

Phäno- und Genotypisierung von Bakterien  
des Genus *Arcanobacterium* unter besonderer  
Berücksichtigung von *Arcanobacterium phocae*

**Hivda Ülbeği**

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

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

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Christoph Lämmler

**Phäno- und Genotypisierung von Bakterien des Genus *Arcanobacterium*  
unter besonderer Berücksichtigung von *Arcanobacterium phocae***

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Hivda Ülbeği**  
Tierärztin aus Ankara, Türkei

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

---

Gutachter:

Prof. Dr. C. Lämmler  
Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer

Tag der Disputation:  
08.12.2010

Erklärung nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Hivda Ülbeği

*gewidmet*

*Ferit und meiner Familie in  
aufrichtiger Liebe und Dankbarkeit*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>2</b>
2.1	Genera <i>Arcanobacterium</i> bzw. <i>Trueperella</i> .....	2
2.1.1	Taxonomie.....	2
2.1.2	Morphologie und Wachstumsverhalten .....	3
2.2	Spezies der Genera <i>Arcanobacterium</i> bzw. <i>Trueperella</i> .....	4
2.2.1	<i>A. haemolyticum</i> .....	4
2.2.2	<i>A. phocae</i> .....	6
2.2.3	<i>A. pluranimalium</i> .....	7
2.2.4	<i>A. hippocoleae</i> .....	8
2.2.5	<i>A. (T.) abortisuis</i> .....	8
2.2.6	<i>A. (T.) bernardiae</i> .....	9
2.2.7	<i>A. (T.) bialowiezense</i> und <i>A. (T.) bonasi</i> .....	10
2.2.8	<i>A. (T.) pyogenes</i> .....	11
2.2.8.1	Mutmaßliche Virulenzfaktoren von <i>A. (T.) pyogenes</i> .....	14
2.3	Molekulare Identifizierungen von Bakterien .....	17
2.3.1	Die ribosomale RNA .....	17
2.3.1.1	16S rRNA-Gen.....	19
2.3.1.2	16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR).....	19
2.3.1.3	23S rRNA-Gen.....	20
2.3.2	Superoxid-Dismutase A-kodierendes Gen <i>sodA</i> .....	21
2.3.3	RNA-Polymerase-kodierendes Gen <i>rpoB</i> .....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1	Bakterienkulturen, Probennahme und bakteriologische Untersuchung .....	24
3.2	Anzüchtungsmedien .....	33
3.3	Kultivierung der Kulturen .....	34
3.4	Konservierung der Kulturen.....	34
3.5	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller Verfahren.....	34
3.5.1	Nachweis der Hämolyse und von CAMP-ähnlichen Reaktionen .....	34
3.5.2	Biochemische Charakterisierung mit dem „API-Coryne-Testsystem“ .....	35

3.5.3	Nachweis des Enzyms Katalase .....	36
3.5.4	Nachweis des Enzyms DNase .....	36
3.5.5	Nachweis des Enzyms Hyaluronidase.....	37
3.5.6	Voges-Proskauer-Test .....	38
3.5.7	Nachweis der Enzyme $\beta$ -Galactosidase, $\beta$ -Glucuronidase- und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase durch Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate .....	38
3.5.8	Nachweis der Enzyme Alkalische Phosphatase, $\alpha$ -Mannosidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase.....	39
3.5.9	Wachstum auf Löffler-Medium .....	40
3.5.10	Nachweis des mit Streptokokken-Serogruppe-G kreuzreagierenden Antigens .....	40
3.6	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren.....	41
3.6.1	DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“ .....	41
3.6.2	Durchführung der PCR.....	42
3.6.3	Agarosegelelektrophorese .....	43
3.6.4	Ethidiumbromidfärbung .....	43
3.6.5	DNA-Präparation aus Agarosegelen und Sequenzierung .....	44
3.6.6	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	44
3.6.7	Amplifizierung und Sequenzierung der 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR) .....	45
3.6.8	Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens.....	46
3.6.9	Amplifizierung und Sequenzierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens <i>sodA</i> .....	46
3.6.10	Amplifizierung und Sequenzierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase-kodierenden Gens <i>rpoB</i> .....	48
3.6.11	PCR-vermittelter Nachweis speziesspezifischer Genabschnitte.....	49
3.6.11.1	Amplifizierung von <i>A. phocae</i> -ISR- bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten.....	49
3.6.11.2	Amplifizierung von <i>A. phocae sodA</i> -spezifischen Abschnitten .....	50
3.6.11.3	Amplifizierung von <i>A. haemolyticum</i> -ISR bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten.....	51
3.6.11.4	Nachweis des <i>A. haemolyticum</i> -Phospholipase D-kodierenden Gens <i>pld</i> .....	51

3.6.11.5	Amplifizierung von <i>A. hippocoleae</i> -16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten.....	52
3.6.11.6	Amplifizierung von <i>A. (T.) bernardiae</i> -16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten.....	52
3.6.11.7	Amplifizierung von <i>A. (T.) bialowiezense</i> -ISR-spezifischen Abschnitten	53
3.6.11.8	Amplifizierung von <i>A. (T.) bonasi</i> -ISR-spezifischen Abschnitten.....	53
3.6.11.9	Amplifizierung von <i>A. (T.) pyogenes</i> -ISR-spezifischen Abschnitten.....	54
3.6.11.10	Nachweis des <i>A. (T.) pyogenes</i> -Pyolysin-kodierenden Gens <i>plo</i> und des <i>A. phocae</i> -Phocaelysin-kodierenden Gens <i>ppl</i> .....	54
3.7	Statistische Auswertung .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
4.1	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller und molekularer Verfahren.....	58
4.1.1	Phänotypische Eigenschaften der <i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> -Referenzkulturen.....	58
4.1.1.1	Nachweis der Hämolyse und von CAMP-ähnlichen Reaktionen .....	58
4.1.1.2	Identifizierung mit dem „API-Coryne-Testsystem“ .....	61
4.1.1.3	Weitere phänotypische Eigenschaften .....	61
4.1.1.4	Wachstum auf Löffler-Medium .....	62
4.1.1.5	Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe-G-spezifischem Antiserum .....	63
4.1.2	Amplifizierung und Sequenzierung von unterschiedlichen Genomabschnitten der <i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> -Referenzkulturen.....	66
4.1.2.1	Amplifizierung und Sequenzierung der ISR.....	66
4.1.2.2	Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens .....	69
4.1.2.3	Amplifizierung und Sequenzierung des Gens <i>sodA</i> .....	71
4.1.2.4	Amplifizierung und Sequenzierung des Gens <i>rpoB</i> .....	73
4.1.3	Untersuchung von <i>A. phocae</i> .....	75
4.1.3.1	Phänotypische Eigenschaften.....	75
4.1.3.2	Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der <i>A. phocae</i> -Kulturen .....	79
4.1.3.2.1	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	79
4.1.3.2.2	Amplifizierung und Sequenzierung der ISR .....	80
4.1.3.2.3	Amplifizierung von <i>A. phocae-sodA</i> -Gen-spezifischen Abschnitten ...	83

4.1.3.2.4	Amplifizierung des <i>A. phocae</i> -Phocaelysin-kodierenden Gens <i>phl</i> .....	84
4.1.4	Untersuchung von <i>A. haemolyticum</i> .....	89
4.1.4.1	Phänotypische Eigenschaften.....	89
4.1.4.2	Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der <i>A. haemolyticum</i> -Kulturen .....	94
4.1.4.2.1	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	94
4.1.4.2.2	Amplifizierung und Sequenzierung der ISR .....	95
4.1.4.2.3	Amplifizierung von <i>A. haemolyticum</i> -ISR bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten.....	96
4.1.4.2.4	Nachweis des <i>A. haemolyticum</i> -Phospholipase D-kodierenden Gens <i>pld</i> .....	96
4.1.5	Untersuchung von <i>A. pluranimalium</i> .....	97
4.1.5.1	Phänotypische Eigenschaften.....	97
4.1.5.2	Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte von <i>A. pluranimalium</i> 1128.....	101
4.1.5.2.1	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	101
4.1.5.2.2	Amplifizierung und Sequenzierung der ISR .....	102
4.1.5.2.3	Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens.....	102
4.1.6	Untersuchung von <i>A. (T.) bialowiezense</i> und <i>A. (T.) bonasi</i> .....	104
4.1.6.1	Phänotypische Eigenschaften.....	104
4.1.6.2	Amplifizierung von <i>A. (T.) bialowiezense</i> - und <i>A. (T.) bonasi</i> -ISR-spezifischen Abschnitten.....	106
4.1.7	Untersuchung von <i>A. (T.) pyogenes</i> .....	107
4.1.7.1	Phänotypische Eigenschaften.....	107
4.1.7.2	Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der <i>A. (T.) pyogenes</i> -Kulturen .....	111
4.1.7.2.1	Amplifizierung und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.....	111
4.1.7.2.2	Amplifizierung und Sequenzierung des Gens <i>rpoB</i> .....	112
4.1.7.2.3	Amplifizierung von <i>A. (T.) pyogenes</i> -ISR-spezifischen Abschnitten .	113
4.1.7.2.4	Nachweis des <i>A. (T.) pyogenes</i> -Pyolysin-kodierenden Gens <i>plo</i> .....	114
4.1.8	Amplifizierung von <i>A. hippocoleae</i> - und <i>A. (T.) bernardiae</i> -16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten.....	116

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>118</b>
5.1	Phänotypische und genotypische Eigenschaften der Referenzkulturen der Genera <i>Arcanobacterium</i> bzw. <i>Trueperella</i> .....	118
5.2	Phänotypische und genotypische Eigenschaften von <i>A. phocae</i> .....	125
5.3	Phänotypische und genotypische Eigenschaften von <i>A. haemolyticum</i> .....	131
5.4	Phänotypische und genotypische Eigenschaften von <i>A. pluranimalium</i> .....	136
5.5	Phänotypische und genotypische Eigenschaften von <i>A. (T.) bialowiezense</i> und <i>A. (T.) bonasi</i> .....	139
5.6	Phänotypische und genotypische Eigenschaften von <i>A. (T.) pyogenes</i> .....	140
5.7	Genotypische Eigenschaften von <i>A. (T.) bernardiae</i> und <i>A. hippocoleae</i> .....	145
5.8	Schlussfolgerung .....	145
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>151</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Übersicht der häufig verwendeten Abkürzungen oder Einheiten

A	Adenin
A.	<i>Arcanobacterium</i>
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
g	Gramm
G	Guanin
h	hora (Stunde)
ILY	Intermedilysin von <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>ily</i>	<i>S. intermedius</i> -Intermedilysin-kodierendes Gen
ISR	16S-23S rDNA intergenic spacer Region
kb	1000 Basen
kDa	1000 Da
kg	Kilogramm
l	Liter
LLO	Listeriolysin O von <i>L. monocytogenes</i>
<i>llo</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> -Listeriolysin-kodierendes Gen
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mol	absolute Menge einer Substanz
N	Normalität
n	nano ( $10^{-9}$ )
nm	Nanometer
p	pico ( $10^{-12}$ )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)

PFO	Perfringolysin O von <i>Clostridium perfringens</i>
<i>pfo</i>	<i>C. perfringens</i> -Perfringolysin-kodierendes Gen
<i>phl</i>	<i>Arcanobacterium phocae</i> -Phocaelysin-kodierendes Gen
<i>pld</i>	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> -Phospholipase D-kodierendes Gen
PLO	Pyolysin von <i>A. pyogenes</i>
<i>plo</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> -Pyolysin-kodierendes Gen
PLY	Pneumolysin von <i>S. pneumoniae</i>
<i>ply</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> -Pneumolysin-kodierendes Gen
pmol	Picomol
RNA	Ribonucleinsäure
<i>rpoB</i>	das die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase-kodierende Gen
s	Sekunde (n)
SLO	Streptolysin O von <i>S. pyogenes</i>
<i>slo</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> -Streptolysin-kodierendes Gen
<i>sly</i>	<i>Streptococcus suis</i> -Suilysin-kodierendes Gen
<i>sodA</i>	Superoxid-Dismutase A-kodierendes Gen
T	Thymin
<i>T.</i>	<i>Trueperella</i>
U	Unit (Internationale Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
<	kleiner als
≤	kleiner als oder gleich
>	größer als
≥	größer als oder gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer



# 1 Einleitung

Bakterien des Genus *Arcanobacterium* (A.) aus der Familie der *Actinomycetaceae*, sind bedeutende Krankheitserreger für Tier und Mensch. Eine Erstbeschreibung des Genus *Arcanobacterium* erfolgte von Collins et al. (1982b), wobei die bisher als *Corynebacterium haemolyticum* geführte Spezies nunmehr als *Arcanobacterium haemolyticum* klassifiziert wurde. In den folgenden Jahren konnten einige weitere Spezies dieser Gattung zugeordnet bzw. neu beschrieben werden. Nach aktuellen chemotaxonomischen und phylogenetischen Studien von Yassin et al. (2010) sollten *A. haemolyticum*, *A. phocae* und *A. pluranimalium* unter dem Genus *Arcanobacterium* und *A. abortisuis*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi* und *A. pyogenes* unter dem neu beschriebenen Genus *Trueperella* geführt werden. *A. hippocoleae* wäre nach diesen Untersuchungen keinem der beiden Genera eindeutig zuzuordnen, zeigte aber eine größere verwandtschaftliche Beziehung zu dem Genus *Arcanobacterium*. Unter Berücksichtigung dieser Untersuchungen und bis zur endgültigen Etablierung des neuen Genus *Trueperella* werden im folgenden die dem Genus *Trueperella* zugeordneten Spezies als *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense*, *A. (T.) bonasi* und *A. (T.) pyogenes* bezeichnet. Die Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* beinhalten mittlerweile neun Spezies, wobei bislang die eher in der Veterinärmedizin bedeutsamen Spezies *A. phocae*, *A. pluranimalium*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bialowiezense*, *A. (T.) bonasi* und *A. (T.) pyogenes* sowie die bisher eher für die Humanmedizin wichtigen Spezies *A. (T.) bernardiae* und *A. haemolyticum* unterschieden werden. Während für *A. (T.) pyogenes* und *A. haemolyticum* bereits zahlreiche Beschreibungen zu Krankheitsfällen und mutmaßlichen Eigenschaften vorliegen (Lämmler und Hartwig, 1995; Hirsh und Biberstein, 2004; Moore et al., 2010), sind die Informationen zu den weiteren sieben Spezies dieser Gattungen sehr begrenzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Referenzkulturen von den neun bisher beschriebenen Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, *A. phocae*-Kulturen, isoliert von Seehunden und einer Kegelrobbe, *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, eine *A. pluranimalium*-Kultur, isoliert von einem Hund, *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen, isoliert vom Europäischen Bison und *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Reptilien und von Rindermastitiden, phänotypisch und genotypisch zu identifizieren und weitergehend zu charakterisieren. Letzteres erfolgte unter anderem durch Analyse bislang noch nicht beschriebener speziesspezifischer Gen- bzw. Genomabschnitte.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 2.1.1 Taxonomie

*Arcanobacterium*, der Name leitet sich ab von dem Adjektiv „*arcanus*“ = geheimnisvoll und dem Wort „*bakterion*“ = Stäbchen. Bakterien des Genus *Arcanobacterium* gehören nunmehr zur Familie *Actinomycetaceae*, bzw. zur Ordnung *Actinomycetales*. Die genaue Klassifizierung des Genus *Arcanobacterium* ist in **Tab. 1** dargestellt. Lucet (1893) beschrieb *A. (T.) pyogenes* erstmals als *Bacillus pyogenes liquefaciens bovis*. In den folgenden Jahren wurde dieses Bakterium von Glage (1903) als *Bacillus pyogenes* benannt und in der achten Ausgabe des Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology, ebenso wie die als nahe verwandt beschriebene Spezies *Corynebacterium haemolyticum*, vorläufig in dem Genus *Corynebacterium* geführt (Rogosa et al., 1974). Die Zuordnung von *Corynebacterium pyogenes* zu dem Genus *Actinomyces* erfolgte auf Vorschlag von Collins und Jones (1982) und Reddy et al. (1982). Das Genus *Arcanobacterium* wurde von Collins et al. (1982b) neu eingeführt, da sich die ehemals als *Corynebacterium haemolyticum* bezeichnete Spezies *A. haemolyticum* von der Typspezies des Genus *Corynebacterium* unterschied. Im Jahre 1995 wurde von Funke et al. die neue Spezies *Actinomyces bernardiae* beschrieben. Nach 16S rDNA-Analysen erfolgte von Ramos et al. (1997) die endgültige Zuordnung von *Arcanobacterium bernardiae* und *Arcanobacterium pyogenes* zu dem Genus *Arcanobacterium*.

In den folgenden Jahren konnten sechs neue Spezies, nämlich *A. hippocoleae*, *A. phocae*, *A. pluranimalium*, *A. abortisuis*, *A. bialowiezense* und *A. bonasi*, diesem Genus zugeordnet werden. Wie bereits in der Einleitung aufgezeigt, sollten nach einem Vorschlag von Yassin et al. (2010) *A. haemolyticum*, *A. phocae* und *A. pluranimalium* innerhalb des Genus *Arcanobacterium* und *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense*, *A. (T.) bonasi* und *A. (T.) pyogenes* innerhalb des Genus *Trueperella* geführt werden. *A. hippocoleae* würde, unter Beibehaltung des Gattungsnamens, eine verwandte Spezies darstellen.

*A. phocae* wurde erstmals von Meeressäugtieren isoliert (Ramos et al., 1997), *A. pluranimalium* aus Proben von einem Hirsch und einem Schweinswal (Lawson et al., 2001) und *A. hippocoleae* von einer Vaginitis eines Pferds (Hoyles et al., 2002).

Die Isolierung der zwei Spezies *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* erfolgte von Balanoposthitiden europäischer Bisonbullen (Lehnen et al., 2006). Azuma et al. beschrieben erstmals 2009 die neue Spezies *A. (T.) abortisuis*, wobei die Referenzkultur von einem Schweineabort isoliert wurde.

**Tab. 1:** Klassifizierung von neun Spezies der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

Abteilung	<i>Actinobacteria</i>
Klasse	<i>Actinobacteria</i>
Ordnung	<i>Actinomycetales</i>
Familie	<i>Actinomycetaceae</i>
Gattung	<i>Arcanobacterium</i> bzw. <i>Trueperella</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium phocae</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium</i> (bzw. <i>Trueperella</i> ) <i>abortisuis</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium</i> (bzw. <i>Trueperella</i> ) <i>bernardiae</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium</i> (bzw. <i>Trueperella</i> ) <i>bialowiezense</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium</i> (bzw. <i>Trueperella</i> ) <i>bonasi</i>
Art (Spezies)	<i>Arcanobacterium</i> (bzw. <i>Trueperella</i> ) <i>pyogenes</i>

### 2.1.2 Morphologie und Wachstumsverhalten

Bakterien des Genus *Arcanobacterium* sind grampositive, unregelmäßig geformte Stäbchenbakterien. Sie sind 0,3-0,8 x 1-5 µm im Durchmesser, unbeweglich, nicht säurefest und bilden keine Endosporen. Die Zellform ist nicht einheitlich. Sie sind pleomorph, d. h. sie können von stäbchenartiger oder kokkoider Gestalt sein, oft sind sie in V- oder T-Form angeordnet (Holt et al., 1994; Hirsh und Biberstein, 2004; Moore et al., 2010).

Bakterien des Genus *Arcanobacterium* wachsen fakultativ-anaerob und eine Inkubation zwischen 24-48 h bei einer Temperatur von 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen im

Kerzentopf wird empfohlen (Holt et al., 1994). Bakterien des Genus *Arcanobacterium* werden bei einer Temperatur von 60 °C in 15 min inaktiviert (Collins et al., 1982b).

Das Peptidoglycan der *Arcanobacterium*-Spezies basiert auf Lysin; Mycolsäuren sind nicht vorhanden (Collins et al., 1982b). Nach Collins et al. (1982b) enthält das Genom des Genus *Arcanobacterium* Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 50-52 %.

## **2.2 Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella***

### **2.2.1 *A. haemolyticum***

*A. haemolyticum*, ursprünglich bekannt als *Corynebacterium haemolyticum*, wurde im Jahr 1946 von MacLean et al. erstmals bei überwiegend nasopharyngealen Infektionen amerikanischer Soldaten beschrieben. Der Name *A. haemolyticum* leitet sich ab von dem Wort „*haema*“ = Blut und dem Wort „*lyticus*“ = Auflösung; *haemolyticum* = von der Auflösung des Bluts. *A. haemolyticum* wurde erstmals der Gattung *Corynebacterium* zugeordnet (MacLean et al., 1946). Die Zuordnung zur Gattung *Corynebacterium* erwies sich, ebenso wie diejenige von *Corynebacterium pyogenes*, als umstritten (Cummins und Harris, 1956; Barksdale et al., 1957; Rogosa et al., 1974; Jones, 1975; Schofield und Schaal, 1981; Collins et al., 1982a). Zellwandanalysen beider Spezies ergaben Ähnlichkeiten mit Zellwandstrukturen von Streptokokken (Cummins und Harris, 1956). Barksdale et al. (1957) hielten *Corynebacterium haemolyticum* für eine “mutant form” von *Corynebacterium pyogenes* und schlugen eine Zuordnung beider Spezies zur Gattung *Streptococcus* vor. Erst von Schofield und Schaal (1981) und Collins et al. (1982a) wurden *Corynebacterium haemolyticum* und *Corynebacterium pyogenes* als eindeutig voneinander unterscheidbare Spezies beschrieben. Aufgrund von phäno- und genotypischen Eigenschaften erwies sich *Corynebacterium haemolyticum* allerdings als unterschiedlich im Vergleich zu coryneformen Bakterien und auch zu Actinomyceten (Schofield und Schaal, 1981; Collins et al., 1982a). *Corynebacterium haemolyticum* wurde von Collins et al. (1982b) dem Genus *Arcanobacterium* zugeordnet. *A. haemolyticum* war dabei die erste Spezies des Genus *Arcanobacterium*.

*A. haemolyticum* hat eine besondere Bedeutung als Infektionserreger des Menschen, besonders bei Pharyngitiden, Tonsillitiden, septikämischen Krankheitsverläufen und auch als Erreger von Wundinfektionen (Jobanputra und Swain, 1975; Miller und Brancato, 1984;

Barnham und Bradwell, 1992; Cummings et al., 1993; Carlson und Kontiainen, 1994). Als weitere Krankheitsgeschehen mit Beteiligung von *A. haemolyticum* wurden ein Pyothorax (Parija et al., 2005), Arthritiden und Osteomyelitiden (Goyal et al., 2005; Tan et al., 2006), Endokarditiden (Worthington et al., 1985), Gehirnabszesse und Meningitiden (Altmann und Bogokovsky, 1973; Minárik et al., 1997; Vargas et al., 2006), Pneumonien (Waller et al., 1991) sowie Gelenkentzündungen (Cheilley, 1977; Hoosen et al., 1990) beschrieben. Younus et al. (2002) berichteten erstmals über eine Co-Infektion von *A. haemolyticum* mit *Fusobacterium necrophorum* bei der Sepsis eines Menschen.

Ein Vorkommen von *A. haemolyticum* bei Tieren wurde erstmals aus Rindersperma und von einer Pneumonie eines Schafs beschrieben (Richardson und Smith, 1968; Roberts, 1969). Tyrrell et al. (2002) berichteten über die ätiologische Rolle eines einzigen *A. haemolyticum*-Stammes bei einer parodontalen Infektion eines Kaninchens, wobei über die eigentliche Bedeutung dieses Isolates keine Auskunft gegeben wurde.

Eine 16S rDNA-Analyse von *A. haemolyticum* wurde von Stubbs und Collins (1993) durchgeführt. Die 16S rDNA-Analyse ergab, nach Ramos et al. (1997), eine phylogenetische Nähe von *A. haemolyticum* zu der Spezies *A. phocae*.

*A. haemolyticum* wurde als grampositives, unregelmäßig geformtes, unbewegliches und nicht säurefestes Stäbchenbakterium beschrieben. Das Bakterium wuchs fakultativ-anaerob und bildete keine Endosporen (Jobanputra und Swain, 1975; Collins et al., 1982b; Lämmler und Hartwig, 1995; Almuzara et al., 2002). *A. haemolyticum* war V-förmig angeordnet (Collins et al., 1982b; Lämmler und Hartwig, 1995).

*A. haemolyticum* bildete kleine ca. 0,75 mm große Kolonien, nach längerer Inkubation 1,5-2,5 mm große Kolonien, die auf einer Schafblutagarplatte von einer Hämolysezone umgeben waren. (Collins et al., 1982b; Lämmler und Hartwig, 1995; Goyal et al., 2005; Tan et al., 2006). Die Hämolyse von *A. haemolyticum* war auf Kaninchen- und Humanblutagarplatten deutlich verstärkt (Potel, 1982; Lämmler und Blobel, 1988; Cummings et al., 1993; Lämmler, 1994). Das Bakterium wurde bei einer Temperatur von 60 °C in 15 min inaktiviert (Collins et al., 1982b). *A. haemolyticum* zeigte ferner eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins (Fraser, 1964; Lämmler und Blobel, 1988; Lämmler, 1994; Linder, 1997; Lämmler und Hartwig, 1995; Almuzara et al., 2002; Goyal et al., 2005; Parija et al., 2005; Tan et al., 2006). Eine vergleichbare Hämolysereaktion mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin wies *Corynebacterium pseudotuberculosis* auf (Lämmler und Blobel, 1987). Die für die Hämolysereaktionen verantwortliche Substanz konnte als Phospholipase D erkannt

werden. Nach Untersuchungen von Souckova und Soucek (1972) hatte die Phospholipase D auch dermonekrotische Eigenschaften. Die Phospholipase D reagierte nach Linder (1997) mit dem Sphingomyelin der Zielzelle und bildete Ceramid-Phosphat. Das Phospholipase D-kodierende Gen *pld* von *A. haemolyticum* wurde kloniert und sequenziert und zeigte einige Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Genen von *C. pseudotuberculosis* und *Corynebacterium ulcerans* (Cuevas und Songer, 1993; McNamara et al., 1995).

Das Peptidoglycan der Zellwand von *A. haemolyticum* basiert auf Lysin. Das Genom von *A. haemolyticum* enthält Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 50-52 % (Collins et al., 1982b). Seit 2010 liegt eine vollständige Genomsequenz der *A. haemolyticum*-Referenzkultur DSM 20595 (ATCC 9345) vor (Lucas et al., 2010).

### **2.2.2        *A. phocae***

Die Erstbeschreibung von *A. phocae* erfolgte im Jahr 1997 von Ramos und Mitarbeiter. Der Name *A. phocae* leitet sich ab von dem lateinischen Namen für den Seehund *Phoca vitulina*. Die Erstisolierung von *A. phocae* erfolgte aus Gewebeproben von Darm, Lunge, Milz, Lymphknoten, Mundläsionen und von Nasentupferproben und Bauchfellproben von Seehunden und Kegelrobben (Ramos et al., 1997). Die Bedeutung der isolierten *A. phocae*, die von Ramos et al. (1997) ursprünglich mit mehreren anderen Bakterienarten von Pneumonien und Septikämien der Seehunde und Kegelrobben isoliert worden waren, für das Krankheitsgeschehen der Tiere war allerdings unklar. Johnson et al. (2003) beschrieben die Isolierung von *A. phocae* von toten und lebenden Meeressäugern an der kalifornischen Küste. Dies beinhaltete Isolate vom Nördlichen See-Elefanten (*Mirounga angustirostris*), dem Kalifornischen Seeotter (*Enhydra lutris nereis*), von Pazifischen Seehunden (*Phoca vitulina richardii*), von Kalifornischen Seelöwen (*Zalophus californianus*) und von Delfinen (*Delphinus delphis*). Von den lebenden Tieren wurden 77 *A. phocae*-Kulturen isoliert, am häufigsten von Abszessen, von Wundinfektionen und von Nasal-, Tracheal- und Augenflüssigkeiten. Bei der Obduktion der bereits verendeten Tiere konnten 84 *A. phocae*-Kulturen aus Abszessen, Wundinfektionen, Osteomyelitiden und aus Gewebeproben von Gehirn, Lunge, Leber, Milz, Niere und von Tupferproben aus Nasal-, Tracheal- und Augenflüssigkeiten sowie aus Bauchfellflüssigkeit isoliert werden. Von Johnson et al. (2003) wurden allerdings neben *A. phocae* weitere Mikroorganismen, wie  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken, *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.,

*Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus viridans* isoliert, sodass die Bedeutung von *A. phocae* für das Krankheitsgeschehen, ähnlich wie bereits von Ramos et al. (1997) beschrieben, unklar ist. Die von Thornton et al. (1998) ursprünglich als *Listeria ivanovii* beschriebenen Mikroorganismen, isoliert von gestrandeten Meeressäugern, sind nach Johnson et al. (2003) wahrscheinlich falsch zugeordnet und möglicherweise auch *A. phocae*.

