteriol., **71**, 478-483, 1991.

**Devriese, L.A., Hommez, J., Kilpper-Bälz, R., und Schleifer, K.H.:**

*Streptococcus canis* sp. nov.: A species of group G streptococci from animals.

Int. J. Syst. Bacteriol., **36**, 422-425, 1986.

**Dietz, R., Heide-Jørgensen, M.P., und Härkönen, T.:**

Mass deaths of harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe.

Ambio, **18**, 258-264, 1989.

**Dipersio, J.R., File, T.M.Jr., Stevens, D.L., Gardner, W.G., Petropoulos, G., und Dinsa, K.:**

Spread of serious disease-producing M3 clones of group A *Streptococcus* among family members and health care workers.

Clin. Infect. Dis., **22**, 490-495, 1996.

**Domenech, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Pascual, C., Garcia, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D., und Dominguez, L.:**

Streptococcosis in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) associated with *Streptococcus parauberis*.

J. Fish. Dis., **19**, 33-38, 1996.

**Domenech, P., Menendez, M.C., und Garcia, M.J.:**

Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species.

FEMS. Microbiol. Lett., **116**, 19-24, 1994.

**Drescher, H.E.:**

Biologie, Ökologie und Schutz der Seehunde im schleswig-holsteinischen Wattenmeer.

Landesjagdverband Schleswig-Holstein: Beiträge zur Wildbiologie, 1. Aufl., 1979.

**Dülffer-Schneitzer, B.:**

Untersuchungen zum M-Protein bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, G und L.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1993.

**Duguy, R., und Robineau, D.:**

Guide des mammifères marins d'Europe.

Neuchâtel, 1982.

**Duguy, R., und Robineau, D.:**

Handbuch der Säugetiere Europas.

Aula-Verlag GmbH, Wiesbaden, Bd. 6 Meeressäuger, Teil 2 Robben, 1992.

**Duma, R.J., Weinberg, A.N., Medrek, T., und Kunz, L.J.:**

Streptococcal infections. A bacteriologic and clinical study of streptococcal bacteremia.

Medicine, **48**, 87-127, 1969.

**Dungworth, D.L.:**

The respiratory system.

Jupp, J.V.F, Kennedy, P.C., und Palmer, N., (Hrsg.): Pathology of domestic animals

Academic Press, San Diego, U.S.A., Bd. II, 4. Aufl., 1993.

**Ellner, P.D.:**

Endocarditis due to group L *Streptococcus*.

Ann. Intern. Med., **72**, 547-548, 1970.

**Emler, S., Liassine, N., Pawlowsky, J., Hirschel, B., Rohner, P., und Auckenthaler, R.:**

Differentiation of *S. pneumoniae* from other streptococci of the viridans group by 16S rDNA sequence analysis.

American Society for Microbiology 97<sup>th</sup>, General Meeting, Miami Beach, U.S.A., Abstract No. 1273, 1997.

**Eisenach, K.D.:**

Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis.

Isenberg, H.D., (Hrsg.):

Clinical Microbiology Procedures Handbook, 10.5.c.1-10.5.c.11, 1992.

**Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., und Miller, W.G.:**

Characteristics of a *Brucella* species from a bottenlose dolphin (*Tursiops truncatus*).

J. Vet. Diagn. Invest., **6**, 448-452, 1994.

**Facklam, R.R., und Washington, J.A.:**

*Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci.

Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., and Shadomy, H.J.,

(Hrsg.): Manual of Clinical Microbiology.

Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., 238-257, 1991.

**Farrow, J.A.E., und Collins, M.D.:**

Taxonomic studies on *streptococci* of serological groups C, G and L and possibly related taxa.

Syst. Appl. Microbiol., **4**, 483-493, 1984.

**Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Cousin, D.V., und Hampson, D.J.:**

Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **34**, 1136-1142, 1996.

**Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., und Kapur, V.:**

Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows.

Epidemiol. Infect., **119**, 261-269, 1997.

**Flores, A.E., und Ferrieri, P.:**

Characterization of trypsin resistant proteins of group B streptococci (GBS).

XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, St. Petersburg, Rußland, 06.-10. 09.1993.

**Foster, G., Jahans, K.L., Reid, R.J., und Ross, H.M.:**

Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter.

Vet. Rec., **138**, 583-586, 1996.

**Fréney, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Verhoef, J., und Mooi, F.R.:**

Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism.

Europ. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis., **15**, 60-64, 1996.

**Fujita, M., Fujimoto, S., Morooka, T., und Amako, K.:**

Analysis of strains of *Campylobacter fetus* by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **33**, 1676-1678, 1995.

**Garner, M.M., Lambourn, D.M., Jeffries, S.J., Hall, P.B., Rhyan, J.C., Ewalt, D.R., Polzin, L.M., und Cheville, N.F.:**

Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in a pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*).

J. Vet. Diagn. Invest., **9**, 298-303, 1997.

**Gedek, B.:**

*Brucella*.

Rolle, M., und Mayr, A., (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Aufl., 1993.

**George, C.G., und Kloos, W.E.:**

Comparison of the *Sma* I-digested chromosomes of *Staphylococcus epidermidis* and closely related species *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus caprae*.

Int. J. Syst. Bacteriol., **44**, (3), 404-409, 1994.

**Geraci, J.R., Aubin, D.J.St., Barker, I.K., Webster, R.G., Hinshaw, W.S., Bean, W.J., Ruhnke, H.L., Prescott, J.H., Early, G., Baker, A.S., Madoff, S., und Schooley, R.T.:**

Mass mortality of harbour seals: pneumonia associated with influenza A virus.

Science, **215**, 1129-1131, 1982.

**Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C.J., und Murray, B.E.:**

Typing of group B streptococci: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **31**, 1430-1434, 1993a.



**Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C.J., und Murray, B.E.:**

Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*.

J. Clin. Microbiol., **31**, 1570-1574, 1993b.

**Gouloumés, C., Bes, M., Renaud, F., Lina, B., Reverdy, M.E., Brun, Y., und Fleurette, J.:**

Phenotypic and genotypic (pulsed-field gel electrophoresis) characteristics of enterotoxin-A-producing *Staphylococcus aureus* strains.