Eine Zuordnung der Bakterien zum Genus *Arcanobacterium* war nach 16S rDNA-Analysen möglich. Die von Ramos et al. (1997) durchgeführte 16S rDNA-Analyse von *A. phocae* ergab eine phylogenetische Nähe zu der Spezies *A. haemolyticum*.

*A. phocae*-Kulturen erwiesen sich als grampositive, kurze, unbewegliche, nicht säurefeste und unregelmäßig geformte Stäbchenbakterien. Das Bakterium wuchs fakultativ-anaerob und bildete keine Endosporen und zeigte nach 48 h Wachstum auf einer Schafblutagarplatte weiße, kleine, konvexe Kolonien mit  $\beta$ -Hämolyse (Ramos et al., 1997; Johnson et al., 2003). Nach Johnson et al. (2003) war bei *A. phocae* eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins feststellbar.

### 2.2.3 *A. pluranimalium*

Die Erstbeschreibung von *A. pluranimalium* erfolgte im Jahr 2001 von Lawson und Mitarbeiter. Der Name *A. pluranimalium* leitet sich ab von dem Adjektiv „*pluris*“ = viel und dem Wort „*animalium*“ = vom Tier; *pluranimalium* = von vielen Tieren. *A. pluranimalium* wurde ursprünglich von einem toten Schweinswal und einem toten Hirsch isoliert. Die Bedeutung von *A. pluranimalium* für das Krankheitsgeschehen des Schweinswals und des Hirschs war allerdings unklar. Eine Zuordnung zum Genus *Arcanobacterium* erfolgte nach 16S rDNA-Analysen. Die von Lawson et al. (2001) durchgeführte 16S rDNA-Analyse von *A. pluranimalium* zeigte eine phylogenetische Nähe zu der Spezies *A. phocae*.

*A. pluranimalium* wurde als grampositives, schmales, unbewegliches, nicht säurefestes und nicht Endosporen-bildendes Stäbchenbakterium beschrieben. Nach Lawson et al. (2001) wuchs *A. pluranimalium* fakultativ-anaerob und zeigte auf Schafblutagarplatten eine  $\alpha$ -Hämolyse.

Das Genom der Spezies *A. pluranimalium* enthält Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 57 % (Lawson et al., 2001). Bislang existieren keine weiteren Untersuchungen zu dieser Spezies.

#### 2.2.4 *A. hippocoleae*

Die Erstbeschreibung von *A. hippocoleae* erfolgte im Jahr 2002 von Hoyles und Mitarbeiter. *A. hippocoleae* leitet sich ab von dem Wort „*hippos*“ = Pferd und dem Wort „*colea*“ = Vagina; *hippocoleae* = von der Vagina eines Pferds. Eine Erstisolierung von *A. hippocoleae* erfolgte aus dem Vaginalausfluss eines Pferds mit einer Vaginitis (Hoyles et al., 2002). Über das weitere Vorkommen von *A. hippocoleae* bei Infektionen von Tieren liegen bislang nur wenige Mitteilungen vor. Eine Isolierung von *A. hippocoleae* aus dem Urin eines Pferds, allerdings ohne klinische Bedeutung, beschrieben Cai et al. (2003). Eine weitere Isolierung von *A. hippocoleae* erfolgte aus dem Mageninhalt eines Fohlens (Bemis et al., 2008). In diesen Untersuchungen wurden weitere Isolate aus der Plazenta des Pferds und von der Lunge des Fohlens nachgewiesen. Diese Isolate wurden jedoch nicht weiter untersucht. Das Isolat aus der Plazenta wurde mit weiteren Mikroorganismen nachgewiesen, weswegen über die Bedeutung von *A. hippocoleae* für das Krankheitsgeschehen keine Aussage getroffen werden kann.

Nach Hoyles et al. (2002) war nach 16S rDNA-Analysen eine Zuordnung der Bakterien zum Genus *Arcanobacterium* möglich. Die durchgeführten 16S rDNA-Analysen von *A. hippocoleae* ergaben eine phylogenetische Nähe zu der Spezies *A. phocae*.

*A. hippocoleae* erwies sich als grampositives, unbewegliches, unregelmäßig geformtes Stäbchenbakterium, das auf einer Blutagarplatte einen Koloniedurchmesser von ca.  $\leq 0,5 \mu\text{m}$  zeigte (Hoyles et al., 2002; Bemis et al., 2008). Das Bakterium war nicht säurefest und wuchs fakultativ-anaerob. Nach Hoyles et al. (2002) zeigte *A. hippocoleae* auf Columbiaagar mit 5 % Pferdeblut eine schwache Hämolyse.

#### 2.2.5 *A. (T.) abortisuis*

Die Erstbeschreibung von *A. abortisuis* erfolgte im Jahr 2009 durch Azuma und Mitarbeiter. Der Name *A. abortisuis* leitet sich ab von dem Wort „*abortus*“ = Abort und dem Wort „*suis*“ = Schwein; *abortisuis* = vom Abort eines Schweins.

Die Erstisolierung von *A. abortisuis* erfolgte von einer Plazentitis eines Schweins nach Abort. Die pathologisch-anatomische Untersuchung des Schweins ergab eine eitrig Bronchopneumonie und eine eitrig Plazentitis. Vergleichbare Mikroorganismen konnten

auch von drei abortierten Feten isoliert werden. Das Schwein stammte ursprünglich aus einem Betrieb mit 600 Tieren bei dem intermittierend Aborte auftraten. Die *A. abortisuis* Referenzkultur DSM 19515 wurde nach einem der Erstbeschreiber als *A. abortisuis*-Stamm Murakami benannt. Nach einem Vorschlag von Yassin et al. (2010) soll diese Spezies innerhalb der neu beschriebenen Gattung *Trueperella* geführt werden.

Eine Zuordnung zum Genus *Arcanobacterium* erfolgte nach 16S rDNA-Analysen (Azuma et al., 2009).

*A. (T.) abortisuis* wurde als grampositives, kurzes, unbewegliches, nicht säurefestes und nicht Endosporen-bildendes Stäbchenbakterium beschrieben. Das Bakterium zeigte diphtheroide Formen und war V-förmig angeordnet (Azuma et al., 2009). Nach Azuma et al. (2009) wuchs *A. (T.) abortisuis* ausschließlich anaerob.

Das Genom der Spezies *A. (T.) abortisuis* enthält Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 63,8 % (Azuma et al., 2009). Bislang existieren keine weiteren Untersuchungen zu dieser Spezies.

#### **2.2.6            *A. (T.) bernardiae***

Die Erstbeschreibung von *A. bernardiae*, ursprünglich innerhalb des Genus *Actinomyces* eingeordnet, erfolgte im Jahr 1995 durch Funke und Mitarbeiter. Der Name wurde zu Ehren der kanadischen Mikrobiologin Kathryn A. Bernard gegeben, die sich in ihrer wissenschaftlichen Arbeit insbesondere mit grampositiven, nicht Endosporen-bildenden Stäbchenbakterien beschäftigt hat.

Die eigentliche Erstisolierung von *A. bernardiae*, damals noch unter der Bezeichnung Coryneforme Gruppe 2 geführt, erfolgte 1987 im Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, aus Blut, von Wunden und aus dem Harntrakt von Untersuchungsproben von Menschen (Na'was et al., 1987). Im Jahr 1997 wurde *Actinomyces bernardiae* durch Ramos et al. dem Genus *Arcanobacterium* zugeordnet. Nach einem Vorschlag von Yassin et al. (2010) soll diese Spezies innerhalb der neu beschriebenen Gattung *Trueperella* geführt werden.

Über das Vorkommen von *A. (T.) bernardiae* bei Infektionen des Menschen liegen bislang nur wenige Mitteilungen vor. Isolate aus Blut und Abszessen beschrieben Funke et al. (1995), aus einer Harnwegs-Infektion mit septischem Verlauf Ieven et al. (1996). Ebenso von einer Harnwegs-Infektion berichteten Lepargneur et al. (1998), von einer septischen Arthritis

Adderson et al. (1998), von einer Infektion einer Prothese Loiez et al. (2009) und von einer Osteomyelitis Bemer et al. (2009).

Die von Funke et al. (1995) durchgeführte 16S rDNA-Analyse von *A. (T.) bernardiae* zeigte eine phylogenetische Nähe zu der damals ebenso unter dem Genus *Actinomyces* geführten Spezies *A. (T.) pyogenes*.

*A. (T.) bernardiae* wurde als grampositives, kurzes, unbewegliches Stäbchenbakterium beschrieben. Das Bakterium wuchs fakultativ-anaerob und bildete keine Endosporen (Funke et al., 1995; Bemer et al., 2009; Loiez et al., 2009). Nach 48 h Wachstum auf einer Schafblutagarplatte zeigte *A. (T.) bernardiae* Kolonien mit 0,2-0,5 mm im Durchmesser, die grau bis farblos und konvex waren (Funke et al., 1995; Bemer et al., 2009).

Nach Funke et al. (1995) enthält das Genom der Spezies *A. (T.) bernardiae* Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 63-66 %. Über das Vorkommen von *A. (T.) bernardiae* bei Infektionen von Tieren liegen bislang noch keine Informationen vor.

#### **2.2.7 *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi***

Die Erstbeschreibung von *A. bialowiezense* und *A. bonasi* erfolgte im Jahr 2006 von Lehnen und Mitarbeiter. Der Name *A. bialowiezense* leitet sich von dem Name Bialowieza ab, dies ist ein Naturschutzgebiet an der Grenze zwischen Polen und Weißrussland. *A. bonasi* leitet sich ab von dem Name des Europäischen Bison (*Bison bonasus*). Beide Spezies wurden vom Europäischen Bison isoliert.

Seit 1980 beobachtete man im polnischen Naturschutzgebiet Bialowieza eine chronische Erkrankung der äußeren Geschlechtsorgane des männlichen Europäischen Bison (Kita et al., 1994). Eine Charakterisierung der von diesen Balanoposthithiden des Europäischen Bison isolierten Bakterien erfolgte von Lehnen et al. (2006). Nach einem Vorschlag von Yassin et al. (2010) sollen diese Spezies innerhalb der neu beschriebenen Gattung *Trueperella* geführt werden.

Eine Zuordnung der Bakterien zum Genus *Arcanobacterium* war nach 16S rDNA-Analysen möglich. Die von Lehnen et al. (2006) durchgeführten 16S rDNA-Analysen von *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* zeigten eine phylogenetische Nähe zu den Spezies *A. pyogenes* und *A. (T.) bernardiae*.

*A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* wurden als grampositive, kurze und unbewegliche Stäbchenbakterien beschrieben. Nach 48 h Wachstum auf einer Schafblutagarplatte zeigten *A.*

(*T.*) *bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* 0,5 mm große, transparente, konvexe Kolonien mit schwacher  $\beta$ -Hämolyse. Nach Lehnen et al. (2006) wuchsen *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* besser unter aeroben Bedingungen als unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen. Bislang existieren keine weiteren Untersuchungen zu dieser Spezies.

### 2.2.8 *A. (T.) pyogenes*

Der Name *A. pyogenes* leitet sich ab von dem Wort „*pyum*“ = Eiter und dem Wort „*gennaio*“ = produzieren; *pyogenes* d.h Bildung von Eiter. Die genaue taxonomische Zuordnung von *A. pyogenes* war über viele Jahre nicht eindeutig festgelegt. Bereits im Jahre 1893 berichtete Lucet über Bakterien, die er als *Bacillus pyogenes liquefaciens bovis* bezeichnete. In den folgenden Jahren wurde dieses Bakterium von Glage (1903) als *Bacillus pyogenes* umbenannt. Ebersson (1918) ordnete *Bacillus pyogenes* schließlich der Gattung *Corynebacterium* zu. In der achten Ausgabe von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology wurde die Spezies, ebenso wie die als nah verwandt beschriebene Spezies *Arcanobacterium (Corynebacterium) haemolyticum*, vorläufig in der Gattung *Corynebacterium* geführt (Rogosa et al., 1974). Nachfolgende Untersuchungen der phänotypischen Eigenschaften und der Zellwandstrukturen von *Corynebacterium pyogenes* zeigten Ähnlichkeiten dieses Erregers zu *Actinomyces bovis*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Erysipelothrix* spp., Listerien, *Propionibacterium* spp. und Streptokokken (Cummins und Harris, 1956; Barksdale et al., 1957; Sneath und Cowan, 1958; Barksdale, 1970; Bousfield, 1972; Stuart und Pease, 1972; Jones, 1975; Slack und Gerencser, 1975; Goodfellow et al., 1976; Minniken et al., 1978; Schaal und Schofield, 1981; Mitscherlich und Marth, 1984). Nach Schofield und Schaal (1981) und Collins et al. (1982a) wurden *Corynebacterium haemolyticum* und *Corynebacterium pyogenes* als eindeutig voneinander unterscheidbare Spezies beschrieben. *Corynebacterium pyogenes* wurde von Collins und Jones (1982) und Reddy et al. (1982) dem Genus *Actinomyces* zugeordnet. Die endgültige Zuordnung zum Genus *Arcanobacterium* erfolgte von Ramos et al. (1997) nach 16S rDNA-Analysen. Nach einem Vorschlag von Yassin et al. (2010) soll diese Spezies innerhalb der neu beschriebenen Gattung *Trueperella* geführt werden.

Die durchgeführten 16S rDNA-Analysen von *A. (T.) pyogenes* ergaben eine phylogenetische Nähe zu der Spezies *A. (T.) bernardiae*.

*A. (T.) pyogenes* hat weltweit große Bedeutung bei purulenten Infektionen landwirtschaftlicher Nutztiere (Schaal, 1986; Lämmler, 1990; Lämmler und Hartwig, 1995; Yoshimura et al., 2000; Trinh et al., 2002), bei denen es als einer der häufigsten opportunistischen Infektionserreger gilt (Jost und Billington, 2005). *A. (T.) pyogenes* ist ein obligater Schleimhautbewohner des Respirations- und Urogenitaltrakts der Haustiere (Nattermann und Horsch, 1977; Jost und Billington, 2005). Bei Rind und Schwein besiedelt er zudem die Pansen- bzw. die Magenschleimhäute (Narayanan et al., 1998; Jost et al., 2002a).

Nach Jost und Billington (2005) konnte *A. (T.) pyogenes* bei einer großen Zahl verschiedener Tierarten nachgewiesen werden, darunter auch bei Antilopen, Büffeln, Kamelen, Hühnern, Hirschen, Elefanten, Gazellen, Pferden, Papageien, Rentieren, Puten und Gnus und auch bei Haustieren wie Hunden und Katzen. Bei Hunden und Katzen konnte *A. (T.) pyogenes* bei Otitis externa und Zystitis isoliert werden (Billington et al., 2002a). *A. (T.) pyogenes* war desweiteren auch bei einem chronischen Leberabszess eines Hundes nachweisbar (Hesselink und van den Tweel, 1990). Nach Hattel et al. (2007) scheint *A. (T.) pyogenes* auch bei einer Lungenentzündung von Elchen beteiligt gewesen zu sein. Eine Isolierung vom Vogel beschrieben Trinh et al. (2002).

Als Bewohner der Schleimhäute kann *A. (T.) pyogenes* unterschiedliche Infektionen verursachen, wie z.B. Aborte, Abszesse, Arthritiden, Endokarditiden, Mastitiden, Pneumonien, Osteomyelitiden, Metritiden und Vesikulitiden (Lewis, 1997; Narayanan et al., 1998; Yoshimura et al., 2000). Bei Rind, Schwein, Ziege, Schaf und Kaninchen ist *A. (T.) pyogenes* an eitrig-abszedierenden Entzündungen, Leberabszessen und auch bei Arthritiden, Endometritiden und Bronchopneumonien beteiligt (Guérin-Faubleé et al., 1993; Narayanan et al., 1998; Yoshimura et al., 2000; Jost et al., 2004a; Kirk et al., 2005). In Co-Infektion mit *F. necrophorum* verursacht *A. (T.) pyogenes* zudem Leberabszesse beim Rind. Beide Bakterien wirken dabei synergistisch, indem *F. necrophorum* die wirtseigenen Leukozyten zerstört und damit die Bindegewebsinvasion von *A. (T.) pyogenes* ermöglicht, während *A. (T.) pyogenes* Botenstoffe sezerniert, die wiederum Wachstum und Invasivität von *F. necrophorum* stimulieren (Roberts, 1967). Bei einer Antilopenart (Blau- oder Rotfußducker) waren *F. necrophorum* und *A. (T.) pyogenes* gemeinsam aus Abszessen des Gesichts- und Unterkieferbereichs nachweisbar (Roeder et al., 1989). Seimiya et al. (2004) berichteten ebenfalls von einer Mischinfektion dieser beiden Erreger in Zusammenhang mit einer nekrotischen Rhinitis eines Rindes.

Bei Hauswiederkäuern sowie beim Schwein gilt *A. (T.) pyogenes* als Erreger von purulenten Mastitiden (Lämmler, 1990; Lämmler und Hartwig, 1995). Die „Pyogenes-Mastitis“ stellt eine eitrige, mit Abzessbildung einhergehende Euterentzündung dar, die perakut, akut und auch chronisch verlaufen kann. Diese Mastitis des Rinds tritt sporadisch auf. Die Infektion erfolgt meistens galaktogen und selten hämatogen oder lymphogen, eventuell kutan oder auch durch Wundinfektionen. Beim Rind sind aus epidemiologischen und pathogenetischen Gründen zwei getrennte Formen bekannt: Die sporadisch auftretende „*Mastitis apostematosa*“ der Kühe und die enzootisch auftretende „Sommermastitis“ der Färsen und Jungrinder, die auch als „Holsteinische Euterseuche“, „böartige Euterseuche“, „Weideseuche“, „Fliegenstich“ oder „Einstich“ bekannt ist. Bei ersterer handelt es sich um eine chronische, eitrig-abszedierende Mastitis, die sekundär im Endstadium von Mastitiden oder im Rahmen von Zitzenverletzungen auftreten kann. Die „Sommermastitis“ zeigt sich als purulente Galaktophoritis und Mastitis, welche enzootisch verläuft, und bei deren Entstehung Weideinsekten als Vektoren fungieren (Lämmler und Hartwig, 1995). Bei beiden Formen handelt es sich meist um Mischinfektionen mit anaeroben Bakterien (Lämmler und Hartwig, 1995).

Obgleich *A. (T.) pyogenes* beim Menschen bisher nicht als Kommensale bekannt ist (Funke et al., 1995; Lynch et al., 1998), gibt es dennoch einige Berichte über Infektionen des Menschen mit diesem Erreger, hauptsächlich aus dem ländlichen Raum. Generell scheinen *A. (T.) pyogenes*-Infektionen des Menschen eine gewisse Vorschädigung des Wirtes vorauszusetzen. So wurde in einer dänischen Arbeit in den Jahren 1968 bis 1992 bei elf Patienten mit Entzündungsprozessen *A. (T.) pyogenes* nachgewiesen, acht der Patienten hatten bereits schwere Vorerkrankungen wie Prostata- oder Zervikalkarzinome, Divertikulitiden oder Cholesteatom (Gahrn-Hansen und Frederiksen, 1992). *A. (T.) pyogenes* verursachte hier z.B. in Co-Infektion mit anderen Erregern Abszesse, Otitiden, Cystitiden und Cholecystitiden bis hin zur Septikämie. Im Jahr 1998 beschrieben Lynch et al. eine septische Arthritis, die bei einem diabetischen Farmer auftrat. Plamondon et al. (2007) gaben eine erste Beschreibung über eine Endokarditis bei einem Mann ohne Tierkontakt. Diese Autoren berichteten auch über 13 weitere *A. (T.) pyogenes*-Infektionen von Menschen. Eine Sepsis bei einem Bauern in Brasilien durch *A. (T.) pyogenes* beschrieben Levy et al. (2009).

*A. (T.) pyogenes* ist ein 1-2 µm langes und 0,2-0,5 µm breites, kleines, unbewegliches und nicht Endosporen-bildendes Stäbchenbakterium (Lämmler und Hartwig, 1995). Das Bakterium wächst fakultativ-anaerob (Collins und Jones, 1982; Reddy et al., 1982; Schaal,

1986; Lämmler und Hartwig, 1995; Narayanan et al., 1998). Die Zellwand von *A. (T.) pyogenes* ist grampositiv, bei über 24 h alten Isolaten konnten jedoch auch gramnegative Formen auftreten (Reddy et al., 1982). *A. (T.) pyogenes* ist V- oder T-förmig angeordnet (Reddy et al., 1982). Makroskopisch bildet *A. (T.) pyogenes* auf Schafblutagarplatten, stecknadelkopfgröße, runde, schwach durchsichtige und zirkuläre Kolonien, die von einer schmalen  $\beta$ -hämolytischen Zone umgeben sind (Schaal, 1986; Lämmler und Hartwig, 1995). Erst nach ca. 48 h ist der Koloniedurchmesser auf etwa einen Millimeter angewachsen und zeigt dann eine deutliche Hämolyse. Die Kolonien sind unpigmentiert. Auf Schafblutagarplatten konnte in älteren Kulturen eine leicht bräunliche Verfärbung der Kolonien festgestellt werden. *A. (T.) pyogenes* wurde nach 15 min bei einer Temperatur von 60 °C inaktiviert (Collins und Jones, 1982; Reddy et al., 1982; Schaal, 1986; Lämmler und Hartwig, 1995). *A. (T.) pyogenes* enthielt in der Zellwand hauptsächlich geradkettig gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren, wie Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure (Lämmler und Hartwig, 1995).

*A. (T.) pyogenes* hat ferner proteolytische Eigenschaften (Lämmler und Hartwig, 1995). Diagnostisch macht man sich diese proteolytischen Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes* durch den Nachweis der Serolyse auf der sogenannten Serumplatte nach Löffler zu Nutze. Es handelt sich hierbei um eine *A. (T.) pyogenes* spezifische Reaktion, die durch Grabenbildung in dem Medium gekennzeichnet ist (Hartwig und Marcus, 1962). Gelatine-Verflüssigung durch eine Gelatinase beschrieben Gahrn-Hansen und Frederiksen (1992), Narayanan et al. (1998), Goyal et al. (2005) und Plamondon et al. (2007).

Durch Formamid extrahierbare Oberflächenantigene von *A. pyogenes* wiesen Kreuzreaktionen mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf. Dies ist ebenso eine charakteristische Eigenschaft von *A. (T.) pyogenes* (Lämmler und Blobel, 1988; Lämmler und Hartwig, 1995; Lynch et al., 1998).

Das Peptidoglycan der Zellwand von *A. (T.) pyogenes* basiert auf Lysin, daneben auch auf Glutaminsäure und Alanin. Das Genom von *A. (T.) pyogenes* enthielt Guanin und Cytosin mit einem Anteil von 56-58 % (Collins und Jones, 1982; Reddy et al., 1982).

### **2.2.8.1 Mutmaßliche Virulenzfaktoren von *A. (T.) pyogenes***

*A. (T.) pyogenes* bildet unterschiedliche mutmaßliche Virulenzfaktoren, darunter das Cholesterol-abhängige Pyolysin (PLO), das Kollagen-bindende Protein CbpA, ein

Fibronectin-bindendes und ein Fibrinogen-bindendes Protein, ferner die Exoenzyme Neuraminidase, Protease, DNase sowie auch Fimbrien.

Das Hämolyysin von *A. (T.) pyogenes*, bekannt als Pyolysin (PLO), wurde erstmals von Ding und Lämmler (1996) beschrieben. Das Hämolyysin wurde als Cholesterol-abhängiges Zytolysin definiert, welches dem Intermedilysin (ILY), dem Listeriolysin O (LLO), dem Perfringolysin O (PFO), dem Pneumolysin (PLY) und dem Streptolysin O (SLO) ähnelt (Billington et al., 1997). Bei dem Pyolysin handelt es sich um ein extrazelluläres Toxin, das an eukaryotische Zellmembranen bindet, Poren ausbildet und damit eine Zellysis verursacht (Billington et al., 2000). PLO erwies sich als Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. PLO zeigte ferner zu den anderen Mitgliedern der Cholesterol-abhängigen Zytolysin-Familie eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz von 31-41 % und erwies sich als unempfindlich gegen Reduktionsmittel oder Thiol-blockierenden Agenzien. PLO und auch Intermedilysin (ILY) beinhalten anstelle von Cystein Alanin. Daher wies PLO keine Thiol-Aktivierbarkeit auf (Billington et al., 1997; Billington et al., 2002b). Eine *A. (T.) pyogenes-plo*-Mutante erwies sich im Vergleich zum isogenen Wildtyp-Stamm als nicht hämolytisch. Dies wies darauf hin, dass PLO das einzige Hämolyysin von *A. (T.) pyogenes* ist (Jost et al., 1999). Außerdem zeigte diese Mutante eine deutlich geringere Virulenz in einem Mausmodell. Bei einer Dosis von  $10^8$  Bakterien war bei der *plo*-Mutante keine intraperitoneale Infektion zu beobachten, wobei bei dem Wildtyp-Stamm 7 von 8 Mäusen deutliche Krankheitszeichen zeigten (Jost et al., 1999). Die Virulenz der *plo*-negativen Mutante konnte allerdings durch Hinzufügen des *plo*-Gens wiederhergestellt werden. Dieser Unterschied wies auf die Bedeutung des *plo*-Gens für die Virulenz von *A. (T.) pyogenes* hin (Jost und Billington, 2005). Obwohl PLO ein eindeutiger Virulenzfaktor von *A. (T.) pyogenes* ist, ist dessen genaue Rolle in der Pathogenese von *A. (T.) pyogenes*-Infektionen allerdings immer noch unklar.

Jost und Billington (2005) beschrieben das Kollagen-bindende Protein CbpA von *A. (T.) pyogenes*. Dieses Protein vermittelte die Adhäsion der Bakterien an ein Kollagen-reiches Gewebe. CbpA erwies sich als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 124,7 kDa. Nach Pietrocola et al. (2007) band CbpA auch Fibronectin, allerdings an einer anderen Stelle als das Kollagen. Esmay et al. (2003) wiesen *cbpA* bei *A. (T.) pyogenes*, isoliert von Rindern (49 %), Schweinen (40 %) und Vögeln (100 %), nach. Dabei war bei 100 % der *A. (T.) pyogenes*, isoliert von Osteomyelitiden, *cbpA* nachweisbar. Silva et al. (2008) konnten *cbpA* bei allen untersuchten *A. (T.) pyogenes*-Stämmen bovinen Ursprungs nachweisen.

Das Fibronectin-bindende Protein von *A. (T.) pyogenes* zeigte ein Molekulargewicht von 20 kDa, wurde allerdings bislang noch nicht weiter charakterisiert. Es könnte ebenfalls die Adhäsion der Bakterien vermitteln (Jost und Billington, 2005).

Die Fibrinogenbindungsstelle von *A. (T.) pyogenes* zeigte besondere Spezifitäten für Fibrinogen von Mensch, Rind, Schaf, weniger für Hunde- und Pferdefibrinogen und erwies sich als Trypsin- und Pronase-empfindlich (Lämmler und Hartwig, 1995). Im Vergleich mit der Fibrinogenbindungsstelle von Streptokokken der serologischen Gruppe A war die Bindung von Fibrinogen an einer ausgewählten *A. (T.) pyogenes*-Kultur nach Hitzebehandlung (60 °C, 1 h) der Bakterien deutlich erhöht (Lämmler und Hartwig, 1995). Das Fibrinogen-bindende Protein von *A. (T.) pyogenes* wurde bislang noch nicht charakterisiert. Auch das Fibrinogen-bindende Protein könnte die Adhäsion von *A. (T.) pyogenes* vermitteln (Jost und Billington, 2005).

Die Neuraminidase (Sialidase) ist ein Enzym, das Sialinsäuren von Amino-Glycoproteinen abspaltet und diese damit verdaubar macht. Hier ist sie unverzichtbar beim Abbau der entsprechenden Aminoglycoproteine und Membran-Ganglioside (Jost und Billington, 2005). Neuraminidasen sind häufig in Viren, Bakterien, anderen Einzellern, Parasiten und Pilzen zu finden, kommen aber auch in den Lysosomen und den Zellmembranen von Tier und Mensch vor (Gottschalk und Bhargava, 1971). Nach Jost et al. (2001) war bei allen untersuchten *A. (T.) pyogenes*-Kulturen eine Neuraminidase-Aktivität auffindbar, die durch *nanH* kodiert wurde. NanH erwies sich als Protein mit einem Molekulargewicht von 107 kDa, das in der Zellwand von *A. (T.) pyogenes* lokalisiert war (Jost et al., 2001). Jost et al. (2002b) beschrieben des weiteren eine *nanH*-minus-Mutante von *A. (T.) pyogenes*, Stamm BBR1, die weiterhin Neuraminidaseaktivität zeigte und damit auf die Anwesenheit des zweiten Neuraminidase-kodierenden-Gens *nanP* hinwies. NanP erwies sich als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 186,8 kDa. Im Gegensatz zu *nanH* war *nanP* nur bei 64,2 % der *A. (T.) pyogenes* nachweisbar (Jost et al., 2002b).