Res. Microbiol., **147**, 263-271, 1996.

**Green, P.A., Singh, K.V., Murray, B.E., und Baker, C.J.:**

Recurrent group B streptococcal infections in infants: Clinical and microbiologic aspects.

J. Pediatr., **125**, 931-938, 1994.

**Gürtürk, K.:**

Untersuchungen an Streptokokken der serologischen Gruppe G von Hund, Rind und Mensch unter besonderer Berücksichtigung mutmaßlicher Pathogenitätsfaktoren.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1989.

**Haafden van, J.L.:**

Zeehonden Langs de Nederlandse Kust.

Wetenschappelijke Mededelingen, **101**, 1-36, 1974.

**Harwood, J., Carter, S.D., Hughes, D.E., Bell, S.C., Baker, R., und Cornwell, C.:**

Seal disease predictions.

Nature, **339**, 670, 1989.

**Hall, L.M.C., Whiley, R.A., Duke, B., George, R.C., und Efstratiou, A.:**

Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: Analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns.

J. Clin. Microbiol., **34**, 853-859, 1996.

**Harder, K.:**

Zur Situation der Robbenbestände.

Lozán, J.L., Lampe, R., Matthäus, W., Rachor, E., Rumohr, H., und Westernhagen, H.: Warnsignale aus der Ostsee.

1. Aufl., 236-242, 1996.

**Hartstein, A.I., Chetchotisakd, P., Phelps, C.L., und LeMont A.M.:**

Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **22**, 309-314, 1995.

**Harwood, J., Carter, S.D., Hughes, D.E., Bell, S.C., Baker, J.R., and Cornwell, H.J.:**

Seal disease predictions.

Nature, **339**, 670, 1989.

**Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Yildirim, A.O., Fink, K., Lämmle, C., und Schlenstedt, R.:**

Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes.

Can. J. Microbiol., **46**, 946-951, 2000.

**Henton, M.M., Zapke, O., und Basson, P.A.:**

*Streptococcus phocae* infections associated with starvation in cape fur seals.

S. Afr. Vet. Ver., **70**, (2), 98-99, 1999.

**Hofmeister, R., Breuer, E., Ernst, R., Hentschke, J., Molle, G., und Ludwig, H.:**

Distemper-like disease in harbor seals: virus isolation, further pathologic and serologic findings.

Zentralbl. Veterinärmed. **35**, 765-769, 1988.

**Hommez, J., Devriese, L.A., Castryck, F., und Miry, C.:**

Beta-hemolytic streptococci from pigs: Bacteriological diagnosis.

J. Vet. Med. **B 37**, 441-444, 1991.

**Honacki, J.H., Kinman, K.E., und Koepl, J.W.:**

Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference.

Lawrence, Kansas, USA, 1982.

**Hoyer, N.:**

Bestandserfassung von Kegelrobben (*Halichoerus grypus*) im schleswig-holsteinischen Wattenmeer mit Hilfe der Fotoidentifikationsmethode.

Diplomarbeit, Christian-Albrecht-Universität Kiel, 1998.

**Hutson, R.A., Thompson, D.E., und Collins, M.D.:**

Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences.

Microbiol. Lett., **108**, 103-110, 1993.

**Hwang, M.N., und Ederer, G.M.:**

Rapid hippurate hydrolysis for presumptive identification of group B streptococci.

J. Clin. Microbiol., **1**, 114-115, 1975.

**Jahans, K.L., Foster, G., und Broughton, E.S.:**

The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals.

Vet. Microbiol., **57**, 373-382, 1997.

**Jayarao, B.M., Doré, J.R., und Oliver, S.P.:**

Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin.

J. Clin. Microbiol., **30**, 2235-2240, 1992.

**Jelinkova, J.:**

Group B *streptococci* in human population.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., **76**, 127-165, 1977.

**Jelinkova, J. , Bicova, R., und Rotta, J.:**

Some manifestations of a relationship between group A and L streptococci.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., **11**, 353-358, 1967.

**Jensen, A.E., Cheville, N.F., Thoen, C.O., MacMillan, A.P., und Miller, W.G.:**

Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins.

J. Vet. Diagn. Invest., **11**, 152-157, 1999.

**Jensen, M.A., Webster, J.A., und Straus, N.:**

Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms.

Appl. Environ. Microbiol., **59**, 945-952, 1993.

**Johnson, P., und Wadström, T.:**

Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT).

Curr. Top. Microbiol., **10**, 203-210, 1984.

**Karakawa, W.W., Wagner, J.E., und Pazur, J.H.:**

Immunochemistry of the cellwall carbohydrate of group L hemolytic streptococci.

J. Immunol., **107**, 554-562, 1971.

**Katafos, F.C., Jones, C.W., und Aalbaek, B.:**

Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure.

Nucleic Acids Res., **7**, 1541-1552, 1979.

**Kennedy, S.:**

A review of the 1988 European seal morbillivirus epizootic.

Vet. Rec., **127**, 563-567, 1990.

**Kennedy, S., Smyth, J.A., McCullough, S.J., Allan, G.M., McNeilly, F., und McQuaid, S.:**

Confirmation of cause of recent seal deaths.

Nature, **335**, 404, 1988.

**Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., Duignan, P., Platten, M., McCullough, S.J., und Allan, G.M.:**

Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals.

Vet. Pathol., **26**, 97-103, 1989.

**King, J.E.:**

Seals of the world

Cornell University Press, New York, USA, 2. Aufl., 1983.

**Kluytmans, J., Berg, H., Steegh, P., Vanenesch, F., Etienne, J., und van Belkum, A.:**

Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by random amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **36**, 2214-2219, 1998.

**Köhler, W., und Prokop, O.:**

Agglutination of streptococci of the group C by an agglutinin from *Helix pomatia*.

Z. Immunitätsforsch. Allerg. Klin. Immunol., **133**, 50-53, 1967.

**Kolbert, C.P., und Persing, D.H.:**

Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens.

Curr. Opin. Microbiol., **2**, 299-305, 1999.

**Kostman, J.R., Edlind, T.D., LiPuma, J.J., und Stull, T.L.:**

Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping.

J. Clin. Microbiol., **30**, 2084-2087, 1992.

**Krantz, G.E., und Dunne, H.W.:**

An attempt to classify streptococcal isolates from domestic animals.

Am. J. Vet. Res., **26**, 951-958, 1965.

**Kreiswirth, B., Kornblum, J., Arbeit, R.D., Eisner, W., Maslow, J.N., McGeer, A., Low, D.E., und Novick, R.P.:**

Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*.  
Science, **259**, 227-230, 1993.

**Krogsrud, J., Evensen, O., Holt, G., Hoie, S., und Markussen, N.H.:**

Seal distemper in Norway in 1988 and 1989.  
Vet. Rec., **126**, 460-461, 1990.

**Kühn, I., Burman, L.G., Högman, S., Tullus, K., und Murray, B.E.:**

Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci.  
J. Clin. Microbiol., **33**, 2812-2817, 1995.

**Kuiken, T., und Hartmann, M.G. (Hrsg.):**

Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling.  
Proc. ECS Workshop, Leiden, Niederlande, 1993.

**Kunter, E.:**

Gehäuftes Auftreten von Infektionen des Rindereuters durch  $\beta$ -hämolytische Streptokokken der Gruppe C, G und L.  
Monatsh. Veterinärmed., **23**, 174-178, 1968.

**Kuusela, P.:**

Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*.  
Nature, **276**, 118-120, 1978.

**Lämmler, C., und Blobel, H.:**

Streptokokken der serologischen Gruppe B von Mensch und Rind.

Tierärztl. Umsch., **2**, 148-152, 1987.

**Lämmler, C., und Hahn, G.:**

Streptokokken.

Blobel, H., und Schließer, T., (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.

Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, Bd. II, Teil 2, 2. Aufl., 1994.

**Lämmler, C., Gürtürk, K., und Blobel, H.:**

Streptococcal group B type antigen X in group L streptococci.

J. Clin. Microbiol., **25**, 1803-1804, 1987.

**Lämmler, C., Annemüller, C., Betzel, T., und Zschök, M.:**

Molekulare Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von Rindermastitiden.

38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, September 1997, Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht S. 249-256, 1997.

**Lämmler, C., Abdulmawjood, A., Danic, G., Vaillant, S., und Weiß, R.:**

Differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* by restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S ribosomal RNA gene and further studies on serological properties.

Med. Sci. Res., **26**, 177-179, 1998a.

**Lämmler, C., Abdulmawjood, A., und Weiß, R.:**

Properties of serological group B streptococci of dog, cat and monkey origin.

J. Vet. Med., **45**, 561-566, 1998b.



**Lancefield, R.C.:**

A serological differentiation of human and other groups of streptococci.

J. Exp. Med., **57**, 571-595, 1933.

**Lancefield, R.C.:**

Serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B).

J. Exp. Med., **59**, 441-458, 1934.

**Lancefield, R.C.:**

Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test.

J. Exp. Med., **106**, 525-544, 1957.

**Lancefield, R.C., and Perlman, G.E.:**

Preparations and properties of a protein (R-antigen) occurring in streptococci of group A type 28 and in certain streptococci of serological groups.

J. Exp. Med., **96**, 83-97, 1952.

**Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R.:**

Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.

Proc. Natl. Acad. Sci., **82**, 6955-6959, 1985.

**Lefèvre, J.C., Gasc, A.M., Lemozy, J., Sicard, A.M., and Faucon, G.:**

Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains.

Path. Biol., **42**, 547-552, 1994.

**Lewin, B.:**

The mystique of epigenetics.

Cell., **93**, 301-303, 1998.

**Lindahl, M., Faris, A., Wadström, T., und Hjerten, S.:**

A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells.

Biochim. Biophys. Acta, **677**, 471-476, 1981.

**Linden, V.:**

Mouse-protective effect of rabbit anti-R-protein antibodies against group B streptococci type II carrying R-protein.

Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B), **91**, 145-151, 1983.

**Linden, V., Christensen, K.K., und Christensen, P.:**

The occurrence of R-protein among isolates of group B streptococci from human sources.

Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B), **91**, 153-156, 1983.

**Lorenzen, P.:**

Vorkommen von Streptokokken verschiedener serologischer Gruppen als Mastitiserreger unter besonderer Berücksichtigung der Gruppe L.

Arch. Lebensmittelhyg., **19**, 57-60, 1968.

**Maghami, G.H., Hooshmand-Rad, P., und Farhang-Azad.:**

Leptospirosis in small mammals of Iran: Isolation of *Leptospira grippotyphosa* from *Mus musculus*.

J. Wildl. Dis., **13**, 286-289, 1977.

**Mantovani, A., Restani, R., Sciarra, D., und Simonella, P.:**

Streptococcus L infection in dog.

J. Small Anim. Pract., **2**, 185-194, 1961.

**Martin, D.R., und Single, L.A.:**

Molecular epidemiology of group A *Streptococcus* M type 1 infections.

J. Infect. Dis., **167**, 1112-1117, 1993.

**Maslow, J.N., Mulligan, M.E., und Arbeit, R.D.:**

Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms.

Clin. Infect. Dis., **17**, 153-164, 1993a.

**Maslow, J.N., Slutsky, A.M., und Arbeit, R.D.:**

Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology.

Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., and White, T.J. (Hrsg.):

Diagnostic Molecular Microbiology.

Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., USA, 563-572, 1993b.

**Maxted, W.R.:**

Occurrence of the M substance of type 28 group A streptococci of Lancefield's group B, C and G.

J. Gen. Microbiol., **3**, 1-6, 1949.

**Miranda, A.G., Singh, K.V., und Murray, B.E.:**

DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemic tool.