Proteaseaktivitäten von *A. (T.) pyogenes* wurden in Gegenwart der Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und in Gegenwart der Metallionen  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$  und  $Co^{++}$  gehemmt (Lämmler und Hartwig, 1995). Das gereinigte Enzym hatte ein Molekulargewicht von 37 kDa, ein pH-Optimum bei pH 7,5 und ein Temperaturoptimum bei 50 °C (Schaufuss et al., 1989). Die Protease spielt eine wichtige Rolle als mutmaßlicher Virulenzfaktor vieler Bakterien, so z.B. bei Gewebeninvasion und -zerstörung, Umgehung der Immunabwehr und Modulation des

Immunsystems bei Entzündung (Travis et al., 1995). Derzeit liegen allerdings keine Informationen über die Rolle der Protease von *A. (T.) pyogenes* für deren Pathogenität vor (Jost und Billington, 2005).

Für *A. (T.) pyogenes* konnte ferner eine DNaseaktivität nachgewiesen werden (Sneath et al., 1986; Lämmler, 1990; Ramos et al., 1997). Die Bedeutung dieses mutmaßlichen Virulenzfaktors ist allerdings bislang unbekannt (Jost und Billington, 2005).

Fimbrien (von lateinisch *pilus* „Haar, Faser“, Plural: Pili) sind bei Prokaryonten vorkommende, außerhalb der Zelle befindliche, fadenförmige, aus einem Protein bestehende oberflächliche Anhängsel, die nicht zur Fortbewegung dienen. Fimbrien sind typisch für gramnegative Bakterien, die je nach Individuum einen Pilus bis viele Pili besitzen. Es gibt nur wenige grampositive Bakterien, die Fimbrien produzieren. Dazu gehören *Actinomyces* spp. (Cisar und Vatter, 1979), einige orale Streptokokken (Wu und Fives-Taylor, 2001), mehrere *Corynebacterium* spp. und *A. (T.) pyogenes* (Yanagawa und Honda, 1976; Ton-That et al., 2004). Fimbrien von grampositiven Bakterien ähneln morphologisch den Fimbrien von gramnegativen Bakterien, sind 200 bis 700 nm in der Länge und 2,5 bis 4,5 nm in der Breite (Yanagawa und Honda, 1976; Cisar und Vatter, 1979; Ton-That et al., 2004). Jost und Billington (2005) identifizierten in einer vorläufigen Charakterisierung die Fimbrien-kodierenden Gene *fimA* und *fimB* von *A. pyogenes*. *FimA* erwies sich als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45,7 kDa und *FimB* als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 90,5 kDa auf. Nach Jost und Billington (2005) wurden *fimA* und *fimB* bei 94 % der *A. (T.) pyogenes* nachgewiesen. Silva et al. (2008) wies *fimA* bei 100 %, und als weitere Fimbrien-kodierende Gene *fimE* bei 55 % und *fimC* und *fimG* bei 38 % der *A. (T.) pyogenes* nach. Santos et al. (2010) untersuchten die Fimbrien-kodierenden Gene *fimA* und *fimG* bei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermetritiden und von der Normalflora. Dabei war *fimA* bei 76,4 % und *fimG* bei 50 % der *A. (T.) pyogenes* nachweisbar.

## **2.3 Molekulare Identifizierungen von Bakterien**

### **2.3.1 Die ribosomale RNA**

Die ribosomale RNA stellt einen Bestandteil des Ribosoms dar. Innerhalb der ribosomalen Nukleinsäuren, die am Vorgang der Proteinsynthese beteiligt sind, lassen sich drei RNA-

Formen unterscheiden. Dies ist zum einen die ribosomale-RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die Messenger-RNA (mRNA). Ähnlich wie die DNA sind diese drei RNA-Typen polymere Moleküle, die aus Mononukleotiden bestehen, die über Phosphorbrücken miteinander verbunden sind. Die RNA-Moleküle unterscheiden sich von der DNA zum einen in einer deutlich geringeren Größe, in dem Zucker Ribose anstatt Desoxyribose und in der Base Uracil anstatt Thymin.

Die bakteriellen Ribosomen (70S) bestehen aus zwei ungleichen Untereinheiten, der kleinen 30S Untereinheit (Small ribosomal subunit RNA, SSU), bestehend aus 21 ribosomalen Proteinen und der 50S Untereinheit (Large ribosomal subunit RNA, LSU), bestehend aus 31 ribosomalen Proteinen. Die Einheit S bezeichnet eine „Svedberg“-Einheit, welche sich auf das Molekulargewicht der einzelnen Teile bezieht. Die kleine Untereinheit enthält die 16S rRNA und eine intergenic spacer-Region (Spacer-1), die große Untereinheit die 23S rRNA, eine weitere intergenic spacer-Region (Spacer-2) und die 5S rRNA (**Abb. 1**) (Gürtler und Stanisich, 1996; Lewin, 1998). Die ribosomalen rRNA-Gene sind für alle Organismen überlebenswichtig und im Reich der Bakterien hoch konserviert (Woese, 1987; Amann et al., 1995). Die 16S-23S rRNA intergenic spacer-Region, die die 16S und die 23S rRNA verbindet, spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der RNA.

Die Charakterisierung des 16S rRNA-Gens ist als Standardmethode zur Identifizierung von Spezies, Genera und Familien von Bakterien bereits etabliert. Dies spiegelt sich in der großen Anzahl an Informationen wieder, welche sich aufgrund von phylogenetischen Analysen von Mikroorganismen mit Hilfe dieses Gens bereits angesammelt haben (Barry et al., 1991; Kostman et al., 1992; Jensen et al., 1993; Eisen, 1998). Im Gegensatz dazu wurde bisher relativ wenig über 23S rRNA-Gensequenzen berichtet, und weder dieses Gen noch das 5S rRNA-Gen fanden bisher häufigen Einsatz in phylogenetischen Untersuchungen. Demgegenüber gibt es bereits einige Informationen über die Sequenz der 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (Kostman et al., 1995; Chanter et al., 1997).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der ribosomalen RNA (modifiziert Gürtler und Stanisich, 1996).

### 2.3.1.1 16S rRNA-Gen

Die 16S rRNA ist in aktiv wachsenden Zellen in einer großen Anzahl vorhanden. Die 16S rRNA-kodierenden Gene haben nach Lane et al. (1985) und Lewin (1998) eine Länge von 1542 Bp und enthalten konservierte Regionen, unterbrochen von variablen und hypervariablen Bereichen mit Unterschieden innerhalb verschiedener Spezies, Genera oder Familien.

Das 16S rRNA-Gen kann in der Routinediagnostik genutzt werden, um bestimmte Bakterien schnell und auch direkt aus klinischem Untersuchungsmaterial zu charakterisieren. Besonders wichtig erscheint die Nutzung des 16S rRNA-Gens für die schnelle Identifizierung und Charakterisierung von langsam wachsenden Organismen, wie z.B. *Mycobacterium* spp. (Kolbert und Persing, 1999).

Sequenzen des 16S rRNA-Gens verschiedener Bakterienspezies sind der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu entnehmen.

Die Verwendung der Sequenz des 16S rRNA-Gens zur Identifizierung unterschiedlicher Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Stubbs und Collins, 1993; Funke et al., 1995; Ramos et al., 1997; Lawson et al., 2001; Hoyles et al., 2002; Lehnen et al., 2006; Azuma et al., 2009).

### 2.3.1.2 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR)

Zwischen dem 16S und dem 23S rRNA-Gen liegt die ISR mit einer variablen Länge. Die Größe der ISR scheint für unterschiedliche Spezies bedeutsam zu sein (Condon et al., 1995). Die Längenunterschiede sind hauptsächlich von der Anwesenheit bestimmter Funktionseinheiten abhängig, wie z.B. der tRNA-Gene. Die meisten ISR gramnegativer Bakterien, so auch bei *E. coli*, enthalten beides, einen tRNA<sup>Ala</sup> (Alanin)- und einen tRNA<sup>Ile</sup> (Isoleucin)-Gen-Bereich. Andere Bakterienspezies, so z.B. *Aeromonas hydrophila* und *Haemophilus influenzae* weisen einen tRNA<sup>Glu</sup> (Glutamin)-Gen-Bereich auf (Loughney et al., 1982, Gürtler und Stanisich, 1996). Im Gegensatz dazu enthalten die ISR grampositiver Bakterien, wie *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus equi* und *Streptococcus pneumoniae*, entweder tRNA<sup>Ile</sup>- oder tRNA<sup>Ala</sup> Gene oder, wie bei *S. aureus* und

*Bacillus subtilis*, beide dieser tRNA-Gene (Bacot und Reeves, 1991; Chiaruttini und Milet, 1993; Gürtler und Barrie, 1995; Nour et al., 1995; Chanter et al., 1997).

Größen und Sequenzen der ISR verschiedener Bakterienspezies sind der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu entnehmen.

Konstante Regionen innerhalb der 16S- und 23S rRNA-Gene, die die ISR umspannen, ermöglichen eine Herstellung von universell einsetzbaren Oligonukleotidprimern. Damit ist eine Amplifizierung der gesamten ISR mittels PCR möglich. Die Größenunterschiede können im Agarosegel bestimmt werden. Ferner kann die gesamte ISR zur Sequenzierung eingesetzt werden (Whiley et al., 1995).

Die Sequenz der ISR wurde ebenso wie das 16S rRNA-Gen als geeignete Region des Bakteriengenoms vorgeschlagen, um Information zur Speziesidentifizierung zu erhalten (Barry et al., 1991; Kostman et al., 1995). Die ISR erwies sich ebenso als geeigneter Genabschnitt zur Entwicklung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern (Tilsala-Timisjärvi und Alatossava, 1997).

Die ISR ist bei den meisten Spezies wesentlich variabler als die der angrenzenden 16S rRNA- und der 23S rRNA-Gene, wobei es Variationen sowohl in der Länge als auch in der Sequenz gibt. Aufgrund des Ausmaßes dieser Variationen können diese Unterschiede zur Genus-, Spezies- oder Stammdifferenzierung einzelner Bakterien genutzt werden.

Nach Kostman et al. (1995) wurde die ISR zur Identifizierung von *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* und *Enterobacter*-Arten verwendet. Die Verwendung der Sequenz der ISR zur Identifizierung unterschiedlicher Spezies der Genera *Streptococcus* und *Staphylococcus* wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Chanter et al., 1997; Forsman et al., 1997; Hassan et al., 2001; 2003; Khan et al., 2003).

### **2.3.1.3 23S rRNA-Gen**

Das 23S rRNA-Gen ist 2904 Bp groß und beinhaltet eine größere Anzahl an Sequenzvariationen als das 16S rRNA-Gen (Lewin, 1998). Taxonomische und phylogenetische Arbeiten haben gezeigt, dass sich Bereiche des 23S rRNA-Gens ebenso zur Identifizierung von Bakterien eignen. Sequenzen des 23S rRNA-Gens verschiedener Bakterienspezies sind der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu entnehmen.

Speziesspezifische Abschnitte des 23S rRNA-Gens wurden zur Identifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Preus et al., 1992), *Campylobacter jejuni* und

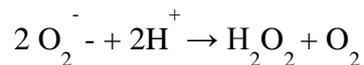
thermophilen *Campylobacter* spp. (Eyers et al., 1993; Konkel et al., 1994), *Coxiella burnetii* (Afseth et al., 1995), *Enterococcus faecium* (Naimi et al., 1999), *Listeria* spp. (Sallen et al., 1996), *Pasteurella multocida* (Miflin und Blackall, 2001), *S. aureus* (Straub et al., 1999), *Streptococcus* spp. (Harland et al., 1993; Sultana et al., 1998) und *Yersinia enterocolitica* (Skurnik und Toivanen, 1991) beschrieben.

### 2.3.2 Superoxid-Dismutase A-kodierendes Gen *sodA*

Mit Beginn der Anreicherung der Atmosphäre mit Sauerstoff mussten die Bakterien antioxidative Schutzmechanismen entwickeln oder auf anaerobe Lebensräume beschränkt bleiben. Die wichtigsten Oxidationsschutzenzyme in Bakterien sind Superoxid-Dismutasen (SOD) (Hünken, 2004).

SOD katalysieren die Dismutation von Superoxid-Anionen ( $2 \text{O}_2^-$ ) in Anwesenheit von Protonen ( $2 \text{H}^+$ ) zu molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und Wasserstoff-Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Wasserstoff-Peroxid wird durch Katalase anschließend zu Wasser umgewandelt. SOD inhibieren auf Grund ihrer detoxifizierenden Wirkung auch die Apoptose (Efferth, 2006). Der erste Vertreter dieser Enzyme wurde von McCord und Fridovich (1969) entdeckt.

Superoxid-Dismutasen sind Oxidoreduktase-Metallenzyme, die die Disproportionierung von Superoxid und Wasserstoffperoxid katalysieren.



In *E. coli* wurden sowohl Kupfer / Zink- (Cu / Zn-SOD), Mangan- (Mn-SOD) als auch Eisen-Superoxid-Dismutasen (Fe-SOD) nachgewiesen (Clements et al., 1999). Cu / Zn-SOD treten im wesentlichen in Eukaryonten, seltener in Bakterien auf (Schuster, 2008). Im Gegensatz dazu wurden Mn-SOD und Fe-SOD auch im Zytoplasma von Prokaryonten nachgewiesen. Beide schützen die DNA und die Proteine vor Oxidation.

Taxonomische und phylogenetische Arbeiten haben gezeigt, dass sich Bereiche des Gens *sodA*, welches das Enzym Mn-SOD kodiert, ebenso zur molekularen Identifizierung von Bakterien eignen.

Nach Poyart et al. (2000) wiesen einzelne als Gruppen zusammengefasste Spezies des Genus *Enterococcus* in den 16S rDNA-Sequenzen eine Ähnlichkeit von mehr als 99,0 % auf; in den *sodA*-Sequenzen allerdings maximal nur eine Ähnlichkeit von 87,9 %.

Die *sodA*-Gensequenz wurde im weiteren bereits zur Identifizierung verschiedener Bakterienspezies, wie *Actinomyces* spp. (Barkley und Gregory, 1990), *Enterococcus* spp. (Poyart et al., 2000), *Mycobacterium* spp. (Zolg und Philippi-Schulz, 1994), *Staphylococcus* spp. (Poyart et al., 2001) und *Streptococcus* spp. (Poyart et al., 1998), verwendet. Sequenzen des Gens *sodA* verschiedener Bakterienspezies sind der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu entnehmen.

### **2.3.3 RNA-Polymerase-kodierendes Gen *rpoB***

Die RNA-Polymerase (RNAP) ist ein wichtiges Enzym im transkriptionalen Prozess (Adekambi et al., 2009). RNAP ist in Bakterien verantwortlich für die Synthese von mRNA, tRNA und rRNA. Die RNAP aus *E. coli* ist am besten charakterisiert, ihre Struktur ist aber in allen anderen untersuchten Bakterien ähnlich. Das vollständige Enzym oder Holoenzym läßt sich in zwei Komponenten trennen, das Core-Enzym und den Sigmafaktor, das sogenannte  $\sigma$ -Polypeptid (Lewin, 1988). Das 400 kDa RNAP Core-Enzym besteht aus fünf Untereinheiten, einschließlich zwei  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha_2$ ), einer  $\beta$ -Untereinheit, einer  $\beta'$ -Untereinheit und einer  $\omega$ -Untereinheit. Diese Untereinheiten sind nach der Bindung der  $\sigma$ -Untereinheit zu einem Holoenzym verbunden (Adekambi et al., 2009). Die Untereinheiten haben unter anderem folgende Einzelfunktionen: Die großen Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$  bilden das aktive Zentrum des Enzyms. Die  $\beta'$ -Untereinheit trägt zur Bindung der DNA bei, während die  $\beta$ -Untereinheit einen Teil der Polymeraseaktivität enthält. Die  $\beta$ -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Transkription. Die  $\alpha$ -Untereinheiten dienen als Gerüst für die Zusammenlagerung der anderen Untereinheiten und Wechselwirkungen mit vielen Proteinen, die die Transkription regulieren (Horton et al., 2008). Die  $\omega$ -Untereinheit bindet den N- und C-Terminus von  $\beta'$  und ist *in vitro* für die Rückfaltung denaturierter RNA-Polymerase-Moleküle notwendig (Gentry und Burgess, 1993).

Einige Antibiotika wirken an der  $\beta$ -Untereinheit, wie durch die Lokalisierung von Resistenzvermittelten Mutationen geklärt werden konnte. Rifampicin verhindert die Initiation der Transkription, indem es noch vor der Bildung der ersten Phosphodiesterbindung blockiert (Lewin, 1988; Knippers et al., 1990). Eine Mutation des Gens, das die  $\beta$ -Untereinheit kodiert,

ist der wichtigste Mechanismus der Resistenz gegenüber Rifampicin. Für *Mycobacterium tuberculosis* wurden Mutationen am Codon 531, 526 und 516 (in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit) beschrieben. Für *S. aureus* wurde eine Mutation im Kodon 481 identifiziert (Adekambi et al., 2009).

Nach Rowland et al. (1993) ermöglichte eine Sequenzierung des *rpoB*-Gens eine molekulare Identifizierung von Bakterien. Diese Identifizierungen als Spezies oder Subspezies sind möglich aufgrund der hypervariablen Regionen des *rpoB*-Gens, die zwischen den Basen 2300 und 3300 liegen (Khamis et al., 2004; Adekambi et al., 2009). Die *rpoB*-Gensequenz wurde ursprünglich im Zusammenhang mit taxonomischen Fragestellungen bei *S. aureus*-Stämmen und für *Enterobacteriaceae* untersucht (Rowland et al., 1993; Mollet et al., 1997). In weiteren Untersuchungen ermöglichte die *rpoB*-Gen-Sequenz eine Unterscheidung unterschiedlicher Spezies des Genus *Mycobacterium*. Diese waren durch 16S rRNA-Gen-Sequenzanalysen nicht unterscheidbar (Adekambi und Drancourt, 2004; Adekambi et al., 2006). Nach Khamis et al. (2004) wiesen elf paarweise untersuchte Spezies des Genus *Corynebacterium* in den 16S rDNA-Sequenzen eine Homologie zwischen 98,5 % bis 99,7 % auf und in den *rpoB*-Sequenzen eine Homologie von 84,9 bis 96,6 %.

Die *rpoB*-Gensequenz wurde ferner bereits zur Identifizierung verschiedener Bakterienspezies, wie *Bartonella* spp. (Renesto et al., 2001), *Bosea* spp. und *Afipia* spp. (Khamis et al., 2003), *Corynebacterium* spp. (Khamis et al., 2004), *Legionella* spp. (Ko et al., 2002), *Mycobacterium* spp. (Kim et al., 1999), *Staphylococcus* spp. (Drancourt und Raoult, 2002) und zur Identifizierung von Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* (Mollet et al., 1997) verwendet. Sequenzen des *rpoB*-Gens verschiedener Bakterienspezies sind der Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu entnehmen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Bakterienkulturen, Probennahme und bakteriologische Untersuchung

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 100 Bakterienkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* zur Verfügung.

Dies waren zunächst 43 *A. phocae*-Kulturen, isoliert in einem Zeitraum von 2004 bis 2007, aus 33 Analtupferproben bzw. aus einer Vaginaltupferprobe und aus acht Gewebeproben von Seehunden (*Phoca vitulina*) sowie aus einer Gewebeprobe von einer Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*). Der Untersuchungsauftrag für die Seehund- und Kegelrobbenuntersuchungsproben erfolgte von Frau Dr. U. Siebert, Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Zentrale Einrichtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Werft Str. 6, 25761 Büsum. Einige Seehundstämme, die in die vorliegenden Untersuchungen miteinbezogen wurden, waren aus Wildfängen isoliert. Dies sind Seehunde, die lebend gefangen wurden, um bestimmte Proben, z.B. Anal- oder Vaginaltupfer zu nehmen. Nach der Probennahme erfolgte die Freilassung der Tiere. Bei den übrigen Seehunden, aus denen *A. phocae* isoliert wurde, handelte es sich entweder um bereits verendete Tiere (Totfunde) oder um noch lebende Tiere, die aufgrund eines nicht überlebensfähigen Zustands vom zuständigen Seehundjäger getötet wurden. Im Rahmen der Obduktion der Totfunde wurden Organproben zur Abklärung der Todesursache bzw. bei erkrankt aufgefundenen und getöteten Tieren zur Abklärung der Erkrankungsursache entnommen; ferner Tupferproben von unterschiedlichen Lokalisationen. Funddaten und nähere Angaben zu den *A. phocae*-positiven Seehunden- bzw. der Kegelrobbe sind **Tab. 2** und **Tab. 3** zu entnehmen. In **Tab. 4** sind Haupterkrankungs- bzw. Todesursachen der acht seziierten Seehunde und der Kegelrobbe dargestellt. Von jedem *A. phocae*-positiven Tier wurde jeweils eine *A. phocae*-Kultur, isoliert von einer Tupferprobe bzw. einem Organ, weitergehend untersucht.

Für die bakteriologischen Untersuchungen der Seehunde- bzw. der Kegelrobbe wurden, wie oben bereits dargestellt, von Wildfängen ausschließlich Tupferproben und von den Totfunden Gewebeproben und Tupferproben entnommen. Diese Proben wurden bei -25 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Die bakteriologische Untersuchung der eingefrorenen Seehund- bzw. Kegelrobben-tupferproben und Gewebeproben erfolgte zunächst durch Herrn Dr. R. Weiß und Frau Dr. E.

Prenger-Berninghoff, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 85-91, 35392 Gießen. Tupferproben wurden auf Schafblutagarplatten (3.2) ausgestrichen und für 48 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Galaxy S Plus CO<sub>2</sub> Incubator, RSBiotech Laboratory Equipment Ltd., Irvine, Schottland) bebrütet. Teile der aufgetauten Gewebeproben wurden in 94 % igen Äthylalkohol getaucht, abgeflammt, durchgeschnitten, die Schnittflächen auf Schafblutagarplatten (3.2) ausgestrichen und diese für 48 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bebrütet. Weitere Mikroorganismen, die neben den *A. phocae*-Kulturen aus dem jeweiligen Untersuchungsproben isoliert wurden, sind in **Tab. 5** dargestellt.

**Tab. 2:** Funddaten zu den 43 *A. phocae*-positiven Seehunden (*Phoca vitulina*) und der Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*)

Tierart/Tierschlüssel	Fundort	Funddatum	Fundart
<i>P. v.</i> 2509	Römö	13.04.04	W
<i>P. v.</i> 2508	Römö	13.04.04	W
<i>P. v.</i> 2694	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2698	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2693	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2689	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2700	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2691	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2697	Lorenzenplate	25.08.04	W
<i>P. v.</i> 2701	Römö	18.09.04	W
<i>P. v.</i> 2702	Römö	18.09.04	W
<i>P. v.</i> 2706	Römö	18.09.04	W
<i>P. v.</i> 2709	Römö	18.09.04	W
<i>P. v.</i> 2711	Römö	18.09.04	W
<i>P. v.</i> 2819	Lorenzenplate	02.12.04	W
<i>P. v.</i> 2830	Lorenzenplate	02.12.04	W
<i>H. g.</i> 2521	Sylt, Hörnum	07.01.04	T
<i>P. v.</i> 2523	Sylt, List	17.01.04	T
<i>P. v.</i> 2896	Lorenzenplate	12.04.05	W
<i>P. v.</i> 2878	Lorenzenplate	12.04.05	W
<i>P. v.</i> 2880	Lorenzenplate	12.04.05	W
<i>P. v.</i> 2883	Lorenzenplate	12.04.05	W
<i>P. v.</i> 2879	Lorenzenplate	12.04.05	W
<i>P. v.</i> 3158	Lorenzenplate	12.10.05	W
<i>P. v.</i> 3159	Lorenzenplate	12.10.05	W
<i>P. v.</i> 3047	Sylt, Rantum	05.07.05	T
<i>P. v.</i> 3684	Lorenzenplate	13.03.07	W
<i>P. v.</i> 3685	Lorenzenplate	13.03.07	W
<i>P. v.</i> 3992	Lorenzenplate	13.03.07	W
<i>P. v.</i> 4123	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4112	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4113	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4115	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4117	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4120	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4121	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 4125	Lorenzenplate	02.11.07	W
<i>P. v.</i> 3661	Nordfriesland, Eidersperrwerk	08.01.07	T
<i>P. v.</i> 3726	Büsum	12.01.07	T
<i>P. v.</i> 3723	Sylt, Rantum	27.01.07	G
<i>P. v.</i> 4003	Sylt, List	11.08.07	T
<i>P. v.</i> 4084	Sylt, Rantum	26.08.07	G
<i>P. v.</i> 4145	Helgoland	05.12.07	T

*P. v.*= *Phoca vitulina*; *H. g.*= *Halichoerus grypus*; W= Wildfang; T= Totfund; G= Getötet

**Tab. 3:** Weitere Angaben zu den *A. phocae*-positiven Seehunden und der Kegelrobbe

Tierart/ Tierschlüssel/ Fundjahr	Alter	Geschlecht	Standard- länge in cm	Gewicht in kg	Speckdicke (Nacken, mm)	Speckdicke (Rücken, mm)
<i>P. v.</i> 2509/04	mj	m	170	81	35	15
<i>P. v.</i> 2508/04	mj	m	172	91	32	23
<i>P. v.</i> 2694/04	mj	m	160	71	6	16
<i>P. v.</i> 2698/04	vj	w	130	31	11	12
<i>P. v.</i> 2693/04	mj	m	160	k.A.	14	16
<i>P. v.</i> 2689/04	mj	m	175	76	16	14
<i>P. v.</i> 2700/04	vj	m	125	35	13	15
<i>P. v.</i> 2691/04	mj	w	150	54	6	11
<i>P. v.</i> 2697/04	mj	w	135	38	6	11
<i>P. v.</i> 2701/04	mj	m	148	k.A.	5	8
<i>P. v.</i> 2702/04	mj	m	149	77	6	8
<i>P. v.</i> 2706/04	mj	m	175	77	6	13
<i>P. v.</i> 2709/04	mj	m	150	65	8	11
<i>P. v.</i> 2711/04	mj	m	160	66	6	5
<i>P. v.</i> 2819/04	dj	w	117	25	11	14
<i>P. v.</i> 2830/04	mj	w	152	75	34	26
<i>H. g.</i> 2521/04	vj	m	131	39,6	28	60*
<i>P. v.</i> 2523/04**	dj	w	47,5	1,41	4	4*
<i>P. v.</i> 2896/05	mj	m	175	81	36	23
<i>P. v.</i> 2878/05	vj	w	122	26	k.A	20
<i>P. v.</i> 2880/05	mj	w	150	98	31	27
<i>P. v.</i> 2883/05	mj	m	174	93	27	22
<i>P. v.</i> 2879/05	vj	w	119	31	22	16
<i>P. v.</i> 3158/05	mj	m	159	64	21	21
<i>P. v.</i> 3159/05	vj	w	128	36	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 3047/05	mj	w	155	59,8	28	33
<i>P. v.</i> 3684/07	vj	m	150	40	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 3685/07	vj	m	130	39	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 3692/07	vj	m	110	34,5	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4123/07	mj	m	180	90	k.A	k.A.
<i>P. v.</i> 4112/07	mj	m	185	93	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4113/07	mj	w	153	54	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4115/07	mj	m	149	61,5	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4117/07	vj	w	138	38,5	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4120/07	mj	m	153	50,5	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4121/07	mj	m	174	61,5	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4125/07	mj	w	149	58	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 3661/07	vj	m	108	17,2	24	k.A
<i>P. v.</i> 3726/07	vj	m	99	17,4	5	15
<i>P. v.</i> 3723/07	vj	m	113	17,4	15	15
<i>P. v.</i> 4003/07	dj	w	83	10,4	22	k.A
<i>P. v.</i> 4084/07	dj	w	95	15,6	k.A	k.A
<i>P. v.</i> 4145/07	vj	m	110	17,4	15	k.A.

mj= mehrjährig; vj= vorjährig; dj= diesjährig; m= männlich; w= weiblich; k.A.= keine Angaben;

\*= Speckdicke Brust; \*\*= Abort

**Tab. 4:** Haupterkrankungs- bzw. Todesursachen der acht seziierten Seehunde und der Kegelrobbe

Tierart/Tierschlüssel/Fundjahr	Befund
<i>H. g.</i> 2521/04	Sepsis
<i>P. v.</i> 2523/04	Abort
<i>P. v.</i> 3047/05	Magenperforation, Bronchopneumonie
<i>P. v.</i> 3661/07	Endoparasitose
<i>P. v.</i> 3726/07	Bronchopneumonie
<i>P. v.</i> 3723/07	Sepsis
<i>P. v.</i> 4003/07	Sepsis
<i>P. v.</i> 4084/07	Sepsis
<i>P. v.</i> 4145/07	Bronchopneumonie

**Tab. 5:** Weitere von den Seehunduntersuchungsproben bzw. der Kegelrobbenuntersuchungsprobe neben *A. phocae* isolierte Mikroorganismen