J. Clin. Microbiol., **29**, 2752-2757, 1991.

**Müller, G.:**

Die Typisierung der Streptokokken der serologischen Gruppe B. V. Mitteilung: Biologische, biochemische und kulturelle Variabilität der B-Streptokokken. Arch. Exp. Vet. Med., **22**, 521-534, 1968.

**Müller, G., Siebert, U., Wünschmann, A., und Baumgärtner, W.:**

Immunohistological and serological investigation of morbillivirus infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German Baltic and North Sea. Vet. Microbiol., **75**, 17-25, 2000.

**Nagai, T., Anagisawa, Y., Köhler, W., und Prokop, O.:**

Identification of group C *Streptococcus* with *Helix pomatia* lectin in use for blood grouping. Nippon. Saikingaku. Zasshi., **49**, 779-785, 1994.

**Newton, C.R., und Graham, A.:**

PCR

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Aufl., 1997.

**Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., und Thomas, F.:**

A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. J. Immunol. Methods., **195**, 161-168, 1996.

**Niewerth, B.:**

Wechselwirkungen zwischen Gram-positiven Bakterien, Lektinen und Körperzellen.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1987.

**Niewerth, B., Lämmler, C., und Blobel, H.:**

Reactions of lectins with animal-pathogenic streptococci of the serological group C and *Streptococcus uberis*.

Zentralbl. Veterinärmed. B., **34**, 206-210, 1987.

**NÆrgaard, N., und Larsen, B.H.:**

Age determination of harbour seals (*Phoca vitulina*) by cementum growth layers, x-ray of teeth and body length.

Dan. Rev. Game Biol., **14**, 17-32, 1991.

**Osterhaus, A.D.:**

Seal death.

Nature, **334**, 301-302, 1988.

**Osterhaus, A.D., und Vedder, E.J.:**

Identification of virus causing recent seal deaths.

Nature; **335**, 20, 1988.

**Osterhaus, A.D., Uytdehaag, F.G., Visser, I.K., Vedder, E.J., Reijnders, P.J., Kuiper, J., und Brugge, H.N.:**

Seal vaccination success.

Nature, **337**, 21, 1989.

**Ouchterlony, O.:**

Antigen-antibody reactions in gel.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., **26**, 507, 1949.

**Pantucek, R., Götz, F., Doskar, J., und Royspal, S.:**

Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis.

Int. J. Syst. Bacteriol., **46**, 216-222, 1996.

**Pasaribu, F.H., Lämmler, C., und Blobel, H.:**

Serotyping of bovine and human group B streptococci by coagglutination.

IRCS Med. Sci., **13**, 24-25, 1985.

**Pattison, I.H., Matthews, P.R.J., und Howell, D.G.:**

The typing classification of group B streptococci with special reference to bovine strains apparently lacking in type polysaccharide.

J. Pathol. Bacteriol., **69**, 51-59, 1955a.

**Pattison, I.H., Matthews, P.R.J., und Maxted, W.R.:**

Type classification by Lancefield's precipitating method of human and bovine group B streptococci isolated in Britain.

J. Pathol. Bacteriol., **69**, 43-50, 1955b.

**Perch, B., und Olsen, S.J.:**

Studies on the type antigen of group L hemolytic streptococci.

Nord. Veterinaermed., **16**, 241-263, 1964.

**Pritchard, D.G., Michalek, S.M., McGhee, J.R., und Furner, R.L.:**

Structure of the serotype F polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*.

Carbohydr. Res., **166**, 123-131, 1987.

**Proctor, M.E., Brosch, R., Mellen, J.W., Garrett, L.A., Kaspar, C.W., und Luchansky, J.B.:**

Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk.

Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3177-3179, 1995.

**Rainard, P., Lautrou, Y., Sarradin, P., Coulibaly, A., und Poutrel, B.:**

The kinetics of inflammation and phagocytosis during bovine mastitis induced by *Streptococcus agalactiae* bearing the protein X.

Vet. Res. Comm., **15**, 163-176, 1991a.

**Rainard, P., Lautrou, Y., Sarradin, P., Coulibaly, A., und Poutrel, B.:**

Protein X and *Streptococcus agalactiae* induces opsonic antibodies in cows.

J. Clin. Microbiol., **29**, 1842-1846, 1991b.

**Ramos, C.P., Foster, G., und Collins, M.D.:**

Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: Description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol., **47**, 46-53, 1997.

**Rantz, L.A., und Randall, E.:**

Use of autoclaved extracts of haemolytic streptococci for serological grouping.

Stanford Med. Bull., **13**, 290-291, 1955.

**Reijnders, P.J.H.:**

The Texel museum: its function in relation to the harbor seal population in the Dutch Wadden Sea.

Aquatic Mam., **6**, 21-29, 1978.

**Reijnders, P.J.H.:**

The effect of seal hunting in Germany on the further existence of a harbour seal population in the Dutch Wadden Sea.

Säugetierk., **48**, 50-54, 1983.

**Reilly, J.R., Hanson, L.E., und Ferris, D.H.:**

Experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira grippotyphosa* from rodents to wild marsupialia and carnivora.

Am. J. Vet. Res., **31**, 1443-1448, 1970.

**Riising, H.J.:**

Streptococcal infections in pigs. 2. Serological and biochemical examinations.

Nord. Veterinaarmed., **28**, 80-87, 1976.

**Riising, H.J., Nielsen, N.C., Bille, N., und Svendsen, J.:**

Streptococcal infections in sucking pigs. 1. Epidemiological investigations.

Nord. Veterinaarmed., **28**, 65-79, 1976.

**Rolle, M., und Mayr, A.:**

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Aufl., 1993.

**Ross, H.M., Foster, G., Reid, R.J., Jahans, K.L., und MacMillan, A.P.:**

*Brucella* species infection in sea-mammals.

Vet. Rec., **134**, 359, 1994.

**Ross, H.M., Jahans, K.L., MacMillan, A.P., Reid, R.J., Thompson, P.M., und Foster, G.:**

*Brucella* species infection in north sea seal and cetacean populations.