Tierart/ Tierschlüssel/ Fundjahr	Probennummer Gießen	Tupferprobe/ Organ/ <i>A. phocae</i> -positiv	Weitere isolierte Mikroorganismen
<i>P. v.</i> 2509/04	P2819	After	<i>Branhamella</i> spp., <i>E. coli</i>
<i>P. v.</i> 2508/04	P2828	After	<i>Neisseria</i> spp.
<i>P. v.</i> 2694/04	P5883	After	<i>Alcaligenes</i> spp., <i>Branhamella</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2698/04	P5889	Vagina	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Alcaligenes</i> spp., <i>Branhamella</i> spp., <i>C. perfringens</i> , <i>Erwinia</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2693/04	P5882	After	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Oligella ureolytica</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2689/04	P5876	After	<i>Alcaligenes</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2700/04	P5891	After	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>O. ureolytica</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2691/04	P5878	After	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>C. perfringens</i> , <i>O. ureolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., $\gamma$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2697/04	P5886	After	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Branhamella</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., Hefen, <i>O. ureolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2701/04	P6270	After	<i>Branhamella</i> spp., <i>C. perfringens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2702/04	P6272	After	<i>C. perfringens</i> , <i>E. coli</i> variatio <i>haemolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., $\beta$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2706/04	P6276	After	<i>Alcaligenes</i> spp., <i>C. perfringens</i> , <i>Neisseria</i> spp.
<i>P. v.</i> 2709/04	P6281	After	<i>C. perfringens</i> , <i>E. coli</i> , $\gamma$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2711/04	P6283	After	<i>Pasteurella</i> spp.
<i>P. v.</i> 2819/04	P7827	After	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , $\gamma$ -häm. Streptokokken

Tierart/ Tierschlüssel/ Fundjahr	Probennummer Gießen	Tupferprobe/ Organ/ <i>A. phocae</i> -positiv	Weitere isolierte Mikroorganismen
<i>P. v.</i> 2830/04	P7842	After	<i>Branhamella</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>H. g.</i> 2521/04	P3133	Lunge	<i>E. coli</i> variatio <i>haemolytica</i> , $\beta$ -häm. Streptokokken, $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2523/04**	P3132	Leber	<i>Branhamella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 2896/05	P3060	After	<i>Neisseria</i> spp., $\gamma$ -häm. Streptokokken, $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2878/05	P3035	After	<i>C. perfringens</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 2880/05	P3043	After	<i>C. perfringens</i> , <i>Neisseria</i> spp.
<i>P. v.</i> 2883/05	P3366	After	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Neisseria</i> spp.
<i>P. v.</i> 2879/05	P3362	After	<i>O. ureolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3158/05	P6911	After	<i>E. coli</i> , <i>Neisseria</i> spp.
<i>P. v.</i> 3159/05	P6912	After	<i>Neisseria</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3047/05	P3283	Lunge	<i>Bacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Erysipelothrix</i> <i>rhusiopathiae</i> , $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3684/07	P1803	After	<i>Neisseria</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3685/07	P1804	After	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3692/07	P1811	After	<i>Neisseria</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken,
<i>P. v.</i> 4112/07	P6844	After	<i>E. coli</i> variatio <i>hämolytica</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4113/07	P6846	After	<i>Pasteurella</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4115/07	P6849	After	<i>Neisseria</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4117/07	P6852	After	<i>Neisseria</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4120/07	P6857	After	<i>Neisseria</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4121/07	P6858	After	<i>E. coli</i> , coliforme Keime, <i>Neisseria</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken, $\gamma$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4123/07	P6860	After	<i>Neisseria</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4125/07	P6863	After	<i>Pseudomonas</i> spp., $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3661/07	4123	Bauchabszess	$\alpha$ -häm. Streptokokken, $\gamma$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3726/07	4247	Niere	<i>E. coli</i> variatio <i>haemolytica</i> , <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> , $\beta$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 3723/07	4066	Niere	<i>E. coli</i> , <i>Branhamella</i> spp., <i>Chryseobacterium</i> spp., coliforme Keime, $\beta$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4003/07	P6232	Leber	Coliforme Keime, <i>Erwinia</i> sp., <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>P. v.</i> 4084/07	4411	Darm- Lymphknoten	<i>Branhamella</i> spp., Hefen, $\alpha/\beta$ -häm. Streptokokken
<i>P. v.</i> 4145/07	P7380	Darm- Lymphknoten	<i>Brucella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> variatio <i>haemolytica</i> , Hefen, $\gamma$ -häm. Streptokokken

Weitere untersuchte Bakterienkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* waren sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, eine *A. pluranimalium*-Kultur, isoliert von einer Pyodermie eines Hundes, drei *A. (T.) bialowiezense*- und sieben *A. (T.) bonasi*-Kulturen, isoliert von Balanoposthitiden des Europäischen Bison (*Bison bonasus*), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. S. Speck, Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Alfred-Kowalke-Straße 17, 10252 Berlin, und zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Sepsis einer Bartagame bzw. eines Geckos. Letztere, sowie die *A. haemolyticum*-Kulturen und die *A. pluranimalium*-Kultur stammten aus Untersuchungsmaterialien der Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. R. Weiss und Frau Dr. E. Prenger-Berninghoff. Nähere Angaben über die oben genannten Kulturen sowie zusätzliche von diesen Tieren isolierte Mikroorganismen sind in **Tab. 6** dargestellt. Weitere Bakterienkulturen, die in die vorliegenden Untersuchungen miteinbezogen wurden, waren 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von subklinischen (n=24) bzw. klinischen (n=2) Rindermastitiden von 25 Kühen aus 21 Betrieben und 20 Ortschaften in Hessen. Die Kulturen aus der Routinediagnostik des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor (LHL), Schubertstr. 60, 35392 Gießen, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Zschöck und Frau K. Schlez (LHL) zur Verfügung gestellt und sind in **Tab. 7** zusammenfassend dargestellt. In die Untersuchungen miteinbezogen wurden ferner die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002, *A. phocae* DSM 10003, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152, *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162, *A. (T.) bonasi* DSM 17163, *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630. Die Kulturen wurden der Stammsammlung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität, Frankfurter Str. 107, 35392 Gießen und des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere entnommen. Die Herkunft und der Isolierungszeitraum aller untersuchten *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen sind in **Tab. 8** zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 6:** Herkunft der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, einer *A. pluranimalium*-Kultur, isoliert von einem Hund und von zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und einem Gecko

<b>Arcanobacterium- bzw. Trueperella- Kulturen</b>	<b>Datum der Probennahme</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Weitere isolierte Mikroorganismen</b>
<i>A. haemolyticum</i> 3801	15.07.97	Pferd; Wundinfektion; Chirurgische Klinik; J.L.U.- Gießen	Coliforme Keime, <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<i>A. haemolyticum</i> 4205	05.08.97	Pferd; Wundinfektion; Chirurgische Klinik; J.L.U.- Gießen	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<i>A. haemolyticum</i> 6879	10.12.97	Pferd; Wundinfektion; Chirurgische Klinik; J.L.U.- Gießen	Aerobe Bazillen, <i>E. coli</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>S. aureus</i>
<i>A. haemolyticum</i> 708	17.02.03	Pferd; Fistel; Chirurgische Klinik; J.L.U.-Gießen	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Pasteurella caballi</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<i>A. haemolyticum</i> P664	2005	Pferd; Dermatitis, Tierarzteinsendung; Hannover Weitere Informationen nicht verfügbar	Weitere Informationen nicht verfügbar
<i>A. haemolyticum</i> P3334	09.05.07	Pferd; Mauke, Heidelberg	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>A. haemolyticum</i> P3333	09.05.07	Pferd wie P3334; Dermatitis, Heidelberg	<i>Actinobacillus equuli</i> , <i>Citrobacter</i> <i>koseri</i> , <i>P. caballi</i> , <i>Proteus</i> spp, <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , $\alpha$ -häm. Streptokokken
<i>A. pluranimalium</i> 1128	16.03.07	Hund; Pyodermie; Kleintierklinik; J.L.U.-Gießen	<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>intermedius</i> -Gruppe, <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>
<i>A. (T.) pyogenes</i> 734	18.02.2003	Bartagame; Sepsis; Pathologie; J.L.U.-Gießen	Coliforme Keime, <i>Pseudomonas</i> spp., $\gamma$ -häm. Streptokokken
<i>A. (T.) pyogenes</i> 4984	06.12.2003	Gecko; Sepsis; Pathologie; J.L.U.-Gießen	<i>Acinetobacter</i> spp., Hefen, $\alpha/\beta$ -häm. Streptokokken

**Tab. 7:** Herkunft der 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert aus Rindermastitiden von 25 Kühen in 21 Betrieben und 20 Ortschaften Hessens

<i>A. (T.) pyogenes</i> -Kulturen	Datum der Probennahme	Zellzahl bzw. Flockenbildung	Ort	Betrieb/ Weitere isolierte Mikroorganismen
<i>A. (T.) pyogenes</i> 25/53	09.01.08	> 1 Mio	A	1/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 34/4	09.01.08	Flockenbildung	B	2/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 37/39	09.01.08	> 1 Mio	C	3/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 52/4	14.01.08	> 1 Mio	D	4/SCÄ
<i>A. (T.) pyogenes</i> 79/2	17.01.08	> 1 Mio	E	5/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 115/19	22.01.08	> 1 Mio	F	6 (Sa*)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 124/3	23.01.08	> 1 Mio	G	7 (Ap)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 128/20	24.01.08	644 000	H	8 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 162/1	30.01.08	> 1 Mio	I	9 (Ap)/Aerobe Bazillen
<i>A. (T.) pyogenes</i> 223/66	13.02.08	> 1 Mio	J	10 (Sa), Kuh I/KNS
<i>A. (T.) pyogenes</i> 226/26	13.02.08	> 1 Mio	K	11 (Sa), Kuh I/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 226/124	13.02.08	800 000	K	11 (Sa), Kuh II/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 234/189	14.02.08	> 1 Mio	L	12 (Sa), Kuh I/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 234/197	14.02.08	> 1 Mio	L	12 (Sa), Kuh II: VR/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 234/199	14.02.08	> 1 Mio	L	12 (Sa), Kuh II: VL/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 233/122	14.02.08	> 1 Mio	L	12 (Sa), Kuh III/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 244/3	15.02.08	> 1 Mio	M	13 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 246/13	18.02.08	> 1 Mio	N	14/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 298/5	26.02.08	749 000	O	15/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 369/34	11.03.08	> 1 Mio	J	10 (Sa), Kuh II/SCÄ
<i>A. (T.) pyogenes</i> 372/178	12.03.08	> 1 Mio	F	16 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 442/121	26.03.08	719 000	P	17 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 446/86	26.03.08	Flockenbildung	Q	18 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 446/116	26.03.08	2118 000	R	19 (Sa)/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 450/86	27.03.08	97 000	S	20/-
<i>A. (T.) pyogenes</i> 455/38	31.03.08	> 1 Mio	T	21 (Sa)/-

SCÄ= Äskulinpositive Streptokokken; KNS= Koagulase-negative Staphylokokken; Sa= *S. aureus*; Ap= *A. (T.) pyogenes*; VR= Vorne rechts; VL= Vorne links; \*Betriebe bei denen in vorhergehenden Untersuchungen *S. aureus* bzw. *A. (T.) pyogenes* nachgewiesen werden konnte

**Tab. 8:** Herkunft und Isolierungszeitraum der unterschiedlichen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen

<i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> - Kulturen	n	Herkunft	Isolierungs- zeitraum	Tierart/Probe
<i>A. phocae</i>	43	Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Zentrale Einrichtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Büsum	2004-2007	Seehund: After (33)*, Vagina (1), Lunge (1), Leber (2), Bauchabszess (1), Niere (2), Darmlymphknoten (2), Kegelrobbe: Lunge (1)
<i>A. haemolyticum</i>	7	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	1997-2007	Pferd: Wundinfektion (3), Fistel (1), Dermatitis (2), Mauke (1)
<i>A. pluranimalium</i>	1	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	2007	Hund: Pyodermie
<i>A. (T.) bialowiezense</i>	3	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung	2002-2004	Europäischer Bison: Balanoposthitis
<i>A. (T.) bonasi</i>	7	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung	2001-2004	Europäischer Bison: Balanoposthitis
<i>A. (T.) pyogenes</i>	2	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	2003	Bartagame: Sepsis Gecko: Sepsis
<i>A. (T.) pyogenes</i>	26	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor	2008	Rind: Mastitis (26)

n= Zahl der Kulturen; \*= Zahl der jeweilige Kulturen

### 3.2 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten (BAP), zu deren Herstellung Blutagarbasis (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung verwendet wurde:

#### Blutagarbasis

Nährsubstrat (Herzextrakt und Pepton)	20,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert: $6,8 \pm 0,2$	

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, 20 min bei 120 °C autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 % aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut bzw. Kaninchenblut. Das Schafblut wurde von

Blutspendern des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere gewonnen, das Kaninchenblut kommerziell von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland erworben.

### **3.3 Kultivierung der Kulturen**

Für die Kultivierung der Bakterienkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, Schafblutagarplatten (3.2) verwendet. Die Inkubation der beimpften Nährmedien erfolgte für 48 h bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen in einem Kerzentopf. Die Kulturen wurden alle drei Wochen subkultiviert.

### **3.4 Konservierung der Kulturen**

Hierzu wurden die Bakterien nach 3.2 angezüchtet, mit sterilem Tupfer in Mikro-Schraubröhrchen (MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland), die 1,5 ml Rinderserum (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 6 % Glukose enthielten, überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.5 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller Verfahren**

#### **3.5.1 Nachweis der Hämolyse und von CAMP-ähnlichen Reaktionen**

Zur Beurteilung der Koloniemorphologie und der Hämolyse wurden die Bakterienkulturen auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten (3.2) angezüchtet. Die Beurteilung erfolgte nach mikroaerober Bebrütung für 48 h bei 37 °C in einem Kerzentopf.

Synergistische und antagonistische Hämolyseformen wurden im weiteren mit CAMP-ähnlichen Tests, vergleichbar der von Skalka et al. (1979) beschriebenen Methode, untersucht. Der CAMP-Test (Christie, Atkins, Munch-Petersen, 1944) beruhte ursprünglich auf einer thermolabilen Substanz, die von CAMP-positiven B-Streptokokken gebildet wird und die in Anwesenheit des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins Schaferythrozyten vollständig lysiert. Für die CAMP-ähnlichen Tests der vorliegenden Untersuchungen wurden auf einer

Schafblutagarplatte (3.2) eine  $\beta$ -hämolyzierende *S. aureus*-Kultur bzw. eine *S. agalactiae*- oder *Rhodococcus equi*-Kultur der Stammsammlung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie als Indikatorstamm senkrecht ausgestrichen. Im rechten Winkel zu diesem Impfstrich erfolgte der Ausstrich der zu untersuchenden *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen, wobei zwischen den beiden Impfstrichen ein Abstand von 3-4 mm eingehalten wurde. Die Inkubation der beimpften Platten erfolgte anschließend für 48 h bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen in einem Kerzentopf. Nach der Inkubation zeigte sich eine positive CAMP-ähnliche Reaktion durch eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse im Bereich der unvollständigen Staphylokokken- $\beta$ -Hämolyse, bzw. durch eine vollständige Hämolyse im Bereich des *S. agalactiae*- bzw. *R. equi*-Indikatorstamms, die umgekehrte- oder antagonistische-CAMP Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins in einer Hemmung der Staphylokokken  $\beta$ -Hämolyse.

Bei der Untersuchung einer Seehundprobe konnte eine neue synergistische Hämolysereaktion zwischen *A. phocae* und einer noch zu benennenden Spezies festgestellt werden. Die im weiteren noch zu benennende Spezies als Indikatorstamm führte in Gegenwart von *A. phocae* bzw. *A. haemolyticum* zu einer vollständigen Hämolysezone.

### **3.5.2 Biochemische Charakterisierung mit dem „API-Coryne-Testsystem“**

Das „API-Coryne-Testsystem“ (Biomérieux, Nürtingen, Deutschland) ist ein standardisiertes Identifizierungssystem, mit dem die biochemischen Eigenschaften der zu identifizierenden Bakterien nachgewiesen werden können. Es handelt sich hierbei um einen Streifen mit 20 Mikroröhrchen, die eine definierte Menge von dehydratisierten Substraten zum Nachweis von Enzymaktivitäten oder Kohlenhydratfermentationen enthalten. Diese Substrate ermöglichten den Nachweis der Nitratreduktion, den Nachweis der Enzyme Pyrazinamidase, Pyrrolidonyl-Arylamidase, Alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Glucosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, den Nachweis der Äsculinspaltung ( $\beta$ -Glucosidase) und den Nachweis der Enzyme Urease und Gelatinase. Als Kohlenhydrat-Fermentationsreaktionen waren der Abbau von D-Glucose, D-Ribose, D-Xylose, D-Mannitol, D-Maltose, D-Lactose, D-Saccharose und Glykogen nachweisbar.

Für diesen Test wurden als erstes die zu identifizierenden Bakterienstämme auf einer nach 3.2 hergestellten Schafblutagarplatte für 24-48 h in einem Kerzentopf angezüchtet. Eine Inkubationswanne mit Deckel wurde vorbereitet. Mit ca. 5 ml destilliertem oder

demineralisiertem Wasser erfolgte die Anfeuchtung der Kammer. Schließlich wurde der Streifen mit 20 Mikroröhrchen in die Wanne gelegt. In einer Ampulle API Suspensionsmedium (Biomerieux) erfolgte die Suspension der zuvor angezüchteten Kultur. Die Trübung der Suspension sollte bei McFarland 6-Standard liegen. In den ersten 11 Mikroröhrchen des Streifens (NIT bis GEL) wurden 100-150 µl der API-Suspension pipettiert. Danach wurde eine Ampulle API GP Medium (Biomerieux) geöffnet, 500 µl der hergestellten API-Suspension hineinpipettiert und gut homogenisiert. Die neun restlichen Mikroröhrchen (0 bis GLYG) wurden mit dieser neu hergestellten Suspension gefüllt und mit Paraffinöl überschichtet. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer konnten die Ergebnisse der Kohlenhydrat-Fermentationsreaktionen abgelesen werden. Das Beurteilen der Nitratreduktion war nach Zugabe der Reagenzien Nit 1 und Nit 2 (Biomerieux), der Nachweis des Enzyms Pyrazinamidase nach Zugabe des PYZ-Reagenzes (Biomerieux) und der Nachweis von PYRA bis β-NAG nach Zugabe der Reagenzien Zym A und Zym B (Biomerieux) und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur möglich.

### **3.5.3 Nachweis des Enzyms Katalase**

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte mit einigen Kolonien der nach 3.2 angezüchteten Bakterien auf einem Objektträger, wobei die Kolonien in ca. 20 µl einer 3 % igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung verrieben wurden. Das Auftreten einer deutlichen Sauerstofffreisetzung, d.h. eine Bläschenbildung, wurde als positive Reaktion bewertet. Im negativen Fall zeigte sich eine Trübung der Lösung ohne Bläschenbildung (Brückler et al., 1994).

### **3.5.4 Nachweis des Enzyms DNase**

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgte mit dem Fertignährmedium DNase-Testagar (Merck), der sich wie folgt zusammensetzte:

#### DNase-Testagar

Tryptose	20,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
DNA	2,0 g
Agar	15,0 g

Aqua dest. 1000 ml  
pH-Wert:  $7,3 \pm 0,2$  bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Inkubation der beimpften DNase-Testagar-Platten erfolgte für 48 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter mikroaeroben Bedingungen in einem Kerzentopf. Durch die sich anschließende Flutung der Agar-Platte mit 1 N HCl konnte die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Nach den Angaben des Herstellers kommt es bei DNase-bildenden Bakterienkulturen zu einer hydrolytischen Spaltung der im Nährboden enthaltenen Desoxyribonukleinsäure. Um DNase-positive Kolonien, wie z.B. *A. (T.) pyogenes*, zeigten sich klare Zonen, während der übrige Nährboden durch Ausfällung von DNA getrübt war (Jeffries et al., 1957).

### 3.5.5 Nachweis des Enzyms Hyaluronidase

Der Nachweis des Enzyms Hyaluronidase erfolgte auf Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI) (Oxoid, Wesel, Deutschland). Dieses Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

#### Hirn-Herz-Glucose-Agar (BHI)

Kalbshirninfusion	12,5 g
Rinderherzinfusion	5,0 g
Proteose-Pepton	10,0 g
Glucose	2,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g
Agar	10 g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert:  $7,4 \pm 0,2$  bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, 20 min bei  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  autoklaviert und auf ca.  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 % aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut.

Die Überprüfung der Hyaluronidasebildung erfolgte mittels des von Winkle (1979) beschriebenen Dekapsulationstests. Eine BHI-Blutagarplatte wurde S-förmig mit einer mucoid wachsenden Streptokokkenkultur (*Streptococcus equi* subsp. *equi*, Wildisolat) als

Indikatorkeim sowie senkrecht dazu mit der zu untersuchenden Bakterienkultur beimpft und für 48 h bei 37 °C in einem Kerzentopf bebrütet. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase zeigte sich in der Nähe der zu untersuchenden Bakterienkulturen, in Form von nicht-mucoid wachsenden Kolonien der ansonsten mucoid wachsenden Streptokokkenkultur, da die in den Agar diffundierte Hyaluronidase die Ausbildung einer Hyaluronsäurekapsel durch die Streptokokken hemmte.

### **3.5.6 Voges-Proskauer-Test**

Die Überprüfung der Acetoinbildung erfolgte mittels des von Voges und Proskauer (1898) beschriebenen Tests. Dazu wurden einige Kolonien der nach 3.2 angezüchteten Bakterien mittels steriler Öse in Voges-Proskauer-Medium (MR-VP-Bouillon, Merck) beimpft und für 48 h bei 37 °C in einem Kerzentopf inkubiert. Nach Zufügen von 3 ml  $\alpha$ -Naphthol und 1 ml 40 % KOH zeigte ein deutlicher Farbumschlag nach Rot innerhalb von 10-30 min eine positive Reaktion. Als Positivkontrolle diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346, als Negativkontrolle die *S. intermedius*-Kultur DSM 20373.

### **3.5.7 Nachweis der Enzyme $\beta$ -Galactosidase, $\beta$ -Glucuronidase- und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase durch Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate**

Das Nachweisverfahren für diese bakteriellen Enzyme beruhte auf der Abspaltung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons von dem nicht-fluoreszierenden Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid und 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid (Slifkin und Gil, 1983).

Aus einer zunächst hergestellten Stammlösung, die jeweils 5  $\mu$ mol/l 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid bzw. 15  $\mu$ mol/l 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid und 15  $\mu$ mol/l 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid (Sigma, Steinheim, Deutschland), (Maddocks und Greenan, 1975), gelöst in 0,2 ml Dimethylsulfoxid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), enthielt, entstand durch Auffüllen mit 0,2 mol/l Na-Acetatpuffer, pH 5,2, (Slifkin und Gil, 1983) 10 ml Gebrauchslösung.

Zum eigentlichen Nachweis der Enzyme wurden einige Kolonien der zu untersuchenden Kultur mit Hilfe einer sterilen Öse intensiv auf Filterpapier verrieben und 20  $\mu$ l der

Gebrauchslösung auf die eingeübten Bakterien getropft. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Substrats erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37 °C unter Abdeckung. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer deutlich leuchtend blauen Fluoreszenz unter UV-Licht (365 nm), die sich nach Zugabe von 20 µl einer 0,1 mol/l NaOH-Lösung noch verstärkte.

### **3.5.8 Nachweis der Enzyme Alkalische Phosphatase, $\alpha$ -Mannosidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase**

Tabletten, die Substrate für die Untersuchung der Enzyme Alkalische Phosphatase,  $\alpha$ -Mannosidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase (Inverness Medical, Köln, Deutschland) enthielten, wurden nach den Anweisungen des Herstellers (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Dänemark) verwendet. In einem beschrifteten Glasröhrchen wurde dazu die zu untersuchende Kultur in 250 µl NaCl suspendiert. Die Trübung der hergestellten Suspension sollte bei McFarland 4-Standard liegen. Eine Alkalische Phosphatase-,  $\alpha$ -Mannosidase- und Pyrrolidonyl-Arylamidase-Diagnostik-Tablette wurde jeweils der Suspension zugegeben und das Glasröhrchen für 4 h bei 35-37 °C inkubiert.

Für Alkalische Phosphatase und  $\alpha$ -Mannosidase wurde dunkelgelb als positive Reaktion und hellgelb oder farblos als negative Reaktion bewertet. Für Alkalische Phosphatase diente als Positivkontrolle die *A. phocae*-Referenzkultur DSM 10002 und als Negativkontrolle die *A. (T.) pyogenes*-Referenzkultur DSM 20594. Für  $\alpha$ -Mannosidase wurde als Positivkontrolle die *A. haemolyticum*-Referenzkultur DSM 20595 verwendet und als Negativkontrolle die *A. (T.) bernardiae*-Referenzkultur DSM 9152.

Für das Enzym Pyrrolidonyl-Arylamidase wurden nach der Inkubation 3 Tropfen Aminopeptidase-Reagenz (Rosco Diagnostica A/S) hinzugefügt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer Rotfärbung, eine negative Reaktion in einer Gelbfärbung. Als Positivkontrolle diente die *A. pluranimalium*-Referenzkultur DSM 13483, als Negativkontrolle die *A. (T.) abortusuis*-Referenzkultur DSM 19515.

### 3.5.9 Wachstum auf Löffler-Medium

Zum Nachweis der Serolyse wurde Löffler-medium nach folgendem Rezept verwendet:

#### Standard I-Nährbouillon (Merck)

Pepton	15,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	6,0 g
D(+)-Glucose	1,0 g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert:  $7,5 \pm 0,2$  bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Der Löffler-Medium wurde hergestellt in kleinen Glaspetrischalen durch Zugabe von 7 Teilen Rinderserum (PAA Laboratories GmbH) zu 3 Teilen Standard I-Nährbouillon, die pro Liter zusätzlich 6 g Glucose enthielt. Die Petrischalen wurden bis zum Festwerden für ca. 50 min bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die Inkubation des mit den *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen beimpften Löffler-Medien erfolgte anschließend für 48 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter mikroaeroben Bedingungen in einem Kerzentopf.

Aufgrund der proteolytischen Aktivität zeigte *A. (T.) pyogenes* im positiven Fall im Bereich des Bakterienwachstums eine Grabenbildung (Hartwig und Marcus, 1962). Als Positivkontrolle diente die *A. (T.) pyogenes*-Referenzkultur DSM 20630, als Negativkontrolle die *A. (T.) bernardiae*-Referenzkultur DSM 9152.

### 3.5.10 Nachweis des mit Streptokokken-Serogruppe-G kreuzreagierenden Antigens

Die enzymatische Extraktion des kreuzreagierenden Antigens der zu untersuchenden Kulturen erfolgte durch Vermischen von einigen Kolonien mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  der dem Testsystem beigefügten Extraktionslösung (Streptokokken-Identifizierungstest; Oxoid) für 5 min sowie einer anschließenden Inkubation für 5 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach kurzem Schütteln und einer weiteren Inkubation für 5 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden  $20\text{ }\mu\text{l}$  dieser Lösung mit  $20\text{ }\mu\text{l}$  der zuvor auf Raumtemperatur erwärmten Latexsuspension G auf einem Objektträger unter rotierendem Schwenken vermischt. Eine positive Reaktion zeigte sich nach 30-60 s durch die

Agglutination der mit den gruppenspezifischen Antikörpern sensibilisierten Latexpartikel. Als Positivkontrolle diente die *A. (T.) pyogenes*-Referenzkultur DSM 20594, als Negativkontrolle die *A. phocae*-Referenzkultur DSM 10003.

### **3.6 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren**

#### **3.6.1 DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“**

Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte mit dem „DNeasy Tissue-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Angaben des Herstellers. Dazu wurden wenige Kolonien der auf Festmedium nach 3.2 angezüchteten Kulturen in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit 180 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) unter Zusatz von 5 µl Mutanolysin (10 U/µl, Sigma) gegeben und anschließend für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Proteinase K (Qiagen) und 200 µl AL Lysis Puffer (Qiagen) zur Deproteinisierung und guter Durchmischung des Reaktionsgemischs erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei 56 °C im Brutschrank. Das anschließende Erhitzen für 10 min auf 95 °C führte zur Inaktivierung der Proteinase K.