Vet. Rec., **138**, 647-648, 1996.



**Sabria-Leal, M., Pfaller, M.A., Morthland, V.H., Young, S.A., Hollis, R.J., Werkmeister, L., Kleiman-Wexler, R.I., und Ephgrave, K.S.:**

Molecular epidemiology of gastric colonization by *Enterococcus faecalis* in a surgical intensive care unit.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **19**, 197-202, 1994.

**Sanches, S., Ramirez, M., Troni, H., Abecassis, M., Padua, M., Tomasz, A., und de Lencastre, H.:**

Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain.

J. Clin. Microbiol., **17**, 1243-1246, 1995a.

**Sanches, S., de Sousa, M.A., Sobral, L., Calheiros, I., Felicio, L., Pedra, I., und de Lencastre, H.:**

Multidrug-resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal.

Microb. Drug Resist., **4**, 299-306, 1995b.

**Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R.:**

DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **85**, 5463-5467, 1977.

**Schaufuss, P.:**

Vergleichende Untersuchungen an pathogenen Streptokokken unter besonderer Berücksichtigung der serologischen Gruppe L.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1986.

**Schaufuß, P., Lämmle, C., Niewerth, B., und Blobel, H.:**

Properties of L-streptococci in comparison with those of A-streptococci.

Med. Microbiol. Immunol., **176**, 169-173, 1987.

**Scheffer, V.B.:**

Seals, sea lions and walrus: a review of the pinnip.

Stanford University Press, Stanford, USA, 1958.

**Scheibel, W., und Weidel, H.:**

Zum Vorkommen von Kegelrobben in Schleswig-Holstein.

Zool. Anz., **220**, 65-70, 1988.

**Schleifer, K.H., und Kilpper-Bälz, R.:**

Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol., **34**, 31-34, 1984.

**Schleifer, K.H., und Kilpper-Bälz, R.:**

Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review.

Syst. Appl. Microbiol., **10**, 1-19, 1987.

**Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., und Fischer, W.:**

Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov..

Syst. Appl. Microbiol., **6**, 183-195, 1985.

**Schmitz, F.J., Jäger, B., Tichy, H.-V., Idel, H., Hadding, U., und Heinz, H.-P.:**

Einsatzmöglichkeiten der 16S-23S-Spacer-Amplifikation und der "Random Amplified Polymorphic DNA"-Analyse zur Typisierung Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme im Rahmen nosokomialer Infektionen.

Zentralbl. Hyg., **200**, 172-188, 1997.

**Schwarz, J., und Heidemann, G.:**

Zum Status der Bestände der Seehund- und Kegelrobbenpopulation im Wattenmeer.

Lozán, J.L., Rachor, E., Reise, K., Westernhagen, H., und Lenz, W., (Hrsg.):  
Warnsignale aus dem Wattenmeer.

Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1. Aufl., 296-303, 1994.

**Schwarz, S., und Liebisch, B.:**

Puls field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* live vaccine strain Zoosoral H.

Lett. Appl. Microbiol., **19**, 469-472, 1994.

**Schwarz, S., Cardoso, M., und Wegener, H.C.:**

Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinat encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*.

Antimicrob. Agents Chemother., **36**, 580-588, 1992.

**Schwarz, S., Wibawan, I.W.T., und Lämmner, C.:**

Distribution of genes conferring combined resistance to tetracycline and minocyclin among group B streptococcal isolates from humans and various animals.

Zentralbl. Bakteriolog., **281**, 526-533, 1994.

**Sippel, K.:**

Charakterisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe L unter besonderer Berücksichtigung von Bindungseigenschaften der Bakterien für Plasmaproteine.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1994.

**Skaar, I., Gaustad, P., TÆnjum, T., Holm, B., und Stenwig, H.:**

*Streptococcus phocae* sp. nov., a new species isolated from clinical specimens from seals.

Int. J. Syst. Bacteriol., **44**, (4), 646-650, 1994.

**Soedarmanto, I., Pasaribu, F.H., Wibawan, I.W.T., und Lämmler, C.:**

Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia.

J. Clin. Microbiol., **34**, 2201-2204, 1996.

**Soedarmanto, I., Schwarz, S., Liebisch, B., und Lämmler, C.:**

Tetracyclin resistance determinants among streptococci of serological group G and L.

Vet. Microbiol., **45**, 331-337, 1995.

**Sonntag, R.P.:**

Entwicklung eines spezifischen, auf der PCR basierenden Nachweises von phociner Herpesvirus-1-DNA sowie die Anwendung dieser Methodik bei der Untersuchung von Probenmaterial der Seehundepizootie von 1988.

Biol. Diss., Universität Bremen, 1995.

**Southern, H.N.:**

The Handbook of British Mammals.

Blackwell's Science Publication, Oxford, Great Britain, 1974.

**Stamper, M.A., Gulland, F.M., und Spraker, T.:**

Leptospirosis in rehabilitated Pacific harbor seals from California.

J. Wildl. Dis., **34**, 407-410, 1998.

**Stanley, J., Linton, D., Desai, M., Efstratiou, A., und George, R.:**

Molecular subtyping of prevalent M serotypes of *Streptococcus pyogenes* causing invasive disease.

J. Clin. Microbiol., **33**, 2850-2855, 1995.

**Sultana, F., Kawamura, Y., Hou, X.G., Shu, S.E., und Ezaki, T.:**

Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group.

FEMS. Microbiol. Lett., **158**, 223-230, 1998.

**Swenshon, M.:**

Identifizierung und weitergehende Charakterisierung  $\beta$ -hämolyzierender Streptokokken, isoliert von Schweinswalen aus Nord- und Ostsee.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1997.

**Swenshon, M., Lämmler, C., und Siebert, U.:**

Identification and molecular characterization of beta-hemolytic streptococci isolated from harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) of the North and Baltic Seas.

J. Clin. Microbiol., **36**, 1902-1906, 1998.

**Talon, D., Dupont, M.J., Lesne, J., Thouverez, M., und Michel-Briand, Y.:**

Pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*.

J. Appl. Bacteriol., **80**, 277-282, 1996.

**Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Herbert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougla, L.K., Miller, M., Mulligan, M., und Pfaller, M.A.:**

Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol., **32**, 407-415, 1994.

**Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., und Swaminathan, B.:**

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing.

J. Clin. Microbiol., **33**, 2233-2239, 1995.

**Thal, E., und Moberg, K.:**

Serologische Gruppenbestimmung der bei Tieren vorkommenden  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken.

Nord. Veterinaermed., **5**, 835-846, 1953.

**Thiele, D., Willems, H., Köpf, G., und Krauss, H.:**

Polymorphism in DNA restriction pattern of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed-field gel electrophoresis and image analysis.

Eur. J. Epidemiol., **9**, 419-425, 1993.

**Thong, K., Puthucheary, S., Yassin, R.M., Sudarmono, P., Padminidewi, M., Soewandojo, E., Handojo, I., Sarasombath, S., und Pang, T.:**

Analysis of *Salmonella typhi* isolates from southeast asia by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **33**, 1938-1941, 1995.

**Trilateral Seal Expert Group:**

Common seals in the wadden sea in 2001.

Wadden Sea Newsletter No. 3, Wilhelmshafen, 20, 2001.

**Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., und Devriese, L.A.:**

Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol., **46**, 774-781, 1996.

**Visser, I.K., van de Bildt, M.W., Brugge, H.N., Reijnders, P.J., Vedder, E.J., Kuiper, J., de Vries, P., Groen, J., Walvoort, H.C., und UytdeHaag, F.G.:**

Vaccination of harbour seals (*Phoca vitulina*) against phocid distemper with two different inactivated canine distemper virus (CDV) vaccines.

Vaccine, **7**, 521-526, 1989.

**Voet, D., und Voet, J.G.:**

Biochemie.

VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Aufl., 1994.

**Vossen, A., und Abdulmawjood, A.:**

Species identification of *Streptococcus phocae* by analysis of 16S rRNA.

Zugangsnummern der Gendatenbank: AF235052, 1999.

**Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., und Weiner, A.M.:**

Molecular biology of the gene.

Addison Wesley Publishing Company, London, Great Britain, 4. Aufl., 1987.

**Weigt, U., und Grunert, E.:**

Durch seltene Streptokokken verursachte Mastitiden und deren klinisches Bild.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., **71**, 1-5, 1964.

**Wessels, M.R., DiFabio, J.L., Benedi, V.J., Kasper, D.L., Michon, F.,  
Brisson, J.R., Jelinkova, J., und Jennings, H.J.:**

Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide.

J. Biol. Chem., **266**, 6714-6719, 1991.

**Wibawan, I.W.T.:**

Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen, 1993.

**Wibawan, I.W.T., und Lämmle, C.:**

Properties of group B streptococci with protein surface antigens X and R.

J. Clin. Microbiol., **28**, 2834-2836, 1990.

**Wibawan, I.W.T., und Lämmle, C.:**

Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B.

J. Gen. Microbiol., **137**, 2721-2725, 1991.



**Wibawan, I.W.T., Lämmler, C., und Pasaribu, F.H.:**

Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells.

J. Gen. Microbiol., **138**, 1237-1242, 1992.

**Wichelhaus, T.A., Schulze, J., Hunfeld, K.P., Schäfer, V., und Brade, V.:**

Clonal heterogeneity, distribution and pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **16**, 893-897, 1997.

**Wilkinson, H.W.:**

Immunochemistry of purified polysaccharide type antigens of group B streptococcal types Ia, Ib, and Ic.

Infect. Immun., **11**, 845-852, 1975.

**Wipper, E.:**

Die Ökole beim europäischen Seehund an der niedersächsischen Nordseeküste.

Biol. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München, 1974.

**Woese, C.R.:**

Bacterial evolution.

Microbiol Rev., **51**, 221-271, 1987.

**Wong, H.C., Lu, K.T., Pan, T.M., Lee, C.L., und Shih, D.Y.C.:**

Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol., **17**, 1535-1539, 1996.

**Yoshida, K.:**

Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by the serum-soft agar technique.

Infect. Immun., **3**, 535-539, 1971.

**Yoshida, K., und Takeuchi, Y:**

Comparison of compact and diffuse variants of strains of *Staphylococcus aureus*.

Infect. Immun., **2**, 523-527, 1970.

**Yoshida, K., Nakamura, A., Tashidika, O., und Iwami, S.:**

Detection of capsular antigen production in unencapsulated strains of *Staphylococcus aureus*.

Infect. Immun., **9**, 620-623, 1974.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Seehund ( <i>Phoca vitulina</i> ). (nach DUGUY und ROBINEAU (1982), Zeichnung P. MARS).....	4
Abb. 2 Kegelrobbe ( <i>Halichoerus grypus</i> ). (nach DUGUY und ROBINEAU (1982), Zeichnung P. Mars).....	4
Abb. 3 Klassifikation der Seehunde und Kegelrobben.....	5
Abb. 4 Ansicht des Seehund- (links) und Kegelrobbenkopfes (rechts) von vorne. (nach SOUTHERN, 1974).....	6
Abb. 5 Verbreitung der Seehunde ( <i>Phoca vitulina</i> ); Karte modifiziert nach Bonner (1989).....	10
Abb. 6 Entwicklung des Seehundbestandes im europäischen Wattenmeer von 1960 bis 2001.....	12
Abb. 7 Verbreitung der Kegelrobbe ( <i>Halichoerus grypus</i> ). Karte modifiziert nach Bonner (1989).....	15
Abb. 8 Fundorte der Seehunde (P1-P5, P7-P19, P21-P38) und Kegelrobben (H1-H3).....	30