Nach einer kurzen Abkühlphase und der Zugabe von 200 µl 96 % igem Ethanol sowie guter Durchmischung wurde das Reaktionsgemisch durch den DNeasy Filtereinsatz, der eine Silica-Membran (Qiagen) beinhaltet, mittels Zentrifugation für 1 min (6000 x g) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abfiltriert. Die an die Membran gebundene DNA konnte nun 2 x mit je 500 µl AW1- und AW2-Puffer (Qiagen) gewaschen und dann zunächst für 1 min (6000 x g) bzw. nach dem zweiten Waschschrift bei 13 000 x g für 2 min zur vollständigen Entfernung der Waschlösung abzentrifugiert werden. Der jeweilige Überstand wurde verworfen und der DNeasy Filtereinsatz mit Silica-Membran in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Das Eluieren der an die Membran gebundenen DNA erfolgte mittels 200 µl AE-Puffer (Qiagen) und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Das DNA-haltige Eluat konnte nun abzentrifugiert (6000 x g) werden. Die so erhaltene DNA wurde direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.6.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

#### **a**

Primer 1 (10 pmol/l)	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol/l)	1,0 µl
dNTP (10 mmol/l, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	0,6 µl
PCR Gold Puffer (10 x, Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) <sup>a</sup>	3,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mmol/l, Applied Biosystem)	1,8 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, Applied Biosystem)	0,2 µl
Aqua bidest.	19,9 µl

<sup>a</sup>(150 mmol/l Tris-HCL, 500 mmol/l KCL, pH 8.0)

oder

#### **b**

Primer 1 (10 pmol/l)	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol/l)	1,0 µl
dNTP (10 mmol/l, Fermentas)	0,6 µl
PCR Puffer (10 x, mit 15 mmol/l MgCl <sub>2</sub> , Sigma) <sup>b</sup>	3,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, Sigma)	0,2 µl
Aqua bidest.	21,7 µl

<sup>b</sup>(100 mmol/l Tris-HCL, 500 mmol/l KCL, pH 8.3)

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 27,5 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 2,5 µl der nach 3.6.1 präparierten DNA vermischt. Anschließend konnten die Proben in den Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Rodgau Jügesheim, Deutschland oder MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) eingesetzt werden und das Temperaturprogramm durchlaufen. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten aus PCR-Ansätzen erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach dem Angaben des Herstellers. Zunächst wurde in einem

Reaktionsgefäß zu einem Volumen PCR-Ansatz das fünffache Volumen PB-Puffer (Qiagen) pipettiert und gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch eine QIAquick Spin Column für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer (Qiagen) durch erneutes Zentrifugieren für 2 min bei 6000 x g gewaschen. Die Elution der gebundenen PCR-Produkte aus dem Filter erfolgte mit 50 µl EB (10 mmol/l TrisHCl, pH 8,5) (Qiagen) durch Zentrifugation (1 min, 6000 x g) in ein neues Auffanggefäß.

### **3.6.3 Agarosegelelektrophorese**

Der Nachweis der DNA-Amplifikate der PCR erfolgte durch Elektrophorese in einem 1,5 %-igen Agarosegel bei 120 V. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland) in 100 ml 1 x Tris-Acetat-Electrophorese Puffer (TAE, 4.0 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 1,14 mmol/l Essigsäure pH 8.0) suspendiert. Dazu wurden 13 µl des PCR-Produkts, versetzt mit 5 µl 6 x Loading Dye Solution (Fermentas), auf das Agarosegel aufgetragen und bei 120 mA für 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Als Längenstandard wurden in der ersten Spur des Gels 3 µl eines Markers (GeneRuler™ DNA Ladder, Size Standard 100-1000 bp-Ladder oder 100-10000 bp-Ladder; beide Fermentas) aufgetragen.

### **3.6.4 Ethidiumbromidfärbung**

Zur Darstellung der DNA-Fragmente erfolgte nach der Gelelektrophorese das Färben des Gels mit einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml, Carl Roth) für 20 min. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid lagerte sich dabei als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA ein. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurde das Gel durch Schwenken in Aqua dest. (10 min bei Raumtemperatur) entfärbt und anschließend unter UV-Beleuchtung mit Hilfe eines Gel-Video-Dokumentationssystems (Image Master VDS, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) fotografisch dokumentiert. Die DNA-Fragmente stellten sich als helle Banden vor dunklem Hintergrund dar.

### 3.6.5 DNA-Präparation aus Agarosegelen und Sequenzierung

Die DNA-Präparation aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAEX II Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zur DNA-Präparation wurde nach Agarosegelelektrophorese (3.6.3) und Ethidiumbromidfärbung (3.6.4) die entsprechende Bande (ca. 250 mg) aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß mit 750 µl QX1-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 10 µl QIAEX II (Qiagen) gegeben, gut vermischt und für 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Dieser Ansatz wurde alle 2 min durchmischt und dann bei 14000 x g für 1 min abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Nach Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren des Sediments in 500 µl QX1 folgte ein erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 14000 x g sowie ein Abpipettieren der Lösung. Eine Weiterbehandlung des DNA-Pellets erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PE-Puffer (Qiagen), Zentrifugieren bei 14000 x g für 1 min, durch Abpipettieren der Waschlösung und Trocknen des DNA-Pellets bei 25 °C für 15 min. Das Eluieren der DNA erfolgte mit 20 µl 10 mmol/l TrisHCl, pH 8,5 (Qiagen) und anschließendem Zentrifugieren des DNA-haltigen Eluats bei 14000 x g für 1 min. Nach Abschluss des Elutionsschrittes konnte der Überstand als Template in die Sequenzierung eingesetzt bzw. bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die gereinigte DNA oder das PCR-Produkt wurden sequenziert von SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) oder GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland). Sequenzanalysen und ein Sequenzvergleich mit Gensequenzen des National Centre for Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Finch Tv Version 1.4.0, DNASTAR-MegAlign (DNASTAR Inc., Madison, USA) oder ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

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

Zur Amplifizierung der 16S rDNA der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 und von einigen weiteren Kulturen der vorliegenden Untersuchungen kamen die von Kuhnert et al. (1996) beschriebenen universellen 5'-Oligonukleotidprimer 16SUNI-L (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') und 3'-Oligonukleotidprimer 16SUNI-R (5'-GTG TGA CGG GCG GTG TGT AC-3') mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Ansatzstelle des Oligonukleotidprimers 16SUNI-L entsprach der Position 8 bis 27 und die des

Oligonukleotidprimers 16SUNI-R der Position 1391 bis 1410 der *E. coli*-16S rDNA-Nummerierung.

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	58 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

### **3.6.7 Amplifizierung und Sequenzierung der 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR)**

Zur Amplifizierung der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen und von einigen weiteren Kulturen der vorliegenden Untersuchungen kamen die von Chanter et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer 1 bzw. b mit der Sequenz 5`-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3` und Oligonukleotidprimer 2 bzw. c mit der Sequenz 5`-TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung.

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	70	s	Denaturierung
	45 °C	70	s	Primeranlagerung
	72 °C	70	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

### 3.6.8 Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens

Zur Amplifizierung der 23S rDNA der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen und einer *A. pluranimalium*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen wurde der von Jost et al. (2004b) beschriebene Oligonukleotidprimer 23S-1 (5`-AGT TCC GAC CTG CAC GAA TGG C-3`), und der ebenso von Jost et al. (2004b) beschriebene und in der vorliegenden Arbeit modifizierte Oligonukleotidprimer 23S-2a (5`-CGT CCG TCC CGG TCC TCT -3`) mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch verwendet. Die Auswahl des Oligonukleotidprimers 23S-2a erfolgte mit der aus der GenBank unter der Zugangsnummer U70214 erhaltenen 23S rDNA Sequenz von *E. coli* mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO 4.0 und durch BLAST.

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	60 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

### 3.6.9 Amplifizierung und Sequenzierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA*

Zur Amplifizierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* wurden zunächst für fünf *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen (*A. phocae* DSM 10002, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630) der vorliegenden Untersuchungen die von Zolg und Philipp-Schulz (1994) beschriebenen universellen Oligonukleotidprimer Z205 (5`-AGC TTC ACC ACA GCA AGC ACC A-3`) und Z212 (5`-TCG (GT)CC CAG TTC ACG AC(GA) TTC CA-3`) verwendet.

Das für diese fünf *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	3	min	Initiale Denaturierung
33 Zyklen	94 °C	30	s	Denaturierung
	39 °C	50	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	6	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

Die Auswahl des zweiten universellen *sodA*-spezifischen Oligonukleotidprimerpaars erfolgte nunmehr mit diesen fünf zuvor erhaltenen *sodA*-Gensequenzen (GenBank-Zugangsnummer AM946391, AM989465, AM983534, AM989466 und AM949566) wie beschrieben (3.6.8).

Die Oligonukleotidprimer *sodA1-F* (5`-GGC GA(CT) (CT)TT TC(GC) AAG ATC AAC CAG-3´) und *sodA1-R* (5`-GTT GGC CTG CTG GTC GAA AAG CTG GAA-3´) ermöglichten mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch die Amplifizierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* der drei *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163.

Die Amplifizierung von *sodA* von *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

1 Zyklus	94 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	60	s	Denaturierung
	37 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

### 3.6.10 Amplifizierung und Sequenzierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase-kodierenden Gens *rpoB*

Zur Amplifizierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase kodierenden Gens *rpoB* der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen und von einigen weiteren Kulturen der vorliegenden Untersuchungen kamen die von Khamis et al. (2004) beschriebenen universellen Oligonukleotidprimer C2700-F (5`-CG(AT) ATG AAC AT(CT) GG(GCT) CAG GT-3`) und C3130-R (5`-TCC AT(CT) TC(AG) CC(AG) AA(AG) CGC TG-3`) mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung.

Das anschließend für sieben *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen (*A. phocae* DSM 10002, *A. phocae* DSM 10003, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163) durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	94 °C	30	s	Denaturierung
	37 °C	30	s	Primeranlagerung
	72 °C	2	min	Elongation
1 Zyklus	72 °C	10	min	Elongation

Die Amplifizierung von *rpoB* von *A. (T.) abortusisus* DSM 19515, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152, *A. (T.) pyogenes* DSM 20594, *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 und von weiteren *A. (T.) pyogenes*-Kulturen erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	94 °C	30	s	Denaturierung
	50 °C	30	s	Primeranlagerung
	72 °C	2	min	Elongation
1 Zyklus	72 °C	10	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

### 3.6.11 PCR-vermittelter Nachweis speziesspezifischer Genabschnitte

#### 3.6.11.1 Amplifizierung von *A. phocae*-ISR- bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten

Zur Amplifizierung von *A. phocae*-spezifischen Abschnitten der ISR bzw. der benachbart liegenden 23S rDNA kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Aph1-ISR-F mit der Sequenz 5`-GGG TGT GGC TGG TGT CCC TGT T-3`, Aph1-23S rDNA-R mit der Sequenz 5`-CTG GTA ACC AGA AAC AAC TCT GGC CA-3`, Aph2-ISR-F mit der Sequenz 5`-GCC TTA CAC CTG GTT TTA TTT GTT TGA-3`, Aph3-ISR-F mit der Sequenz 5`-GAG CTA CCT TCA TGC CCT GTA TTT TTC A-3` und Aph3-ISR-23S rDNA-R mit der Sequenz 5`-AGC CAG GTT CCC CCA TTC GG-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der ISR-23S rDNA-Sequenzen von sechs *A. phocae*-Kulturen (GenBank-Zugangsnummer EU194565, EU194566, FN563000, FN563001, FN563002 und FN563003) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend für die ISR-23S rDNA-spezifischen-Oligonukleotidprimer Aph1-ISR-F und Aph1-23S rDNA-R durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	15	s	Denaturierung
	69 °C	10	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

Die Amplifizierung mit den ISR-23S rDNA-spezifischen-Oligonukleotidprimern Aph2-ISR-F und Aph1-23S rDNA-R erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	60	s	Denaturierung

	60 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Amplifizierung mit den ISR-23S rDNA-spezifischen-Oligonukleotidprimern Aph3-ISR-F und Aph3-ISR-23S rDNA-R erfolgte mit dem Temperaturprogramm:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	55 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### 3.6.11.2 Amplifizierung von *A. phocae* *sodA*-spezifischen Abschnitten

Zur Amplifizierung von *A. phocae*-spezifischen Abschnitten des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer *sodA*-ph-F mit der Sequenz 5`-CTC GAA GCC ATC AAA GAT TCC-3` und *sodA*-ph-R mit der Sequenz 5`-GAA AAC ATT AAG CTT GCC TGC CAA-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der *sodA*-Sequenz von *A. phocae* DSM 10002 (GenBank-Zugangsnummer AM946391) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	55 °C	30	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

### 3.6.11.3 Amplifizierung von *A. haemolyticum*-ISR bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten

Zur Amplifizierung von *A. haemolyticum*-spezifischen Abschnitten der ISR bzw. 23S rDNA kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Aha-ISR-F mit der Sequenz 5`-CCT AGC CTG GTG GTT GGG TAG-3` und Aha-23S rDNA-R mit der Sequenz 5`-GTG CGG GTA ACC AGA AAT AAC TCT G-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der ISR-23S rDNA-Sequenz von *A. haemolyticum* DSM 20595 (GenBank-Zugangsnummer EU194564) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	8	s	Denaturierung
	66 °C	10	s	Primeranlagerung
	72 °C	10	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### 3.6.11.4 Nachweis des *A. haemolyticum*-Phospholipase D-kodierenden Gens *pld*

Zur Amplifizierung des *A. haemolyticum*-spezifischen Phospholipase D-kodierenden Gens *pld* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Ah-F mit der Sequenz 5`-ATG TAC GAC GAT GAA GAC GCG-3` und Ah-R mit der Sequenz 5`-GCT TCC TTG TCG TTG AGA TTA TTA GC-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch verwendet. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der *pld*-Sequenz von *A. haemolyticum* DSM 20595 (GenBank-Zugangsnummer L16583) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung

	60 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### 3.6.11.5 Amplifizierung von *A. hippocoleae*-16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten

Zur Amplifizierung von *A. hippocoleae*-spezifischen Abschnitten der 16S rDNA bzw. ISR kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Ahi-16S rDNA-ISR-F mit der Sequenz 5`-CTT TCT AGG GAG CCT TTG GTC AC-3` und Ahi-ISR-R mit der Sequenz 5`-CCC TTA AAC ACT TAC AAC AAA ACA AAT TGA TT-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der 16S rDNA-ISR-Sequenz von *A. hippocoleae* DSM 15539 (GenBank-Zugangsnummer EU194568) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	60 °C	40	s	Primeranlagerung
	72 °C	45	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

### 3.6.11.6 Amplifizierung von *A. (T.) bernardiae*-16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten

Zur Amplifizierung von *A. (T.) bernardiae*-spezifischen Abschnitten der 16S rDNA bzw. ISR kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Abe-16S rDNA-ISR-F mit der Sequenz 5`-CTC CTT TCT AAG GAG CCT CAT-3` und Abe-ISR-R mit der Sequenz 5`-CAA ACA AAC AGC CTG AAA ACT TG-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der 16S rDNA-ISR-Sequenz von *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (GenBank-Zugangsnummer EU194562) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	57 °C	40	s	Primeranlagerung
	72 °C	45	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

### **3.6.11.7 Amplifizierung von *A. (T.) bialowiezense*-ISR-spezifischen Abschnitten**

Zur Amplifizierung von *A. (T.) bialowiezense*-spezifischen Abschnitten der ISR kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Abi-ISR-F mit der Sequenz 5`-CAC CGT TGT GGC CCT CGA-3` und Abi-ISR-R mit der Sequenz 5`-ACC ACC ACA AAC AGG CAG TAC G-3` mit dem unter 3.6.2b beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der ISR-Sequenz von *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 (GenBank-Zugangsnummer EU194569) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	10	s	Denaturierung
	59 °C	10	s	Primeranlagerung
	72 °C	15	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### **3.6.11.8 Amplifizierung von *A. (T.) bonasi*-ISR-spezifischen Abschnitten**

Zur Amplifizierung von *A. (T.) bonasi*-spezifischen Abschnitten der ISR kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Abo-ISR-F mit der Sequenz 5`-CCA CTG TTT CTT GCG CAT G-3` und Abo-ISR-R mit der Sequenz 5`-ACA CAC AAC AAC ACA AAC CAT GTC-3` mit dem unter 3.6.2b beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der

ISR-Sequenz von *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (GenBank-Zugangsnummer EU194570) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	54 °C	30	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### **3.6.11.9 Amplifizierung von *A. (T.) pyogenes*-ISR-spezifischen Abschnitten**

Zur Amplifizierung von *A. (T.) pyogenes*-spezifischen Abschnitten der ISR kamen die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer Apy-ISR-F mit der Sequenz 5`-GTT TTG CTT GTG ATC GTG GTG GTT ATG A-3` und Apy-ISR-R mit der Sequenz 5`-AAG CAG GCC CAC GCG CAG G-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch zur Anwendung. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der ISR-Sequenz von *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (GenBank-Zugangsnummer EU194563) wie beschrieben (3.6.8).

Das anschließend durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	64 °C	15	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

### **3.6.11.10 Nachweis des *A. (T.) pyogenes*-Pyolysin-kodierenden Gens *plo* und des *A. phocae*-Phocaelysin-kodierenden Gens *ppl***

Zur Amplifizierung des *A. (T.) pyogenes*-spezifischen Pyolysin-kodierenden Gens *plo* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer *plo*-F mit der

Sequenz 5`-CGA TCC CTC TGG TGT ACT TGC-3` und *plo*-R mit der Sequenz 5`-GCT TGA CAA AAA TCT GGC GTC C-3` und die von Ertas et al. (2005) beschriebenen Oligonukleotidprimer *plo*-F mit der Sequenz 5`-GGC CCG AAT GTC ACC GC-3` und *plo*-R mit der Sequenz 5`-AAC TCC GCC TCT AGC GC-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch verwendet. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der *plo*-Sequenz von *A. (T.) pyogenes* (GenBank-Zugangsnummer U84782) wie beschrieben (3.6.8).

Das für die *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer der vorliegenden Untersuchungen durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	60	s	Denaturierung
	62 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Für die von Ertas et al. (2005) beschriebenen *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	94 °C	60	s	Denaturierung
	55 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	60	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	5	min	Elongation

Zur Amplifizierung des mit *A. (T.) pyogenes-plo*-kreuzreagierenden Gens *phl* von *A. phocae* wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer nach Absenkung der Primeranlagerungstemperatur auf 45 °C verwendet.

Das verwendete Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	94 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	70	s	Denaturierung

	45 °C	70	s	Primeranlagerung
	72 °C	70	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

Die Sequenzierung der Amplikons und weitere Sequenzanalysen erfolgten wie unter 3.6.5 beschrieben.

Zur Amplifizierung des Phocaelysin-kodierenden Gens *phl* wurden die *A. phocae-phl*-spezifischen Oligonukleotidprimer *phl*-F 5`-CTT AGT TGA CGG AAA GAA CCG AAA GAC-3` und *phl*-R 5`-TCG AGT TCA CCA TGG ATT CGT CGT AAG-3` und *phl2*-F 5`-TAA TCT TCG TGG CGA CTT GTC CGT CA-3` mit dem unter 3.6.2a beschriebenen Reaktionsgemisch verwendet. Die Oligonukleotidprimerauswahl erfolgte mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen *phl*-Sequenzen von *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 (GenBank-Zugangsnummer FN999907 und FN999908) wie beschrieben (3.6.8).

Das für die *A. phocae-phl*-spezifischen Oligonukleotidprimer der vorliegenden Untersuchung durchgeführte Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

1 Zyklus	95 °C	10	min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30	s	Denaturierung
	62 °C	60	s	Primeranlagerung
	72 °C	30	s	Elongation
1 Zyklus	72 °C	7	min	Elongation

### 3.7 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic Release 7.0 in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, unter der Leitung von Dr. Klaus Failing.

Zum Vergleich der drei *A. phocae*-ISR-Gruppen im Bezug auf ausgewählte phänotypische Eigenschaften wurden zweidimensionale Häufigkeitstabellen gebildet. Wegen kleiner Erwartungswerte wurde der exakte Fisher-Test mit Hilfe des Programms BMDP4F durchgeführt.

Zur Bewertung statistischer Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden noch als statistisch signifikant angesehen.

Für die Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p \leq 0,001:$	hoch signifikant
$p \leq 0,01:$	signifikant
$p \leq 0,05:$	schwach signifikant
$p \geq 0,05:$	nicht signifikant

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller und molekularer Verfahren

Die in den vorliegenden Studien untersuchten 89 Kulturen der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* konnten aufgrund der im weiteren aufgezeigten phänotypischen und genotypischen Eigenschaften als *A. phocae* (n=43), *A. haemolyticum* (n=7), *A. pluranimalium* (n=1), *A. (T.) bialowiezense* (n=3), *A. (T.) bonasi* (n=7) und *A. (T.) pyogenes* (n=28) identifiziert und weitergehend charakterisiert werden. Zum Vergleich dienten die 11 unter 3.1 genannten Referenzkulturen.

#### 4.1.1 Phänotypische Eigenschaften der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen

##### 4.1.1.1 Nachweis der Hämolyse und von CAMP-ähnlichen Reaktionen

Die Unterscheidung der Hämolyseformen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen erfolgte nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten (3.2) und nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode. Nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten war eine relativ breite Hämolysezone für *A. phocae*, *A. pluranimalium* und *A. (T.) pyogenes* sowie eine schmale Hämolysezone für *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* nachweisbar. Nach Anzüchtung auf Kaninchenblutagarplatten zeigten *A. haemolyticum*, *A. pluranimalium* und *A. hippocoleae* eine verstärkte Hämolyse (**Abb. 2**), wobei die Hämolyseverstärkung für *A. pluranimalium* und *A. hippocoleae* weniger ausgeprägt war.

Synergistische CAMP-ähnliche Reaktionen mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysin waren für *A. hippocoleae*, *A. pluranimalium*, *A. (T.) abortisuis* und *A. (T.) pyogenes*, mit *S. agalactiae* für *A. phocae* und *A. haemolyticum* sowie mit *R. equi* für *A. phocae*, *A. haemolyticum*, *A. pluranimalium*, *A. (T.) abortisuis* und *A. (T.) pyogenes* nachweisbar. Eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins war eine charakteristische Eigenschaft von *A. phocae* und *A. haemolyticum*. *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* zeigten weder synergistische noch antagonistische Hämolysereaktionen.

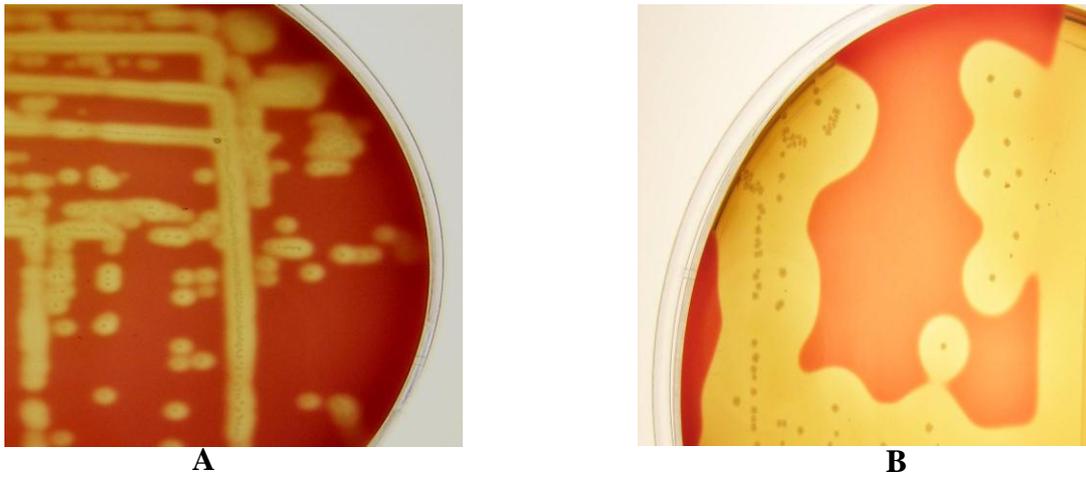
Innerhalb der vorliegenden Untersuchungen konnte eine neue synergistische Hämolysereaktion zwischen *A. phocae* bzw. *A. haemolyticum* und einer noch zu identifizierenden Spezies festgestellt werden. Nach 16S rDNA-Sequenzierung (3.6.6) und Sequenzanalysen konnte die Spezies *Psychrobacter phenylpyruvicus* (EU915471) identifiziert werden (**Abb. 3**). Die verschiedenen Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die synergistischen und antagonistischen Hämolysereaktionen sind in **Tab. 9** zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 9:** Hämolyseformen, bzw. synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen der Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

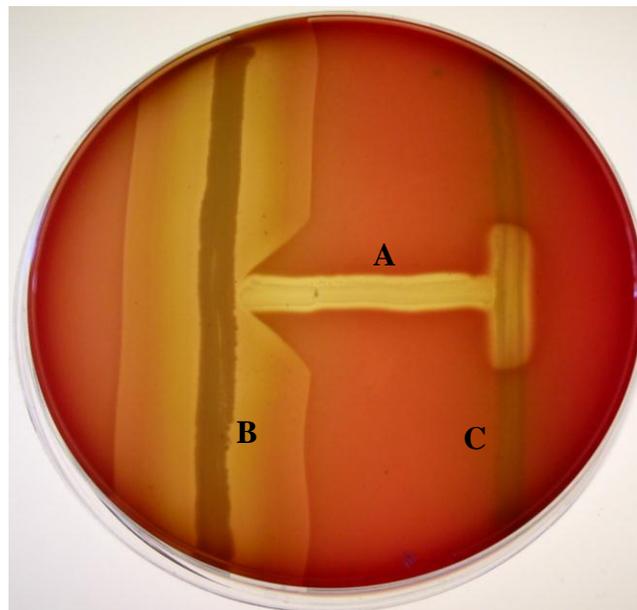
Arcanobacterium- bzw. Trueperella- Referenzkulturen	Hämolyse* auf		Synergistische Hämolyse mit				Um- gekehrter CAMP- Test
	Schaf- BAP	Kaninchen- BAP	Staphylo- kokken-β- Hämolsin	<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	<i>Rhodococcus</i> <i>equi</i>	<i>Psychrobacter</i> <i>phenylpyruvicus</i>	
<i>A. phocae</i> DSM 10002	+(+)	+(+)	-**	+	+	+	+
<i>A. phocae</i> DSM 10003	+(+)	+(+)	-	+	+	+	+
<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595	(+)	++	-	+	+	+	+
<i>A. pluranimalium</i> DSM 13483	+	+(+)	+	-	+	-	-
<i>A. hippocoleae</i> DSM 15539	(+)	+	+	-	-	-	-
<i>A. (T.) abortusis</i> DSM 19515	(+)	(+)	+	-	+	-	-
<i>A. (T.) bernardiae</i> DSM 9152	(+)	(+)	-	-	-	-	-
<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	(+)	(+)	-	-	-	-	-
<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163	(+)	(+)	-	-	-	-	-
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20594	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	+	+	+	-	+	-	-

\*= (+), +, +(+) , ++ Grad der Hämolyse

\*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktionen



**Abb. 2:** Hämolysezone von *A. haemolyticum* DSM 20595 auf Schafblut- (A) bzw. Kaninchenblutagarplatten (B).



**Abb. 3:** Umgekehrte CAMP-ähnliche Reaktion von *A. phocae* (A, horizontal) im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins (B, vertikal) und synergistische Hämolysereaktion von *A. phocae* mit *P. phenylpyruvicus* (C, vertikal)

#### 4.1.1.2 Identifizierung mit dem „API-Coryne-Testsystem“

Mit Hilfe des „API-Coryne-Testsystems“ konnten sowohl enzymatische als auch kohlenhydratabbauende Reaktionen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des „API-Coryne-Testsystems“ sind in **Tab. 10a,b** zusammenfassend dargestellt.

#### 4.1.1.3 Weitere phänotypische Eigenschaften

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte nach der unter 3.5.3 beschriebenen Methode. Während die beiden *A. phocae*-Referenzkulturen und *A. pluranimalium* DSM 13483 eine positive Reaktion mit einer deutlichen Bläschenbildung aufwiesen, zeigten die anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen keine vergleichbare Reaktion.

Der nach 3.5.4 beschriebene DNase-Test-Agar zeigte eine positive Reaktion für *A. phocae* DSM 10002, *A. phocae* DSM 10003, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. hipposcoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortusuis* DSM 19515, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152, *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630. *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 zeigten keine vergleichbare Reaktion (**Abb. 4, Tab. 10b**).

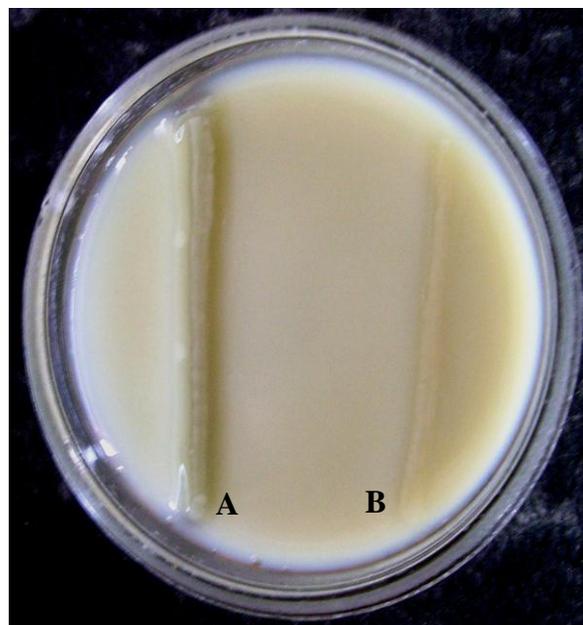


**Abb. 4:** Typische positive Reaktion von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 auf dem DNase-Test-Agar (A); keine vergleichbare Reaktion von *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (B).

Im weiteren erwiesen sich alle *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen als negativ für das Enzym Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test (3.5.6). Der Nachweis der Enzyme  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase und der Enzyme Alkalische Phosphatase, Pyrrolidonyl-Arylamidase und  $\alpha$ -Mannosidase erfolgte nach der unter 3.5.7 und 3.5.8 beschriebenen Methode. Diese Ergebnisse der weiteren biochemischen Eigenschaften der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen sind ebenso in **Tab.10a,b** vergleichend dargestellt.

#### 4.1.1.4 Wachstum auf Löffler-Medium

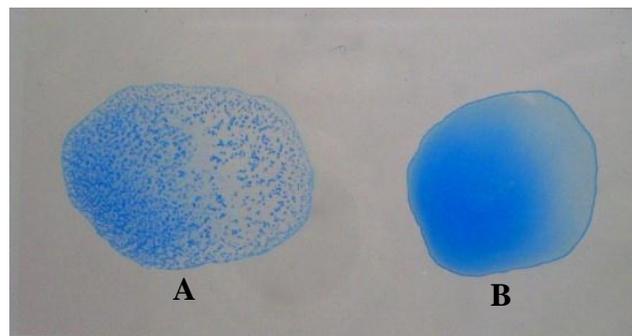
*A. (T.) pyogenes* zeigte auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9) eine deutliche Serolyse. Diese war aufgrund einer grabenförmigen Verflüssigung des Nährmediums und durch Aufhellung in der Umgebung des Impfstriches nachweisbar. Alle weiteren *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen zeigten keine vergleichbare Reaktion (**Abb. 5, Tab. 10b**).



**Abb. 5:** Typische Serolysereaktion um den Impfstrich von *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (A); keine Veränderungen um den Impfstrich von *A. phocae* DSM 10002 (B).

#### 4.1.1.5 Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe-G-spezifischem Antiserum

Eine Untersuchung der Referenzkulturen mit dem kommerziellen Streptokokken-Identifizierungstest (3.5.10) ermöglichte den Nachweis der Kreuzreaktion von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum. Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wiesen keine entsprechende Kreuzreaktion auf. In **Abb. 6** ist eine typische Agglutinationsreaktion mit Gruppe G-spezifischem Antiserum bzw. eine negative Reaktion dargestellt (**Tab. 10b**).



**Abb. 6:** Agglutinationsreaktion von Enzymextrakten von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 mit G-Streptokokken-Antiserum-spezifischem Latex-Reagenz G (A); negative Reaktion von *A. haemolyticum* DSM 20595 (B).

**Tab. 10a:** Ergebnisse des „API-Coryne-Testsystems“ und weitere phänotypische Eigenschaften der Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

<i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> -Referenzkulturen	Nitration	Pyrazinamidase	Pyrrolidonyl Arylamidase	Alkalische Phosphatase	β-Glucuronidase	β-Galactosidase	α-Glucosidase	N-Acetyl-β-Glucosaminidase	Äsculin(β-Glucosidase)	Urease	Gelatine	Glucose	Ribose
<i>A. phocae</i> DSM 10002	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup> ; (+) <sup>3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. phocae</i> DSM 10003	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup> ; + <sup>3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. pluranimaleum</i> DSM 13483	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup> ; (+) <sup>2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. hippocoleae</i> DSM 15539	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
<i>A. (T.) abortusis</i> DSM 19515	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>
<i>A. (T.) bernardiae</i> DSM 9152	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup> ; + <sup>3</sup>	+ <sup>1</sup> ; - <sup>3</sup>	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20594	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup> ; - <sup>3</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1,2</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>

+ = positive Reaktion; (+) = schwache Reaktion; - = negative Reaktion; 1 = „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2);  
2 = 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate (siehe 3.5.7); 3 = Tablettentest (siehe 3.5.8)

**Tab. 10b:** Ergebnisse des „API-Coryne-Testsystems“ und weitere phänotypische Eigenschaften der Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

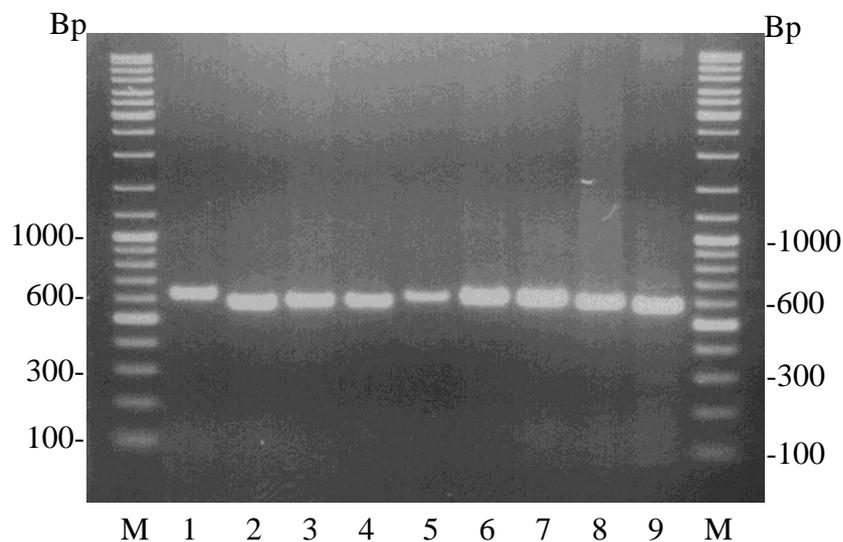
<i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> -Referenzkulturen	Xylose	Mannitol	Maltose	Lactose	Saccharose	Glycogen	Katalase	DNase	Hyaluronidase	Voges-Proskauer	$\alpha$ -Mannosidase	Serolyse auf Löffler-Agar	Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum
<i>A. phocae</i> DSM 10002	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+	+	-	-	+ <sup>3</sup>	-	-
<i>A. phocae</i> DSM 10003	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+	+	-	-	+ <sup>3</sup>	-	-
<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	-	+	-	-	+ <sup>3</sup>	-	-
<i>A. pluranimalium</i> DSM 13483	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+	+	-	-	+ <sup>3</sup>	-	-
<i>A. hippocoleae</i> DSM 15539	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	-	+	-	-	- <sup>3</sup>	-	-
<i>A. (T.) abortusis</i> DSM 19515	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-	+	-	-	- <sup>3</sup>	-	-
<i>A. (T.) bernardiae</i> DSM 9152	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-	+	-	-	- <sup>3</sup>	-	-
<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	- <sup>3</sup>	-	-
<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	- <sup>3</sup>	-	-
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20594	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	-	+	-	-	- <sup>3</sup>	+	+
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-	+	-	-	- <sup>3</sup>	+	+

+ = positive Reaktion; (+) = schwache Reaktion; - = negative Reaktion; 1 = „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2); 3 = Tablettentest (siehe 3.5.8)

## 4.1.2 Amplifizierung und Sequenzierung von unterschiedlichen Genomabschnitten der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen

### 4.1.2.1 Amplifizierung und Sequenzierung der ISR

Die Amplifizierung der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen erfolgte nach der unter 3.6.7 beschriebenen Methode. Die ISR-Amplikons der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wiesen unterschiedliche Größen auf (**Abb. 7**). Die Größe der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ist in **Tab. 11** dargestellt. Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern EU194562, EU194563, EU194564, EU194565, EU194566, EU194567, EU194568, EU194569, EU194570 abgelegt. Ein Sequenzvergleich der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ist in **Abb. 8** dargestellt.



**Abb. 7:** Amplikons der ISR von *A. phocae* DSM 10002 (1), *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 (2), *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (3), *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 (4), *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (5), *A. haemolyticum* DSM 20595 (6), *A. hippocoleae* DSM 15539 (7), *A. pluranimalium* DSM 13483 (8) und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (9) unter Verwendung der ISR-Oligonukleotidprimer c und b; M= GeneRuler™ DNA Ladder, Size Standard 100-10000 bp-Ladder, Fermentas.

**Tab. 11:** Größe der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen

<i>Arcanobacterium</i> - bzw. <i>Trueperella</i> -Referenzkulturen	Größe der Amplifikate (Bp) <sup>1</sup>	Größe der ISR (Bp)
<i>A. phocae</i> DSM 10002	620	380
<i>A. phocae</i> DSM 10003	620	380
<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595	600	359
<i>A. pluranimalium</i> DSM 13483	580	344
<i>A. hippocoleae</i> DSM 15539	600	369
<i>A. (T.) abortisuis</i> DSM 19515	580	333
<i>A. (T.) bernardiae</i> DSM 9152	580	340
<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	580	338
<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163	600	363
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	580	333

<sup>1</sup>= Die mit den Oligonukleotidprimern c und b erhaltenen Amplifikate beinhalteten Teilbereiche des 16S rRNA-Gens und des 23S rRNA-Gens

**Zu Abb. 8**

```

[
A. phocae DSM 10002      1
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630
CTAAGGAGCCTGCTACATGCCCGTGTTTAAAGT-TTTGTTTTTTTGTGCGGTGTTGGCTGCTG
CTAAGGAGCCTGCTACATGCCCGTGTTTAAAGT-TTTGTTTTTTTGTGCGGTGTTGGCTGCTG
CTAAGGAGCC-----TCATG-----TGTGCCGTGT-ACTGTT-TGTG-----TTG
CTAAGGAGCC-----TCATG-----TG--CCTGCG-ATCATG-GTGG-----TTG
CTAGGGAGCCAC-CGT-T-----GTGGC--CCTCGACCTTGTGT-TGGG--GTT-
CTAGGGAGCCAC-TGT-TTCTTGGCGATGATGCGTTTGTGTCTTGTGCTGTGGG-TGTCA
CTAAGGAGCTCAGGTAC---CAGCCGTT---AT-TGTGTTTATTGT---TGTC--TGCTG
CTAGGGAGCC-TTTG-CTCACTGTTTTT---TGTCTA---GTTG---GTGGCTGGCC
CTAGGGAGC-----CCTGTTTTT---GT-GGTGCCACTGTTGTGTGG-TGCT-
CTAAGGAGCT-----CCTGT-----TTTGTCTGTG-ATCGTG-GTGG---TTA
]

[
A. phocae DSM 10002      61
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630
TCCCTGTTTTGGGTGTGGTGTGGTGGTTTTAGTGGAAAATGGTTGAGATGAGAAGT
TCCCTGTTTTGGGTGTGGTGTGGTGGTTTTAGTGGAAAATGGTTGAGATGAGAAGT
TGGG---TGTG---TCTGTGCGGTTTTAGTGGTTCGCAAT---GTGGGGGGC
TGGG---TGTG---T-TGTGGGTTTTAGTGGTTCGCAAT---GTGATTCGC
---TGT-GTTG-TGGT---GTTTTAGTGG--GACTGC---ATATTGGC
TCAGGCGTGTGTCTGCTGGTGGTGGTGGTTTTAGTGGAT-GCAAT---GTGATTCGC
---CCTAGCCTGCTG-STTGG--GTAGTGGTTTTAGTGGTTTATCGT---ATGAGG-GT
T---TGCTTTT-TGTG-TGGTGGTTTGGT---TTTCTGTGGGC---GTCATTGTTTGTAGT
---TGCTTT-----TTG-TTTGG-GGTTTTCTGTGG---GTGTTTGTGGGAGT
TGAG---TGT-----TGTG-GGGTTTTAGTGGTTCGCAAC---ATTGG-AGT
]

[
A. phocae DSM 10002      121
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAACTACTCCTTGTGCTGCCTGTGA-TGGGCTGATG-A
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAACTACTCCTTGTGCTGCCTGTGA-TGGGCTGATG-A
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAAC-CCTG-TGCTGCCGCGC-CGGGCTCT--G
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAACAGGCCCT-GGCCACCATGCGCAAATTTTCAGG
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAACAC-CTGT-TTCTGCCGCTGTTGCTGCTGCC-TG
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAACAC-CTGG-TGCTTCATGTCGAA--TGACATG
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGATAATACATCCTGTGCTGCCTGTGC-TTGGCTGTTGGC
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAAC--CCTGCTTGA--TGCTTGGGCTGATG-G
TGGCATGCTGTTGGGGTTCGGGATAATGGTTCCGTGCTGCCTGTGT-CTGGAT-ATC-G
TGGCATGCTGTTGGGGTGTGGGGTAAAC--GCCTT-GGCTGCCTGCCGCTGGGCTGCG--
]

```

```

[
A. phocae DSM 10002
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630

340]
CTGTTTGGCTTGT-TGCTTTGCTTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
CTGTTTGGCTTGT-TGCTTTGCTTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
TTGTG-----GG---GTTTGTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
CTGTTTGGTTTGG---GTTTGTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
TT-TGTGGT--G---GTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
GTTTGTG-TTG-----TTGTGTGTGGTGGTGGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
ACGGTTGTTGCAG-CGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
ATGCTTTTTTGGTGTGTGGTGTGGTGGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
CTGTT-TGTGGT--GTTTGGTGTGGTGTGGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA
TTGTGTGGT-GG---GTTTGTGTGGTGTGGTGGTGGTTGAGAATTGTATAGTGA

[
A. phocae DSM 10002
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630

341]
CGCGAGCATCTTT-GGTTTT-----TTGTAAGTGTTCAA-GAGCGTTCCG
CGCGAGCATCTTT-GGTTTT-----TTGTAAGTGTTCAA-GAGCGTTCCG
TGCGAGCATCTTTGGTTTT-----T-GTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG
TGCGAGCATCTTTGGTTTT-----T-GTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG
TGCGAGCATCTTTGGTTTT-----T-GTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG
TGCGAGCATCTTTGGTTTT-----T-GTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG
CGCGAGCATCTTTGGTTTT-----TTGTAAGTGTTCAA-GAGCGTTCCG
CGCGAGCATCTTTGGTTTTAATCAATTTGTTTTTTGTTGTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG
CGCGAGCATCTTT-GGTTTT-----TTGTAAGTGTCTAA-GAGCGTTCCG
TGCGAGCATCTTTGGTTTT-----T-GTAAGTGTCTAA-GGCGTTCCG

[
A. phocae DSM 10002
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630

361]
TGGATGCCTTGGCATAACGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGCATAACGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGTACACGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGTACACGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGCAGCTGGGCGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGTACGCGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGCAGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGCAGCAGCTGGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGCAGTAGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA
TGGATGCCTTGGTACACGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGA

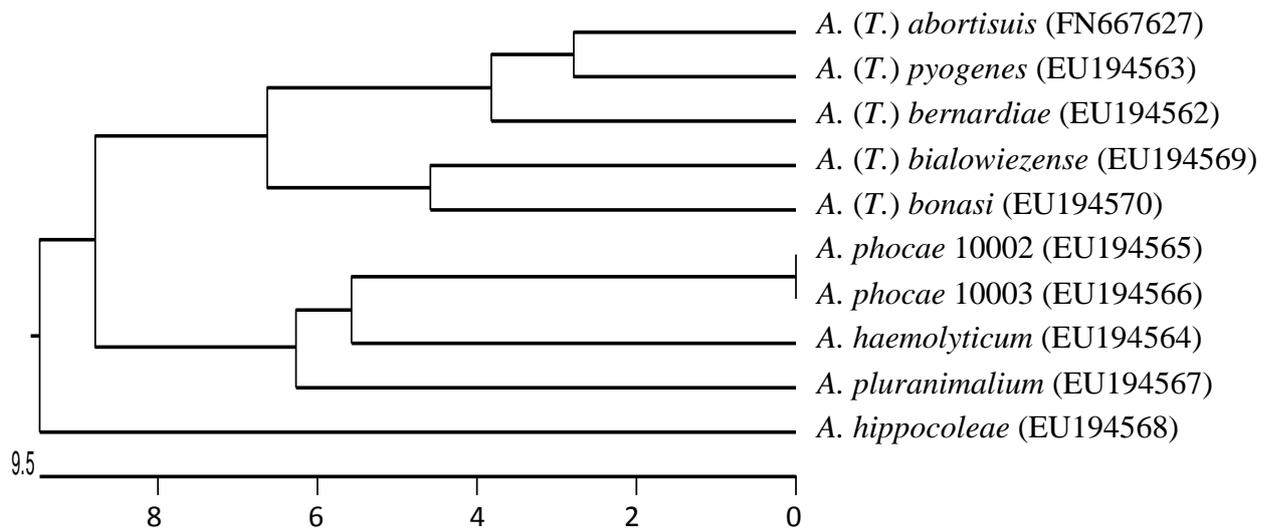
[
A. phocae DSM 10002
A. phocae DSM 10003
A. (T.) abortisuis DSM 19515
A. (T.) bernardiae DSM 9152
A. (T.) bialowiezense DSM 17162
A. (T.) bonasi DSM 17163
A. haemolyticum DSM 20595
A. hippocoleae DSM 15539
A. pluranimalium DSM 13483
A. (T.) pyogenes DSM 20630

401]
GTTGGCAAACGAGCTGTGATCCGCGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCAAACGAGCTGTGATCCGCGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCATAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCATAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCATAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCATAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCAAACGAGCTGTGATCCGCGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCAAACGAGCTGTGATCCGCGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCAAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG
GTTGGCATAACGAGCTGTGATCCGAGGGTGTCCGAATGGGGG

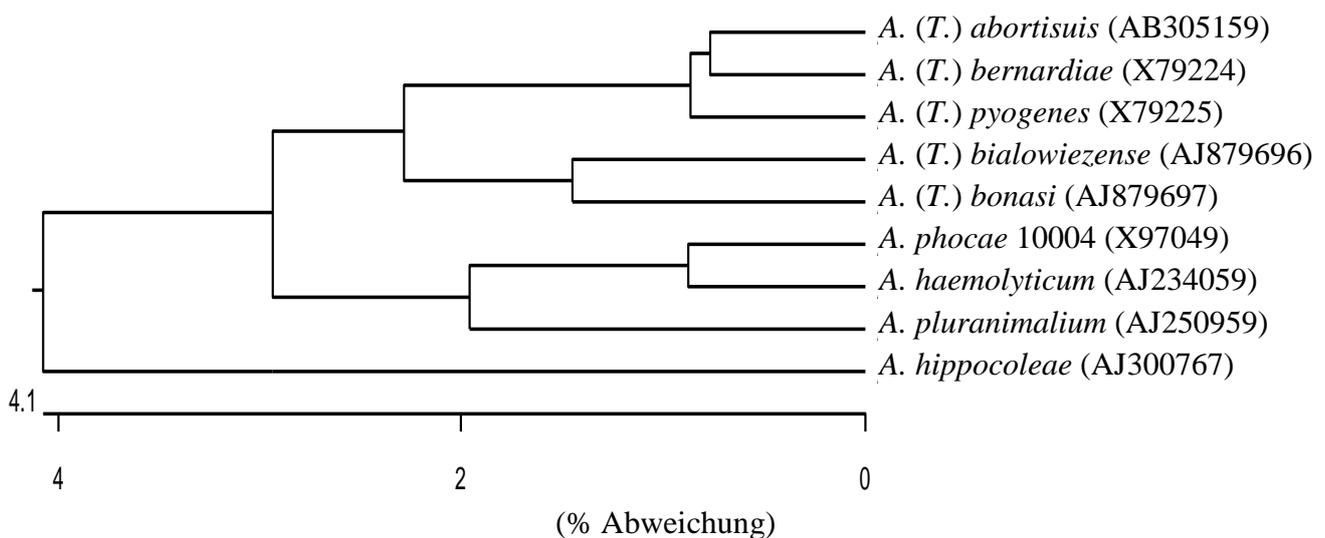
```

**Abb. 8:** Sequenzvergleich der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen. Die Unterschiede sind markiert.

Eine Dendrogrammanalyse der ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen und eine vergleichsweise durchgeführte Dendrogrammanalyse der 16S rDNA mit Sequenzangaben von Referenzkulturen der GenBank sind in **Abb. 9** und **Abb. 10** dargestellt.



**Abb. 9:** Dendrogrammanalyse der ISR von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*. Die Skala gibt die Basenunterschiede in % an (% Abweichung)

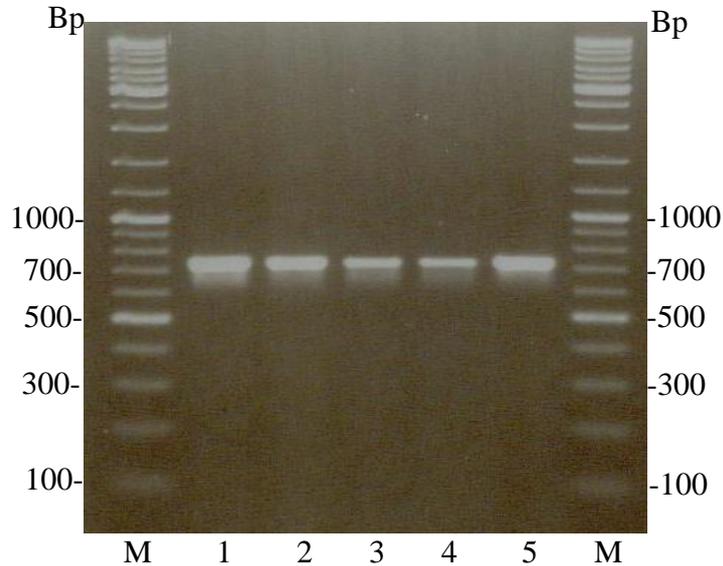


**Abb. 10:** Dendrogrammanalyse der 16S rDNA von neun Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* mit Sequenzangaben der GenBank

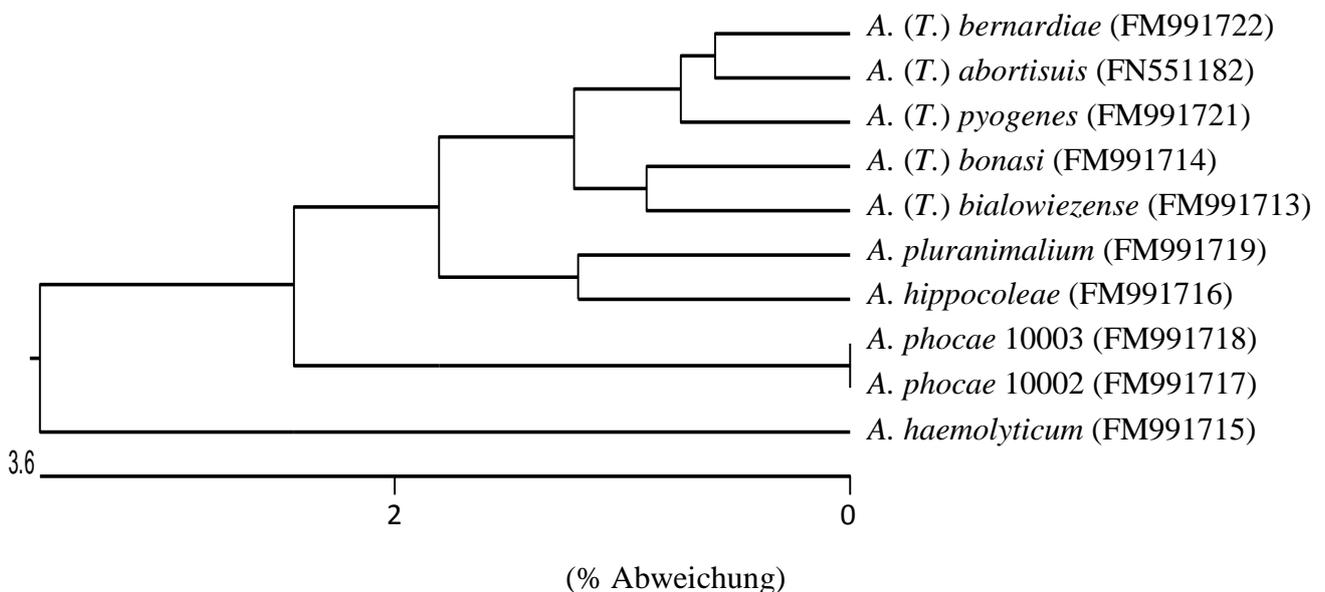
#### 4.1.2.2 Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens

Die Amplifizierung der 23S rDNA nach der unter 3.6.8 beschriebenen Methode ergab für alle *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 730 Bp (724 Bp erwartete Größe) (**Abb. 11**). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der 23S rDNA der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern FM991713, FM991714, FM991715,

FM991716, FM991717, FM991718, FM991719, FM991721, FM991722 und FN551182 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 23S rDNA der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ist in **Abb. 12** dargestellt.



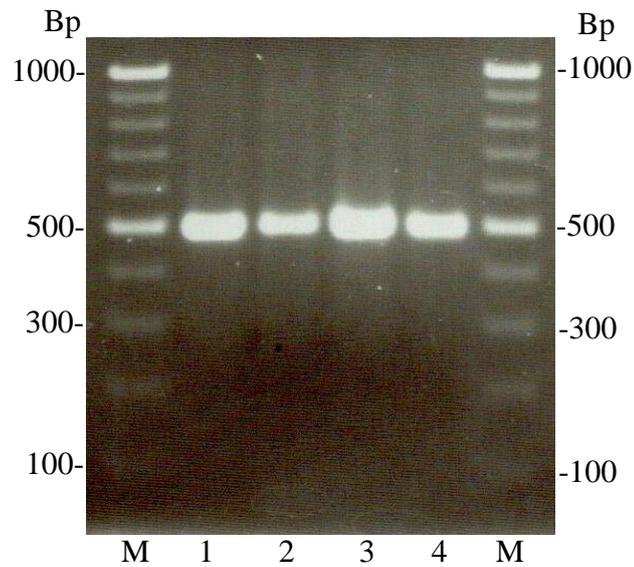
**Abb. 11:** Amplikons (ca. 730 Bp) der 23S rDNA von *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 (1), *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (2), *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (3), *A. hippocoleae* DSM 15539 (4) und *A. pluranimalium* DSM 13483 (5) unter Verwendung der universellen 23S rDNA-Oligonukleotidprimer 23S-1 und 23S-2a (siehe 3.6.8). M siehe Abb. 7.



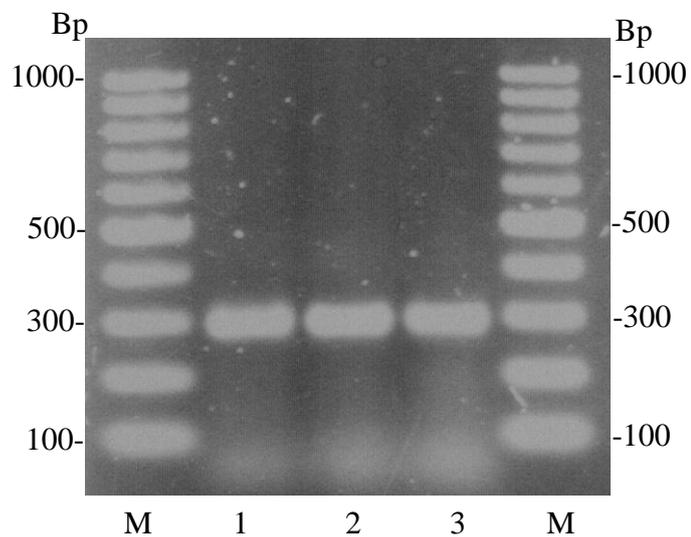
**Abb. 12:** Dendrogrammanalyse der 23S rDNA von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.2.3 Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *sodA*

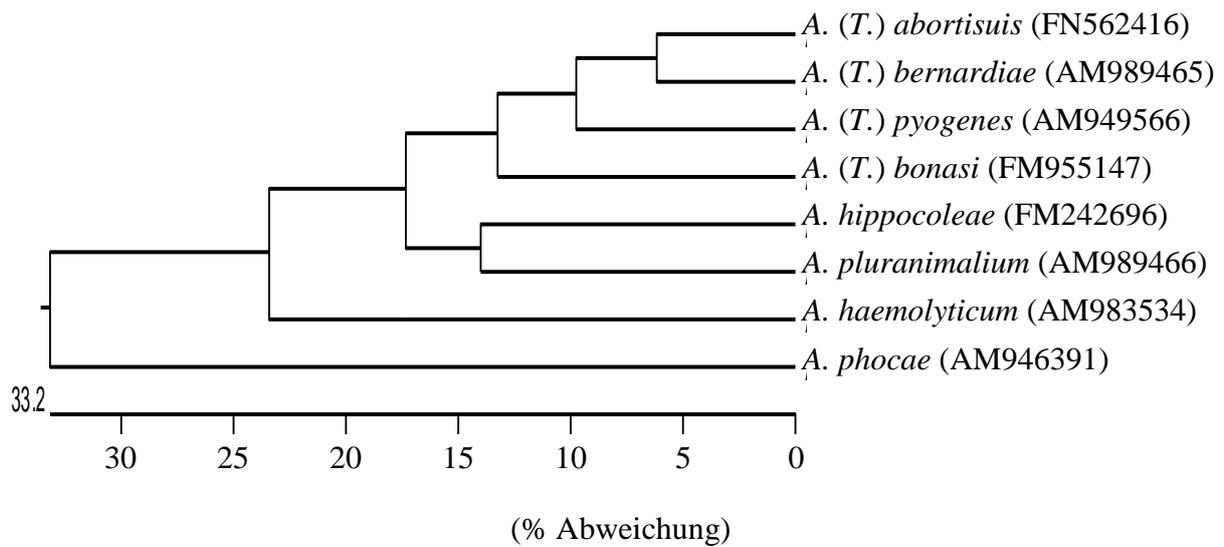
Zur Amplifizierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* von *A. phocae* DSM 10002, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 wurden die von Zolg und Philippi-Schulz (1994) beschriebenen universellen Oligonukleotidprimer verwendet. Die *sodA*-Amplikons ergaben eine Größe von ca. 490 Bp (489 Bp erwartete Größe) für *A. phocae* DSM 10002, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (**Abb. 13**). Das *sodA*-Gen von *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515, *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 konnte mit diesen Oligonukleotidprimern nicht amplifiziert werden. Nach der Sequenzierung des *sodA*-Gens der oben genannten *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen konnte ein zweites universelles Oligonukleotidprimerpaar entwickelt werden. Mit diesem zweiten universellen Oligonukleotidprimerpaar war das *sodA*-Gen von *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 amplifizierbar, nicht dagegen das *sodA*-Gen von *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162. Die *sodA*-Amplikons ergaben eine Größe von ca. 300 Bp (285 Bp erwartete Größe) für *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (**Abb. 14**). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen des *sodA*-Gens der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern AM946391, AM989465, AM983534, AM989466, AM949566, FM955147, FM242696 und FN562416 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der *sodA*-Gene der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ist in **Abb. 15** dargestellt.