- Abb. 9 Präzipitationsreaktionen von Antigenpräparationen der Streptokokkenkulturen H2I (1), P35I (2) und der L-Streptokokken-Referenzkultur ATCC 9932 (3) mit Gruppe L-spezifischem Antiserum (A) sowie der Streptokokkenkulturen H4K (5), P18A (6) und der C-Streptokokken-Kultur *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60 (7) mit Gruppe C-spezifischem Antiserum (B); fehlende Reaktion der Kultur P4M (4, 8)..... 70
- Abb. 10 Typische Agglutinationsreaktion der Streptokokkenkultur P4M mit Serogruppe F-spezifischen Latexpartikeln des Streptokokken-Identifizierungs-Tests; negative Reaktion der L-Streptokokkenreferenzkultur ATCC 9932..... 71
- Abb. 11 Basensequenz des 16S rRNA-Gens des *S. phocae*-Referenzstammes 8399 H1 ; der Bereich der V2-Region (26 Basen) des 16S rRNA-Gens ist markiert..... 79
- Abb. 12 Vergleich des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* mit den 16S rRNA-Genen von *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. equi* und *S. iniae*..... 81
- Abb. 13 Vergleich der Nukleotidsequenzen der V2-Region des 16S rRNA-Gens von *S. phocae* mit 33 weiteren V2-Regionen verschiedener Streptokokkenspezies..... 88
- Abb. 14 Dendrogrammanalyse der V2-Region von *S. phocae* und von 32 weiteren Streptokokkenspezies..... 90

Abb. 15	Amplikon des 16S rRNA-Gens von <i>S. phocae</i> vor und nach Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>EaeI</i> .....	92
Abb. 16	Amplikon des 16S rRNA-Gens von <i>S. phocae</i> vor und nach Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>HincII</i> .....	93
Abb. 17	Typisches Amplikon der <i>S. phocae</i> -Referenzkultur 8399 H1 (2), der <i>S. phocae</i> -Serogruppe F-Kultur P4M, isoliert von einem Seehund (3), der <i>S. phocae</i> -Serogruppe C-Kultur P37J, isoliert von einem Seehund (4) und der <i>S. phocae</i> -Serogruppe F-Kultur H1J, isoliert von einer Kegelrobbe (5).....	95
Abb. 18	Kolonienmorphologie der <i>S. phocae</i> -Kulturen nach Anzüchtung in Soft-Agar mit kompakt-diffusem Kolonienwachstum sowie kompaktem Kolonienwachstum.....	97
Abb. 19	Unterschiedliche DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von drei <i>S. phocae</i> -Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P35 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>ApaI</i> .....	106
Abb. 20	DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der <i>S. phocae</i> -Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P27 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>ApaI</i> .....	107
Abb. 21	Typisches einheitliches DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der <i>S. phocae</i> -Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Seehund P4 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>ApaI</i> .....	108

- Abb. 22 Identische DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus unterschiedlichen Organen verschiedener Seehunde (P5, P21, P26 und P36) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*..... 109
- Abb. 23 Unterschiedliche DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Seehunde (P24, P27, P30 und P37) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*..... 110
- Abb. 24 DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. phocae*-Kulturen, isoliert aus verschiedenen Organen von Kegelrobbe H2 und H3 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*..... 111
- Abb. 25 DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA von sechs *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Seehund P35, Kegelrobbe H2, Schweinswal P, Schweinswal C und Schweinswal H nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI*..... 113
- Abb. 26 DNA-Fragmentmuster der chromosomalen DNA der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen, isoliert von Seehund P35, Kegelrobbe H2, Schweinswal P, Schweinswal C und Schweinswal H nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *SmaI*..... 115

- Abb. 27 Dendrogramm der DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Apa*I..... 116
- Abb. 28 Dendrogramm der DNA-Fragmentmuster der *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Serovar L-Kulturen nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I..... 117

## 9.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1	Einige phänotypische Eigenschaften von <i>Arcanobacterium phocae</i> nach RAMOS et al. (1997)... 17
Tab. 2	Funddaten zu den untersuchten Seehunden ( <i>Phoca vitulina</i> )..... 28
Tab. 3	Funddaten zu den untersuchten Kegelrobben ( <i>Halichoerus grypus</i> )..... 29
Tab. 4	Einige Angaben zu den seziierten Seehunden ( <i>Phoca vitulina</i> )..... 32
Tab. 5	Einige Angaben zu den seziierten Kegelrobben ( <i>Halichoerus grypus</i> )..... 33
Tab. 6	Pathologisch-anatomische sowie histologische Untersuchungsbefunde der seziierten Seehunde und Kegelrobben..... 35
Tab. 7	Buchstabenkodierung der Organe..... 39
Tab. 8	Herkunft der neben $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken isolierten Mikroorganismen..... 41
Tab. 9	Angaben zu den verwendeten Antibiotikatestblättchen. 64
Tab. 10	Serologische Gruppenbestimmung der 72 von Seehunden (n=61) und Kegelrobben (n=11) isolierten Kulturen..... 72



Tab. 11	Biochemische Eigenschaften der 72 Seehund- und Kegelrobbeisolate, ermittelt mit dem api 50 CH-System.....	74
Tab. 12	Biochemische Eigenschaften der 72 Seehund- (n=61) und Kegelrobbe-Isolate (n=11).....	77
Tab. 13	Agglutinationsreaktion der 72 untersuchten Kulturen mit den Lektinen von <i>Arachis hypogaea</i> und <i>Dolichos biflorus</i> .....	78
Tab. 14	Zugangsnummern der Gendatenbank und Referenzen..	89
Tab. 15	Beziehungen zwischen den Wachstumsformen der 69 <i>S. phocae</i> - und der drei <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> Serovar L-Isolate in Flüssigmedium und Soft-Agar.....	98
Tab. 16	Beziehungen zwischen den Wachstumsformen der Isolate in Flüssigmedium und den Ergebnissen des Salzaggregationstests.....	99
Tab. 17	Antibiotikaempfindlichkeiten der 69 untersuchten <i>S. phocae</i> - und drei untersuchten <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> Serovar L-Kulturen.....	101
Tab. 18	DNA-Restriktionsgruppenzugehörigkeit der 69 <i>S. phocae</i> -Kulturen, isoliert von Seehunden und Kegelrobbe, nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>ApaI</i> .....	102

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADO	Adonit
al.	andere
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure
AMD	Stärke
AMY	Amygdalin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARB	Arbutin
AVID	Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
B	Bacitracin / Beifang
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BHI	Brain-Heart-Infusion
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin / Dens caninus
ca.	circa
CAC	Cefacetril
CC	Clindamycin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cDNA	cyclische Desoxyribonucleinsäure
CDV	canine distemper virus
CEL	Zellobiose
cm	Zentimeter
CTX	Cefotaxim
d	Tag

DARA	D-Arabinose
DARL	D-Arabit
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DFUC	D-Fucose
DK	Dänemark
DLYX	D-Lyxose
DTAG	D-Tagatose
DTUR	D-Turanose
DUL	Dulcit
DXYL	D-Xylose
ECS	European Cetecean Society
ERY	Erythrit / Erythromycin
ESC	Äskulin
EZ	Ernährungszustand
Fa.	Firma
FRU	Fructose
FOX	Cefoxitin
g	Gramm
G	Guanosin / getötet
GAL	Galactose
GEN	Gentamicin / Gentibiose
GLG	Glycogen
GLU	Glucose
GLY	Glycerol
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GNT	Gluconat
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H.E.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
Hess.	Hessen

IE.	internationale Einheit
INO	Inosit
K	Guanosin oder Thymidin
KAN	Kanamycin
Kb	Kilobasen
Kg	Kilogramm
KG	Keto-Gluconat
KCL	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat
l	Liter
LAC	Lactose
LARA	L-Arabinose
LARL	L-Arabit
LFUC	L-Fucose
LXYL	L-Xylose
I	Dens incisivi
INU	Inulin
m	männlich
M	Adenosin oder Cytidin
mol/l	Molarität pro Liter
mmol/l	Millimolarität pro Liter
MAN	Mannit
MAL	Maltose
MDM	α-Methyl-D-Mannosid
MDG	α-Methyl-D-Glucosid
MDT	Magen-Darm-Trakt
MDX	β-Methyl-D-Xylosid
MEL	Melibiose
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

MIN	Minocyclin
min	Minute
ml	Milliliter
MLZ	Melezitose
mm	Millimeter
MNE	Mannose
n	Stichprobenumfang
N	eine beliebige Base / Stickstoff
Na	Natrium
NA	Nalidixinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAG	N-Acetyl-Glucosamin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat
NaOH	Natronlauge
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Di-Natrium-Phosphat
Nds	Niedersachsen
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NL	Niederlande
Nr.	Nummer
OFX	Ofloxacin
OXA	Oxacillin
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion
PBS	phosphate balanced salt solution
Pc	Dens praemolares
PCR	polymerase chain reaction=Polymerasekettenreaktion
PDV	Phocines Distemper Virus
PEN	Penicillin
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PIP	Piperacillin

pmol/l	Pikomolarität pro Liter
RAF	Raffinose
RHA	Rhamnose
RIB	Ribose
RPV	Rinderpestvirus
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
s	Sekunde
S	Cytidin oder Guanodin
SA	Seehundanlage
SAC	Saccharose
SAL	Salicin
SBE	Sorbose
SF	Seehundfangaktion
SH	Schleswig-Holstein
SOR	Sorbit
SPF	spezifisch pathogenfrei
St.	Sankt
STM	Streptomycin
SXT	Sulfamethoxazol-Trimethoprim
T	Thymidin / Totfund
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Puffer
TET	Tetracyclin
THB	Todd-Hewitt-Bouillon
TRE	Trehalose
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/μl	Einheiten pro Mikroliter
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt

w	weiblich
XLT	Xylit
Y	Cytidin oder Thymidin
ZNS	zentrales Nervensystem
° C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
-	keine Angaben
Ø	Durchmesser
®	eingetragene Marke
™	Marke
<	kleiner
>	größer
=	kleiner gleich
=	größer gleich

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christoph Lämmler danke ich herzlichst für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können, für die stets gewährte Unterstützung, die zahlreichen wertvollen Ideen und Anregungen sowie für die wiederholte rasche und sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. Ursula Siebert, Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Büsum, für die Überlassung des Themas, für die Entnahme der Proben, die Grundlage der vorliegenden Arbeit war, und die freundschaftliche Hilfe bei zahlreichen Fragen insbesondere bezüglich der Meeressäuger.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhard Weiß, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten, sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die vorläufige Identifizierung und Lagerung der Kulturen und allen weiteren Hilfestellungen zu dieser Arbeit.

Im Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Cosima Annemüller für die freundschaftliche Zusammenarbeit während der Fertigstellung dieser Arbeit, für die zahlreichen Stunden bei der Durchsicht der Manuskripte sowie Ihrer Familie, die es Ihr ermöglichte sich in freien Stunden mit dieser Arbeit zu beschäftigen.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Amir Abdulmawjood für die freundschaftliche Hilfe und zahlreichen Tips bei den molekularbiologischen Arbeiten bedanken.



Ebenfall bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, Frau Kristin Fink, Herrn Abdulwahed A. Hassan, Herrn Ömer Akineden, Herrn Ali Ö. Yildirim und Herrn Izhar U. Khan für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie allen weiteren Angehörigen des Instituts, die mit Ihrer Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein weiterer Dank gilt den Naturschutzorganisationen und zahlreichen Seehundjägern an den Küsten Schleswig-Holsteins, die durch das Sammeln der Seehunde und Kegelrobben eine Grundlage dieser Arbeit schufen.

Frau Ellen Briegel, Institut für Medizinische Virologie des Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen, danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Fotos.

Herrn Dr. Jörg Brückler möchte ich besonders für die konstruktive Kritik bei der nicht selbstverständlichen Durchsicht des Manuskripts danken.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotionszeit mit viel Verständnis, Geduld und Aufmunterung begleitet haben.