**Abb. 13:** Amplikons (ca. 490 Bp) von *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (1), *A. haemolyticum* DSM 20595 (2), *A. pluranimalium* DSM 13483 (3) und *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (4) unter Verwendung der universellen *sodA*-Oligonukleotidprimer Z205 und Z212 (siehe 3.6.9). M= GeneRuler™ DNA Ladder, Size Standard 100-1000 bp-Ladder, Fermentas.



**Abb. 14:** Amplikons (ca. 300 Bp) von *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (1), *A. hippocoleae* DSM 15539 (2) und *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 (3), unter Verwendung der universellen *sodA*-Oligonukleotidprimer *sodA1-F* und *sodA1-R* (siehe 3.6.9). M siehe Abb. 13.

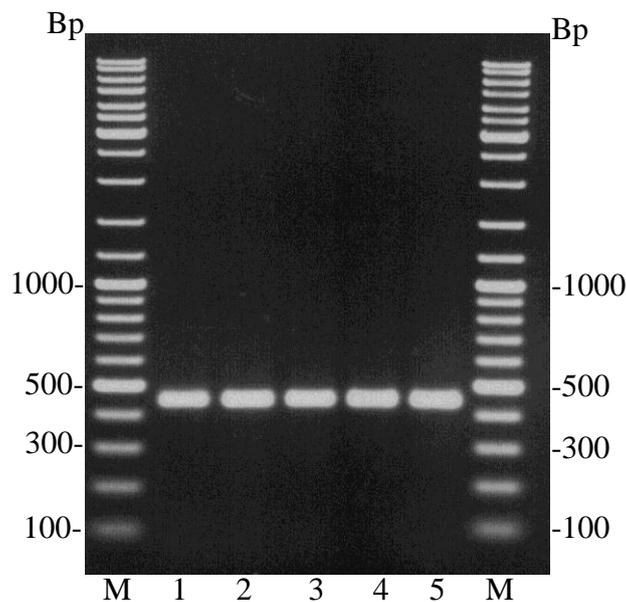


**Abb. 15:** Dendrogrammanalyse des Gens *sodA* von acht Referenzkulturen von acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

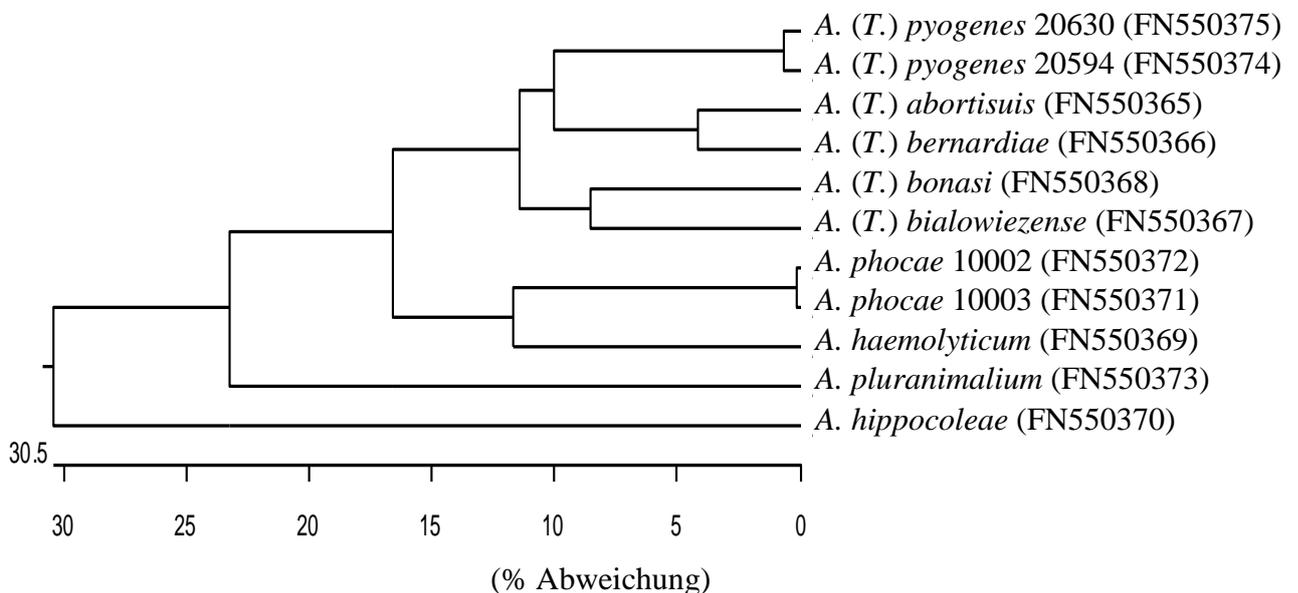
#### 4.1.2.4 Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *rpoB*

Die Amplifizierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase kodierenden Gens *rpoB* nach der unter 3.6.10 beschriebenen Methode ergab für alle *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 450 Bp (446 Bp erwartete Größe) (**Abb. 16**).

Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen des *rpoB*-Gens der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern FN550365, FN550366, FN550367, FN550368, FN550369, FN550370, FN550371, FN550372, FN550373, FN550374 und FN550375 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse von *rpoB* der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ist in **Abb. 17** dargestellt.



**Abb. 16:** Amplikons (ca. 450 Bp) von *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 (1), *A. haemolyticum* DSM 20595 (2), *A. hippocoleae* DSM 15539 (3), *A. phocae* DSM 10003 (4) und *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 (5) unter Verwendung der universellen *rpoB*-Oligonukleotidprimer C2700-F und C3130-R (siehe 3.6.10). M siehe Abb. 7.



**Abb. 17:** Dendrogrammanalyse des Gens *rpoB* von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

### 4.1.3 Untersuchung von *A. phocae*

#### 4.1.3.1 Phänotypische Eigenschaften

Die im weiteren untersuchten 43 *A. phocae*-Kulturen (3.1) zeigten auf Schafblutagarplatten unterschiedliche Hämolysereaktionen. Für 13 *A. phocae*-Kulturen und für die *A. phocae*-Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 (4.1.1.1) waren eine relativ breite Hämolysezone (in **Tab. 12** mit ++ und +++ bezeichnet) und für 30 *A. phocae*-Kulturen eine schmale Hämolysezone (in **Tab. 12** mit + und ++ bezeichnet) nachweisbar. Die *A. phocae*-Kulturen zeigten eine vergleichbare Hämolysereaktion auf Kaninchenblutagarplatten (4.1.1.1) (**Tab. 12**).

Der Nachweis synergistischer bzw. antagonistischer, CAMP-ähnlicher Hämolysereaktionen der *A. phocae*-Kulturen wurde nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Diese waren vergleichbar mit den CAMP-ähnlichen Reaktionen der *A. phocae*-Referenzkulturen (4.1.1.1).

Synergistische Hämolysereaktionen von *A. phocae* waren mit *S. agalactiae*, *R. equi* (**Abb. 18**) und mit *P. phenylpyruvicus* nachweisbar. Alle 43 *A. phocae*-Kulturen zeigten des weiteren eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins (**Abb. 18**). Die verschiedenen Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die synergistischen oder antagonistischen Hämolysereaktionen der *A. phocae*-Kulturen sind in **Tab. 12** zusammenfassend dargestellt.



**A**



**B**



**C**

**Abb. 18:** Typische synergistische Hämolysereaktion von *A. phocae* (horizontal) mit *S. agalactiae* (A, vertikal) und *R. equi* (B, vertikal); umgekehrte CAMP-Reaktion von *A. phocae* im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolytins (C, vertikal).

**Tab. 12:** Hämolyseformen, bzw. synergistische oder antagonistische Hämolysereaktionen der *A. phocae*-Kulturen und der *A. phocae*-Referenzkulturen

		<i>A. phocae</i> n=43	<i>A. phocae</i> DSM 10002	<i>A. phocae</i> DSM 10003
<b>Hämolyse auf</b>	<b>Schaf-BAP</b>	+(+)*(5**), ++(8) +(14), +(16)	+(+)	+(+)
	<b>Kaninchen-BAP</b>	+(+)(5), ++(8) +(2), +(28)	+(+)	+(+)
<b>Synergistische Hämolyse mit</b>	<b>Staphylokokken β-Hämolysin</b>	-(43)***	-	-
	<i>S. agalactiae</i>	+(43)	+	+
	<i>R. equi</i>	+(43)	+	+
	<i>P. phenylpyruvicus</i>	+(43)	+	+
<b>Umgekehrter CAMP-Test</b>		+(43)	+	+

n= Zahl der Kulturen, \*= (+), +, +(+) , ++ Grad der Hämolyse; \*\*= Zahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften, \*\*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktion

Die biochemischen Eigenschaften der *A. phocae*-Kulturen, ermittelt mit dem „API-Coryne-Testsystem“ (3.5.2), sind in **Tab. 13** zusammenfassend dargestellt. Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte nach der unter 3.5.3 beschriebenen Methode. Alle 43 untersuchten *A. phocae*-Kulturen wiesen eine positive Reaktion mit einer deutlichen Bläschenbildung auf. Von 43 untersuchten *A. phocae*-Kulturen wiesen auf DNase-Test-Agar (3.5.4) 42 Kulturen eine positive Reaktion auf. Alle 43 *A. phocae*-Kulturen erwiesen sich ferner für das Enzym Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test als negativ (3.5.6). Die Ergebnisse für die Enzyme β-Galactosidase, β-Glucuronidase und N-Acetyl-β-Glucosaminidase (3.5.7) und für die Enzyme Alkalische Phosphatase, Pyrrolidonyl-Arylamidase und α-Mannosidase (3.5.8) der *A. phocae*-Kulturen sind in **Tab. 13** zusammenfassend dargestellt. Alle 43 *A. phocae*-Kulturen zeigten keine Serolyse auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9) und wiesen keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf (3.5.10) (**Tab. 13**).

**Tab. 13:** Phänotypische Eigenschaften der 43 *A. phocae*-Kulturen und der *A. phocae*-Referenzkulturen

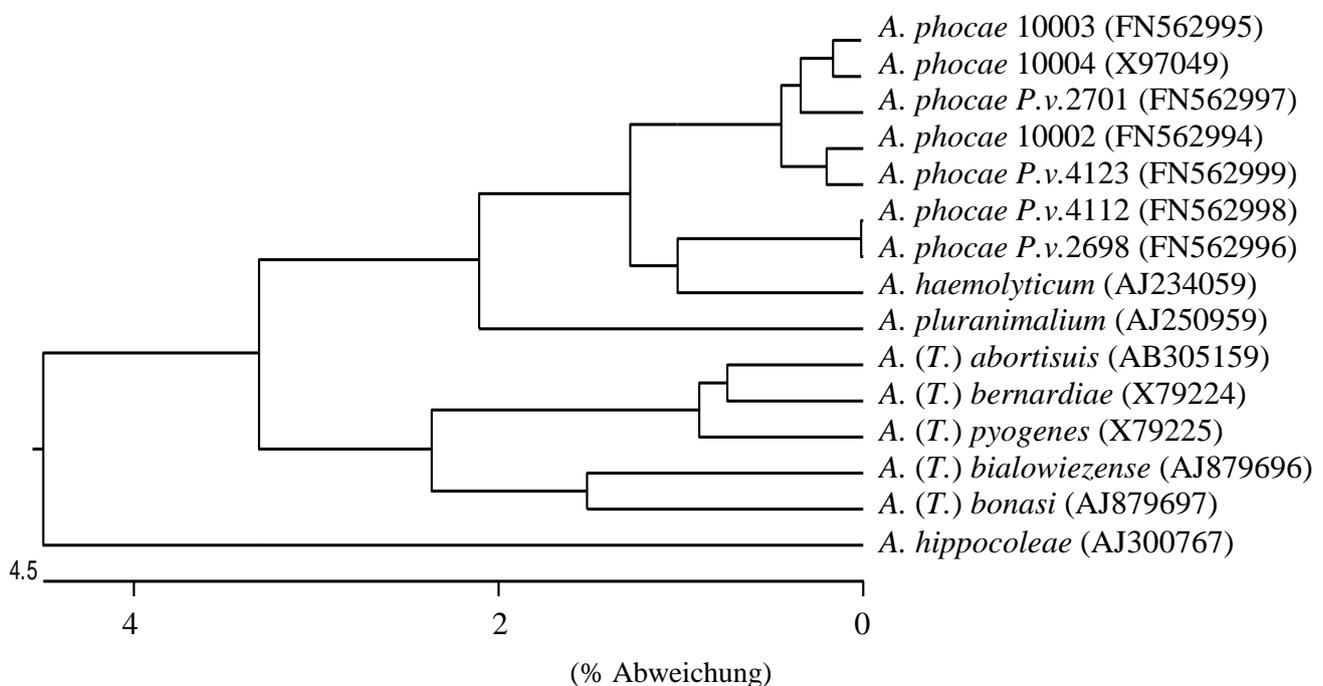
Phänotypische Eigenschaften	<i>A. phocae</i> n=43	<i>A. phocae</i> DSM 10002	<i>A. phocae</i> DSM 10003
Nitratreduktion	+(2) <sup>1</sup> , -(41) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrazinamidase	+(18) <sup>1</sup> , +(12) <sup>1</sup> , -(13) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrrolidonyl-Arylamidase	-(43) <sup>1</sup> ; +(10) <sup>3</sup> , +(17) <sup>3</sup> , -(16) <sup>3</sup>	- <sup>1</sup> ; (+) <sup>3</sup>	- <sup>1</sup> ; + <sup>3</sup>
Alkalische Phosphatase	+(30) <sup>1</sup> , +(10) <sup>1</sup> , -(3) <sup>1</sup> ; +(13) <sup>3</sup> , +(11) <sup>3</sup> , -(19) <sup>3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>
β-Glucuronidase	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>
β-Galactosidase	+ <sup>1</sup> ; +(38) <sup>2</sup> , +(5) <sup>2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
α-Glucosidase	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	+(13) <sup>1</sup> , -(30) <sup>1</sup> ; + <sup>2</sup>	(+) <sup>1</sup> ; + <sup>2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
Äsculin (β-Glucosidase)	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Urease	+(2) <sup>1</sup> , -(41) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Gelatine	+(1) <sup>1</sup> , +(1) <sup>1</sup> , -(41) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Glucose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Ribose	+(41) <sup>1</sup> , +(2) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Xylose	- <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>
Mannitol	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Maltose	+(42) <sup>1</sup> , +(1) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Lactose	+(22) <sup>1</sup> , +(2) <sup>1</sup> , -(19) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Saccharose	+(15) <sup>1</sup> , +(5) <sup>1</sup> , -(23) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Glycogen	+(29) <sup>1</sup> , +(14) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Katalase	+	+	+
α-Mannosidase	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>
DNase	+(42), -(1)	+	+
Hyaluronidase	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Serolyse auf Löffler-Agar	-	-	-
Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum	-	-	-

n= Zahl der Kulturen; += positive Reaktion; (+)= schwache Reaktion; -= negative Reaktion; 1= „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2); 2= 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate (siehe 3.5.7); 3= Tablettentest (siehe 3.5.8)

### 4.1.3.2 Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der *A. phocae*-Kulturen

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

Die Amplifizierung der 16S rDNA von sechs ausgewählten *A. phocae*-Kulturen, darunter die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, nach der unter 3.6.6 beschriebenen Methode, ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 1400 Bp (1392 Bp erwartete Größe). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der 16S rDNA der sechs *A. phocae*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern FN562994, FN562995, FN562996, FN562997, FN562998 und FN562999 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 16S rDNA-Sequenzen der sechs *A. phocae*-Kulturen, der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10004 und von acht Referenzkulturen von acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind in **Abb. 19** dargestellt. Die *A. phocae*-Kulturen zeigten untereinander eine Homologie zwischen 94,9 % bis 99,5 %. Die *A. phocae*-Kulturen und die Referenzkultur *A. phocae* DSM 10004 der GenBank wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 88,3 % bis 95,4 % auf.



**Abb. 19:** Dendrogrammanalyse der 16S rDNA der sechs *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen, der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10004 und von acht Referenzkulturen von acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.3.2.2 Amplifizierung und Sequenzierung der ISR

Die Amplifizierung der ISR der sechs ausgewählten *A. phocae*-Kulturen (4.1.3.2.1), darunter die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 (4.1.2.1), erfolgte nach der unter 3.6.7 beschriebenen Methode. Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der ISR der sechs *A. phocae*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern EU194565, EU194566, FN563000, FN563001, FN563002 und FN563003 abgelegt. Eine Sequenzanalyse der sechs ISR-Basensequenzen ermöglichte eine Unterteilung der *A. phocae* in drei ISR-Gruppen. Die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 konnten dabei der ISR-Gruppe I zugeordnet werden. Ein Sequenzvergleich und eine Dendrogrammanalyse der ISR der drei *A. phocae*-ISR-Gruppen sind in **Abb. 20** und **Abb. 21** dargestellt. Ein Vergleich der 16S rDNA- und der ISR-Analysen ist **Abb. 22** zu entnehmen.

#### Zu Abb. 20

```

[
A. phocae 10002 ISR-Grp I          1          60]
A. phocae 10003 ISR-Grp I          1          60]
A. phocae P.v. 2701 ISR-Grp II     1          60]
A. phocae P.v. 4123 ISR-Grp II     1          60]
A. phocae P.v. 2698 ISR-Grp III    1          60]
A. phocae P.v. 4112 ISR-Grp III    1          60]

[
A. phocae 10002 ISR-Grp I          61          120]
A. phocae 10003 ISR-Grp I          61          120]
A. phocae P.v. 2701 ISR-Grp II     61          120]
A. phocae P.v. 4123 ISR-Grp II     61          120]
A. phocae P.v. 2698 ISR-Grp III    61          120]
A. phocae P.v. 4112 ISR-Grp III    61          120]

[
A. phocae 10002 ISR-Grp I          121          180]
A. phocae 10003 ISR-Grp I          121          180]
A. phocae P.v. 2701 ISR-Grp II     121          180]
A. phocae P.v. 4123 ISR-Grp II     121          180]
A. phocae P.v. 2698 ISR-Grp III    121          180]
A. phocae P.v. 4112 ISR-Grp III    121          180]

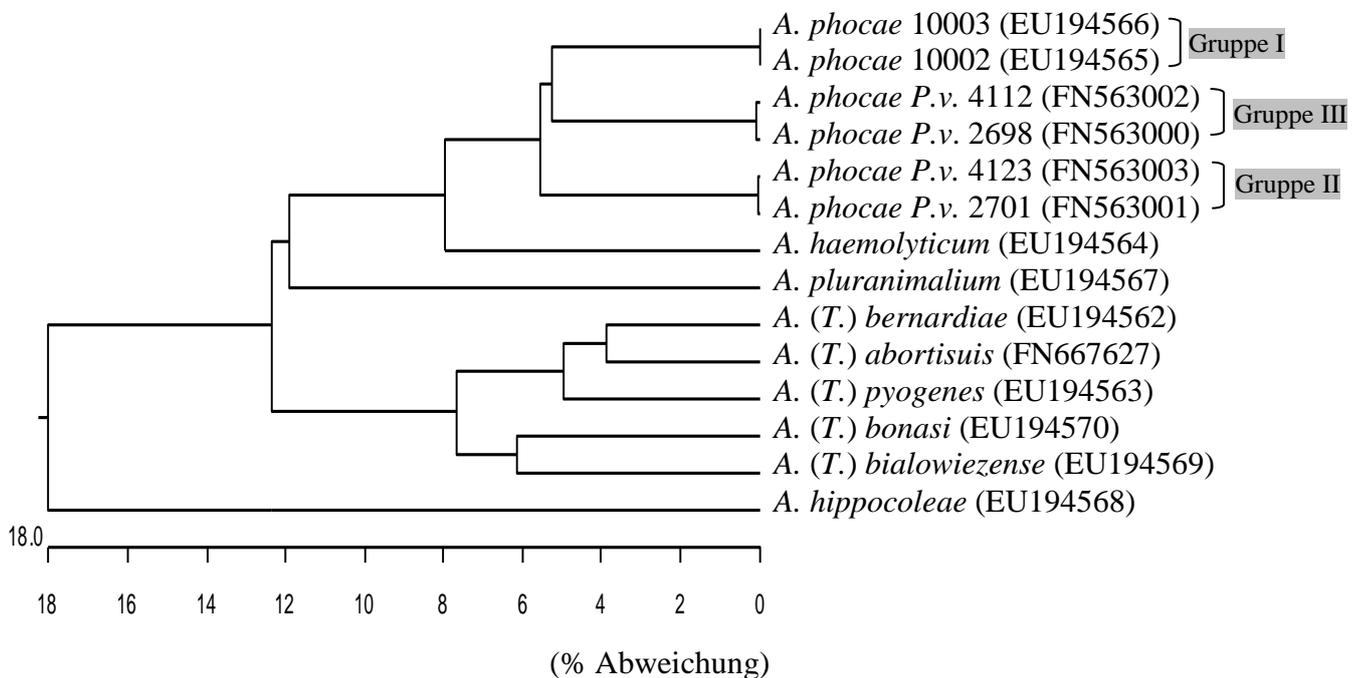
[
A. phocae 10002 ISR-Grp I          181          240]
A. phocae 10003 ISR-Grp I          181          240]
A. phocae P.v. 2701 ISR-Grp II     181          240]
A. phocae P.v. 4123 ISR-Grp II     181          240]
A. phocae P.v. 2698 ISR-Grp III    181          240]
A. phocae P.v. 4112 ISR-Grp III    181          240]

[
A. phocae 10002 ISR-Grp I          241          300]
A. phocae 10003 ISR-Grp I          241          300]
A. phocae P.v. 2701 ISR-Grp II     241          300]
A. phocae P.v. 4123 ISR-Grp II     241          300]
A. phocae P.v. 2698 ISR-Grp III    241          300]
A. phocae P.v. 4112 ISR-Grp III    241          300]

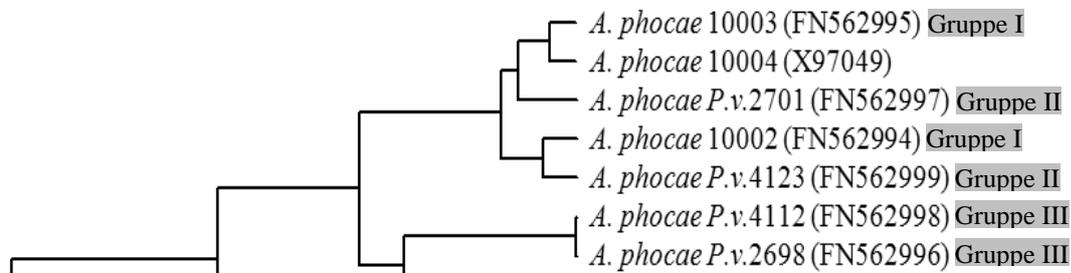
```

[	301	360]
<i>A. phocae</i> 10002 ISR-Grp I	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
<i>A. phocae</i> 10003 ISR-Grp I	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
<i>A. phocae</i> P.v. 2701 ISR-Grp II	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
<i>A. phocae</i> P.v. 4123 ISR-Grp II	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
<i>A. phocae</i> P.v. 2698 ISR-Grp III	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
<i>A. phocae</i> P.v. 4112 ISR-Grp III	TGGCATA CGGAGCCGATGAAGGACGTTGTAGCCTGCGATAAGCCTCGGGGAGTTGGCAAA	
[	361	393]
<i>A. phocae</i> 10002 ISR-Grp I	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	
<i>A. phocae</i> 10003 ISR-Grp I	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	
<i>A. phocae</i> P.v. 2701 ISR-Grp II	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	
<i>A. phocae</i> P.v. 4123 ISR-Grp II	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	
<i>A. phocae</i> P.v. 2698 ISR-Grp III	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	
<i>A. phocae</i> P.v. 4112 ISR-Grp III	CGAGCTGTGATCCGGGGGTGTC CGAATGGGGG	

**Abb. 20:** Sequenzvergleich der ISR der drei *A. phocae*-ISR-Gruppen. Die Unterschiede sind markiert.



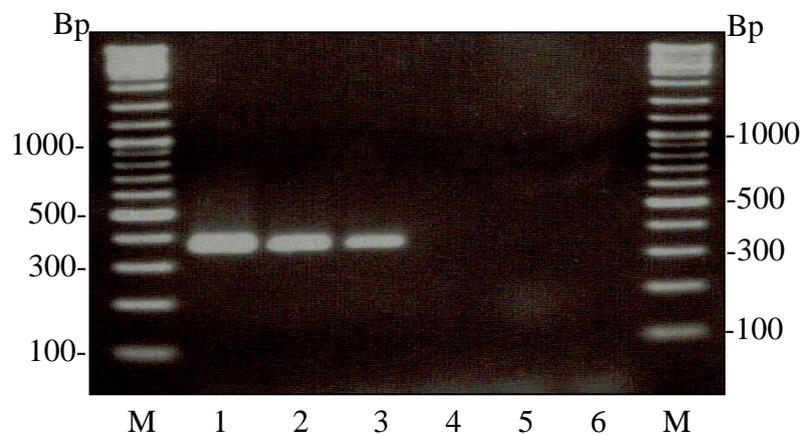
**Abb. 21:** Dendrogrammanalyse der ISR der sechs *A. phocae*-Kulturen und von acht Referenzkulturen von acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*. Die ISR-Gruppen I, II und III sind markiert.



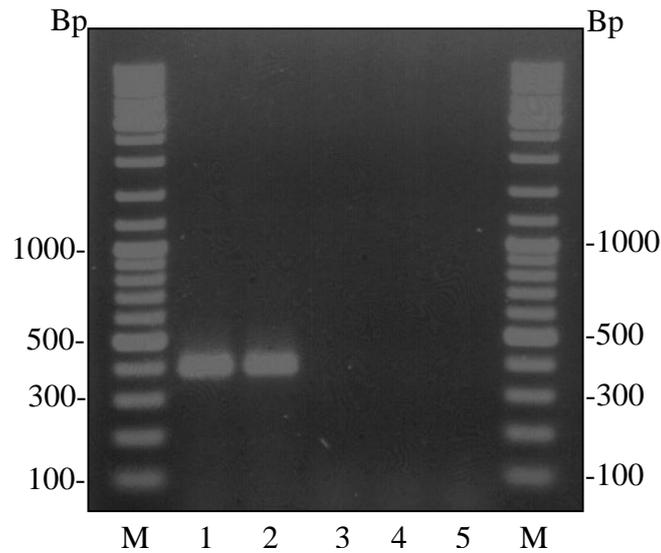
**Abb. 22:** Ausschnitt der in **Abb. 19** dargestellten 16S rDNA-Analyse unter Berücksichtigung der in **Abb. 21** dargestellten ISR-Gruppen I, II und III.

Die sechs *A. phocae*-Kulturen der drei ISR-Gruppen wiesen innerhalb der drei ISR-Gruppen jeweils eine Homologie zwischen 100 %, 100 % und 99,5 % auf. Die drei ISR-Gruppen zeigten untereinander eine Homologie zwischen 72,0 % bis 80,0 %. Die *A. phocae*-Kulturen wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine ISR Homologie zwischen 62,3 % bis 76,5 % auf. Auf 16S rDNA-Ebene wies ISR Gruppe I zu Gruppe II eine 16S rDNA-Homologie zwischen 97,7 % bis 98,8 %, ISR Gruppe I zu Gruppe III eine Homologie zwischen 96,2 % bis 97,0 % und ISR Gruppe II zu Gruppe III eine Homologie zwischen 95,1 % bis 96,2 % auf.

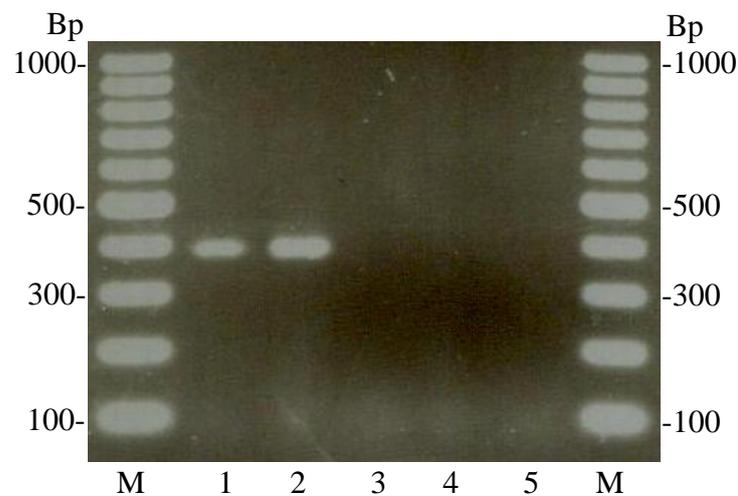
Für die drei *A. phocae*-ISR-Gruppen, die sich auf Basis ihrer ISR-Sequenzen unterschieden, wurden nunmehr drei verschiedene ISR-Gruppe I-, II- und III- spezifische Oligonukleotidprimerpaare entwickelt (3.6.11.1). Das Oligonukleotidprimerpaar I zeigte eine positive Reaktion für 15 *A. phocae*-Kulturen, darunter auch die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, Oligonukleotidprimerpaar II für 19 *A. phocae*-Kulturen und Oligonukleotidprimerpaar III für 11 *A. phocae*-Kulturen. Typische Amplikons sind in **Abb. 23**, **Abb. 24** und **Abb. 25** dargestellt.



**Abb. 23:** Amplikons (ca. 370 Bp) von *A. phocae* ISR-Gruppe I (1, 2, 3) unter Verwendung der ISR-Gruppe I-spezifischen Oligonukleotidprimer Ap1-ISR-F und Ap1-23S rDNA-R. Negative Reaktionen der *A. phocae*-ISR-Gruppe II-Kultur *P.v.* 2709 (4), der *A. phocae*-ISR-Gruppe III-Kultur *P.v.* 3723 (5) und von *A. pluranimalium* DSM 13483 (6). M siehe Abb. 7.



**Abb. 24:** Amplikons (ca. 400 Bp) von *A. phocae* ISR-Gruppe II (1, 2) unter Verwendung der ISR-Gruppe II-spezifischen Oligonukleotidprimer Ap2-ISR-F und Ap1-23S rDNA-R. Negative Reaktionen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I-Kultur *P.v.* 2694 (3), der *A. phocae*-ISR-Gruppe III-Kultur *P.v.* 2711 (4) und von *A. haemolyticum* DSM 20595 (5). M siehe Abb. 7.

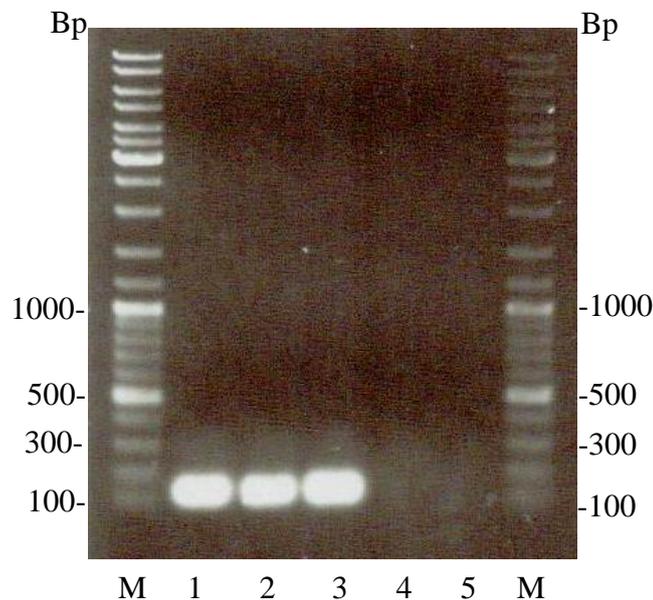


**Abb. 25:** Amplikons (ca. 400 Bp) von *A. phocae* ISR-Gruppe III (1, 2) unter Verwendung der ISR-Gruppe III-spezifischen Oligonukleotidprimer Ap3-ISR-F und Ap3-ISR-23S rDNA-R. Negative Reaktionen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I-Kultur *P.v.* 2509 (3), der *A. phocae*-ISR-Gruppe II-Kultur *P.v.* 3692 (4) und von *A. (T.) abortisuis* DSM 13483 (5). M siehe Abb. 13.

#### 4.1.3.2.3 Amplifizierung von *A. phocae-sodA*-Gen-spezifischen Abschnitten

Mit den nach 3.6.11.2 entwickelten *sodA*-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimern konnte für alle 15 *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I eine positive Reaktion nachgewiesen

werden. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 140 Bp (135 Bp erwartete Größe) (**Abb. 26**). Die verbleibenden 30 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III waren negativ.

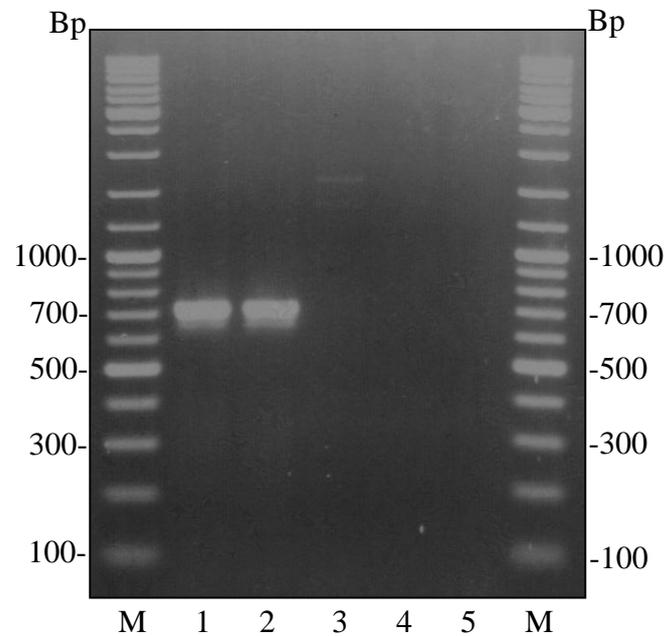


**Abb. 26:** Amplikons (ca. 140 Bp) von *A. phocae* ISR-Gruppe I (1, 2, 3) unter Verwendung der *A. phocae* *sodA*-spezifischen Oligonukleotidprimer *sodA*-ph-F und *sodA*-ph-R (siehe 3.6.11.2). Negative Reaktionen der *A. phocae*-ISR-Gruppe II-Kultur *P.v.* 4117 (4) und der *A. phocae*-ISR-Gruppe III-Kultur *P.v.* 3723 (5). M siehe Abb. 7.

#### 4.1.3.2.4 Amplifizierung des *A. phocae*-Phocaelysin-kodierenden Gens *phl*

Zur Amplifizierung des *A. phocae*-Phocaelysin-kodierenden Gens wurden zunächst die unter 3.6.11.10 beschriebenen *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer verwendet. Für 15 *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I, darunter die zwei Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, war mit diesen *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimern eine Kreuzreaktion festzustellen. Dies allerdings nur nach Absenkung der Primeranlagerungstemperatur auf 45 °C (3.6.11.10). Die verbleibenden 30 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III waren negativ. Die *plo*-kruzreagierenden Amplikons ergaben für *A. phocae* eine Größe von ca. 700 Bp (704 Bp erwartete Größe) (**Abb. 27**). Die nach Sequenzierung (3.6.5) des *plo*-kruzreagierenden Gens von *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 ermittelte Basensequenz wurden unter der GenBank-

Zugangsnummer FN999907 und FN999908 abgelegt. Ein Sequenzvergleich von Teilen des *pl*-Gens von *A. (T.) pyogenes* und des *pl*-kreuzreagierenden Gens von *A. phocae* ist in **Abb. 28** dargestellt.



**Abb. 27:** Amplikons (ca. 700 Bp) von *A. phocae*-ISR-Gruppe I (1, 2) unter Verwendung der *A. (T.) pyogenes-pl*-spezifischen Oligonukleotidprimer *pl*-F und *pl*-R bei einer Primeranlagerungstemperatur von 45 °C. Negative Reaktionen der *A. phocae*-ISR-Gruppe II-Kultur P.v. 3159 (3), der *A. phocae*-ISR-Gruppe III-Kultur P.v. 4113 (4) und von *A. hippocoleae* DSM 15539 (5). M siehe Abb. 7.

[	1	60]
<i>A. phocae</i> DSM 10002	CGTTCAAGGG-GAGCATGTAGAAAATGTCCCGGTGACGAGCGAATCGTACAAGAATGGAA	
<i>A. phocae</i> DSM 10003	CGTTCAAGGG-GAGCATGTAGAAAATGTCCCGGTGACGAGCGAATCGTACAAGAATGGAA	
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	CGTCAAGGGTGGAGTCTATTGAAAATGTGCCGGTTACCAAGGATCAGTCAAGGACGGCA	
[	61	120]
<i>A. phocae</i> DSM 10002	CGTACACAGTTTTCAAGCATGAAAAGAAGTCGTTCAATAATCTTCGTGGCGACTTGTCCG	
<i>A. phocae</i> DSM 10003	CGTACACAGTTTTCAAGCATGAAAAGAAGTCGTTCAATAATCTTCGTGGCGACTTGTCCG	
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	CGTACACGGTATTTAAGCATGAAACGCAAGAGTTTAACAATTTTCGTTCGGACATCTCTG	
[	121	180]
<i>A. phocae</i> DSM 10002	TCATTGAAGCAAACAATGCCCGGATTTACCCGGGTGCGTTGGTTAAAGCCAACGAGAATC	
<i>A. phocae</i> DSM 10003	TCATTGAAGCAAACAATGCCCGGATTTACCCGGGTGCGTTGGTTAAAGCCAACGAGAATC	
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	CGTTTCGATGCSAACAAAGCCACAGTCTATCCGGCGCGTTCGTGTTAGCAAAATAAGATC	
[	181	240]
<i>A. phocae</i> DSM 10002	TGTCTAAGGGAAGTCCAACCGCGTCGGCATCGAACGAGCACCACAGGTATCAGCGTTCG	
<i>A. phocae</i> DSM 10003	TGTCTAAGGGAAGTCCAACCGCGTCGGCATCGAACGAGCACCACAGGTATCAGCGTTCG	
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	TGCAAAAGGAGTCCACTTCGATCGGAATTCACGTTGCTCCGCAACTGTCAGCGTTCG	
[	241	300]
<i>A. phocae</i> DSM 10002	ATCTTCGGGGCTTAGTTGACGAAAGAACCAGAAAGCAATCGACAGCCAAACAAAAGTA	
<i>A. phocae</i> DSM 10003	ATCTGCCTGGCTTAGTTGGTGGAGCTAACCAAAAATCAATCGCAAGCCAAACAAAAGTA	
<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630	ACTTGCCAGGATTAGTTGACGGTAAGAAATAAGTTCGTATCAACAAATCCACCAAGAGTT	

```

[                               301                               360]
A. phocae DSM 10002             CTTGTTGAACAAGGAGTTAAATGAAATTACTGCAAGGATGGACAACCTACATGCTACCTATC
A. phocae DSM 10003             GCGTGAACAAGGCGTAAACGAACTACTGCAAGGATGGACGAACCTTACATGCCACCTAAC
A. (T.) pyogenes DSM 20630     CCGTGACTCAAGGACTGAACGGCTTCTCGACGGTTGGATTTCAGCGCAATAGCAAGTATC

[                               361                               420]
A. phocae DSM 10002             CAAATCATGCAGCTAAGATCTCTTACGACGAATCCATGGTGAACCTCGAAAGAACAACCTGG
A. phocae DSM 10003             CAAATCATGCAGCTAAGATCTCTTACGACGAATCCATGGTGAACCTCGAAAGAACAACCTGG
A. (T.) pyogenes DSM 20630     CTGACCATGCTGCAAAAGATCTCTTACGATGAGACTTATGGTGAAGTCAAAACCGTCAACTGG

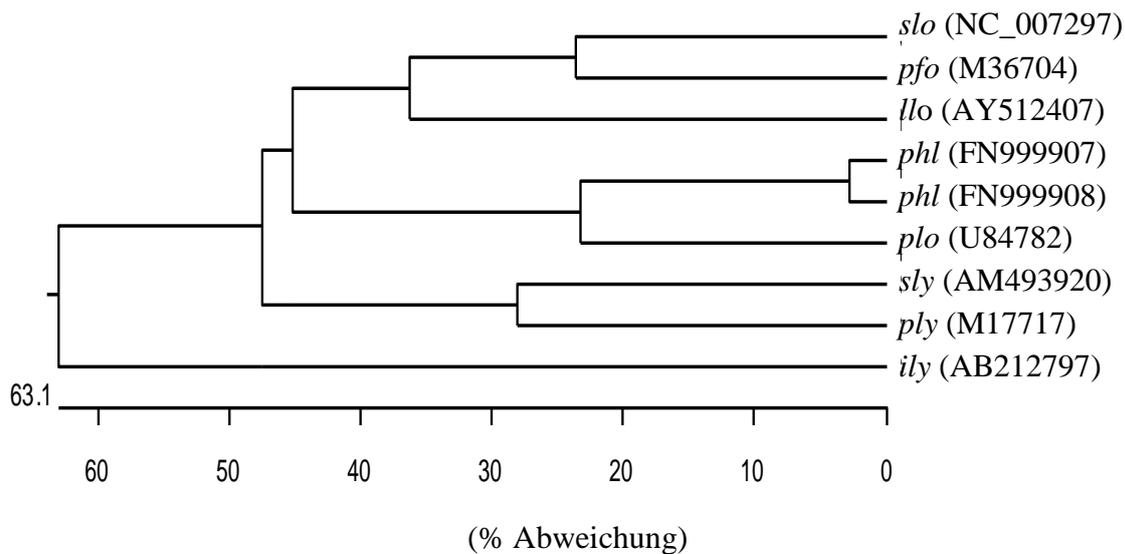
[                               421                               480]
A. phocae DSM 10002             AAGCAAAGTTTGGTCTAGGATTCGAAAAGGTAGCGAATAAGCTCGATGTCAAATTTGAAG
A. phocae DSM 10003             AAGCAAAGTTTGGTCTAGGATTCGAAAAGGTAGCGAATAAGCTCGATGTTAACTTCGAAG
A. (T.) pyogenes DSM 20630     AAGCAAAGCTTGGCTTGGATTGAAAAGGTTTCAGCCCAAGCTCAAGCTGGACTTCGATG

[                               481                               531]
A. phocae DSM 10002             CAATTCATAAGCATGAACATCAAGCAGCTATCGCTTCGTTCAAGCAGATCT
A. phocae DSM 10003             CAATTCATAAGCATGAACATCAAGCAGCTATCGCTTCGTTCAAGCAGATCT
A. (T.) pyogenes DSM 20630     CAATTCATAAGCTGAACGGCAGGTGGCTATCGCTTCCTTCAAACAGATTT

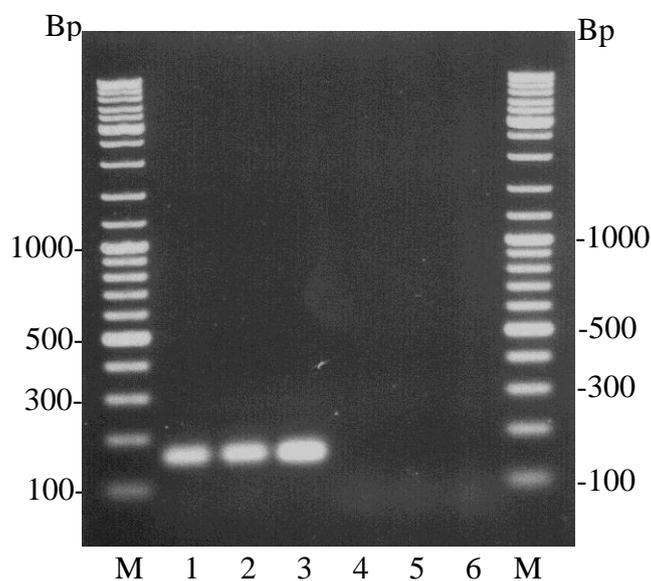
```

**Abb. 28:** Sequenzvergleich von Teilen des *pho*-Gens von *A. (T.) pyogenes* und des *pho*-kreuzreagierenden Gens von zwei *A. phocae*. Die Unterschiede sind markiert.

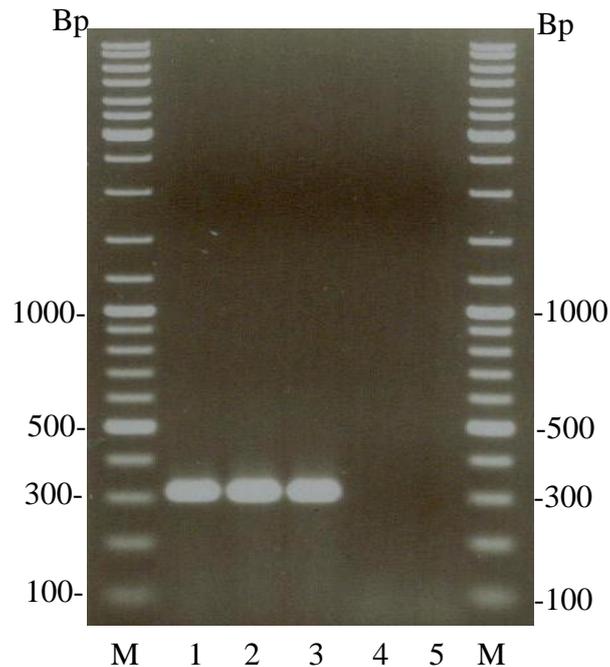
Eine Dendrogrammanalyse des im weiteren als Phocaelysin-Gen *phl* bezeichneten Lysingens mit *pho* und weiteren Porenbildner-kodierenden Genen ist in **Abb. 29** dargestellt. Die Sequenzierung des Phocaelysin-Gens ermöglichte die Erstellung von Phocaelysin-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Amplifizierung des speziesspezifischen Genabschnittes des Phocaelysin-Gens ergab für *A. phocae* ein Amplikon mit einer Größe von ca. 160 Bp (158 Bp erwartete Größe) (**Abb. 30**). Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar waren 9 der 15 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppe I positiv. Dies beinhaltete auch die Referenzkultur *A. phocae* DSM 10002, nicht aber die Referenzkultur *A. phocae* DSM 10003. Die verbleibenden 36 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen I, II und III waren negativ. Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich ebenso als negativ. Im weiteren wurde diese Sequenz des *pho*-kreuzreagierenden Amplikons der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10003 zur Erstellung eines zweiten Phocaelysin-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimerpaar verwendet. Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar wiesen nunmehr alle 15 *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I eine positive Reaktion auf. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 310 Bp (311 Bp erwartete Größe) (**Abb. 31**). Die verbleibenden 30 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III waren negativ.



**Abb. 29:** Dendrogrammanalyse der Sequenz des Phocaelysin-kodierenden-Gens *phl* der zwei *A. phocae*-Referenzkulturen mit *plo* und mit weiteren Porenbildner-kodierenden Genen (*slo* = Streptolysin-kodierendes-Gen, *pfo* = Perfringolysin-kodierendes-Gen, *llo* = Listeriolysin-kodierendes-Gen, *sly* = Suilylin-kodierendes-Gen, *ply* = Pneumolysin-kodierendes-Gen, *ily* = Intermedilysin-kodierendes-Gen)



**Abb. 30:** Amplikons (ca. 160 Bp) des Phocaelysin-Gens (1, 2, 3) unter Verwendung der Phocaelysin-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimer *phl*-F und *phl*-R. Negative Reaktionen von ISR-Gruppe I-A. *phocae* DSM 10003 (4), ISR-Gruppe II-A. *phocae* P.v. 2508 (5) und ISR-Gruppe III-A. *phocae* P.v. 4125 (6). M siehe Abb. 7.



**Abb. 31:** Amplikons (ca. 310 Bp) des Phocaelysin-Gens (1, 2, 3) unter Verwendung der Phocaelysin-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimer *phl2-F* und *phl-R*. Negative Reaktionen von ISR-Gruppe II-A. *phocae* P.v. 3159 (4) und ISR-Gruppe III-A. *phocae* P.v. 4125 (5). M siehe Abb. 7.

Eine Zuordnung der zuvor aufgeführten phänotypischen und genotypischen Eigenschaften zu den drei ISR-Gruppen von *A. phocae* ergab einen eindeutigen Zusammenhang zwischen *A. phocae*-ISR-Gruppe I, einer relativ breiten Hämolysezone, einer positiven N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase-, D-Lactose- und D-Saccharose-Reaktion, der Reaktion mit *A. phocae-sodA*-spezifischen Oligonukleotidprimern, der Kreuzreaktion mit dem *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimerpaar und dem Vorkommen des *A. phocae*-Phocaelysin-kodierenden Gens *phl*. Ein Zusammenhang war ferner zwischen *A. phocae*-ISR-Gruppe II, einer schmalen Hämolysezone, einer positiven Pyrazinamidase-Reaktion, bei fehlender *plo* bzw. *phl*-Reaktion festzustellen. *A. phocae*-ISR-Gruppe III zeigte einen Zusammenhang zwischen einer schmalen Hämolysezone, einer positiven Pyrazinamidase-, D-Lactose- und D-Saccharose-Reaktion, ebenso bei fehlender *plo* bzw. *phl*-Reaktion. Eine Zusammenfassung der spezifischen Eigenschaften der ISR-Gruppen I bis III von *A. phocae* ist in **Tab. 14** dargestellt.

**Tab. 14:** Einige ausgewählte phänotypische und genotypische Eigenschaften der ISR-Gruppe I bis III-Kulturen von *A. phocae*

	<b>Gruppe I n=15*</b>	<b>Gruppe II n=19</b>	<b>Gruppe III n=11</b>	<b>Signifikanz- test (p-Wert)</b>
<b>Hämolyse auf Schaf-BAP</b>	+(+)**(7)***, ++(8)	+(13), +(6)	+(1), +(10)	p ≤ 0,001
<b>Pyrazinamidase<sup>1</sup></b>	-	+(14), +(5)	+(4), +(7)	p ≤ 0,001
<b>N-Acetyl-β-Glucosaminidase<sup>1</sup></b>	+(14), +(1)	-(19)	-(11)	p ≤ 0,001
<b>D-Lactose<sup>1</sup></b>	+(13), +(2)	-(19)	+(11)	p ≤ 0,001
<b>D-Saccharose<sup>1</sup></b>	+(6), +(5), -(4)	-(19)	+(11)	p ≤ 0,001
<b>ISR-Gruppe I-spezifische Oligonukleotidprimer (365 Bp)<sup>2</sup></b>	+(15)	-(19)	-(11)	n.d.
<b>ISR-Gruppe II-spezifische Oligonukleotidprimer (390 Bp)</b>	-(15)	+(19)	-(11)	n.d.
<b>ISR-Gruppe III-spezifische Oligonukleotidprimer (391 Bp)</b>	-(15)	-(19)	+(11)	n.d.
<b><i>A. phocae-sodA</i>-spezifische Oligonukleotidprimer (135 Bp)</b>	+(15)	-(19)	-(11)	n.d.
<b>Kreuzreaktion mit <i>A. (T.) pyogenes- plo</i>-spezifischen Oligonukleotidprimern (704 Bp)</b>	+(15)	-(19)	-(11)	n.d.
<b><i>A. phocae-phl</i>-spezifische Oligonukleotidprimer (<i>phl</i>-F, <i>phl</i>-R, 158 Bp)</b>	+(9), -(6)	-(19)	-(11)	n.d.
<b><i>A. phocae-phl</i>-spezifische Oligonukleotidprimer (<i>phl2</i>-F, <i>phl</i>-R, 311 Bp)</b>	+(15)	-(19)	-(11)	n.d.

n= Zahl der Kulturen; += positive Reaktion; (+)= schwache Reaktion; -= negative Reaktion; 1= Ergebnisse des „API-Coryne-Testsystem“; 2= erwartete Größe im Bp; \*= ISR-Gruppe I beinhaltet auch die *Arcanobacterium*-Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003; \*\*= Grad der Hämolyse; \*\*\*= Zahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften; n.d.= nicht durchgeführt.

#### 4.1.4 Untersuchung von *A. haemolyticum*

##### 4.1.4.1 Phänotypische Eigenschaften

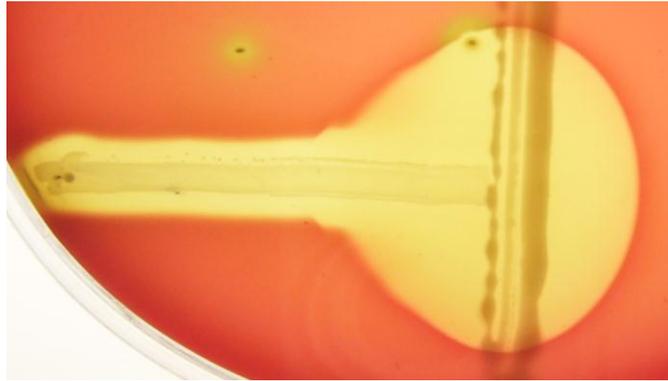
Die im weiteren untersuchten sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden (3.1), zeigten auf Schafblutagarplatten relativ breite Hämolysezonen. Die jeweilige Hämolysezone der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen erwies sich als etwas breiter als die Hämolysezone von *A. haemolyticum* DSM 20595 (4.1.1.1). Nach Anzüchtung auf

Kaninchenblutagarplatten zeigten alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, vergleichbar mit *A. haemolyticum* DSM 20595 (4.1.1.1), eine verstärkte Hämolyse (**Tab. 15**).

Der Nachweis synergistischer bzw. antagonistischer, CAMP-ähnlicher Reaktionen der *A. haemolyticum*-Kulturen wurde nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Diese waren vergleichbar mit den CAMP-ähnlichen Reaktionen der *A. haemolyticum*-Referenzkultur (4.1.1.1).

Synergistische Hämolysereaktionen von *A. haemolyticum* waren mit *S. agalactiae*, *R. equi* und mit *P. phenylpyruvicus* nachweisbar (**Abb. 32**). Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen zeigten des Weiteren eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins (**Abb. 32**).

Die verschiedenen Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die synergistischen und antagonistischen Hämolysereaktionen der *A. haemolyticum*-Kulturen sind in **Tab. 15** zusammenfassend dargestellt.



A



B



C

**Abb. 32:** Typische synergistische Hämolysereaktion von *A. haemolyticum* (horizontal) mit *R. equi* (A, vertikal) und *P. phenylpyruvicus* (B, vertikal); umgekehrte CAMP-Reaktion von *A. haemolyticum* im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolsins (C, vertikal).

**Tab. 15:** Hämolyseformen, bzw. synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen der *A. haemolyticum*-Kulturen und der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595

		<i>A. haemolyticum</i> n=7	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595
<b>Hämolyse auf</b>	<b>Schaf-BAP</b>	+(7)*	(+)
	<b>Kaninchen-BAP</b>	++(7)	++
<b>Synergistische Hämolyse mit</b>	<b>Staphylokokken <math>\beta</math>-Hämolysin</b>	-(7)**	-
	<i>S. agalactiae</i>	+(7)	+
	<i>R. equi</i>	+(7)	+
	<i>P. phenylpyruvicus</i>	+(7)	+
<b>Umgekehrter CAMP-Test</b>		+(7)	+

n= Zahl der Kulturen; \*= (+), +, +(+) , ++ Grad der Hämolyse;

\*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktion

Die biochemischen Eigenschaften der *A. haemolyticum*-Kulturen, ermittelt mit dem „API-Coryne-Testsystem“ (3.5.2), sind in **Tab. 16** zusammenfassend dargestellt. Alle sieben untersuchten *A. haemolyticum*-Kulturen wiesen eine negative Reaktion für das Enzym Katalase (3.5.3) und eine positive Reaktion auf DNase-Test-Agar (3.5.4) auf. Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen erwiesen sich ferner als negativ für das Enzym Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test (3.5.6). Die Ergebnisse für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (3.5.7) und für die Enzyme Alkalische Phosphatase, Pyrrolidonyl-Arylamidase und  $\alpha$ -Mannosidase (3.5.8) sind in **Tab. 16** zusammenfassend dargestellt. Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen zeigten, im Gegensatz zu *A. haemolyticum* DSM 20595, eine schwachpositive Serolysereaktion auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9), zeigten aber keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum (3.5.10) (**Tab. 16**).

**Tab. 16:** Phänotypische Eigenschaften der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595

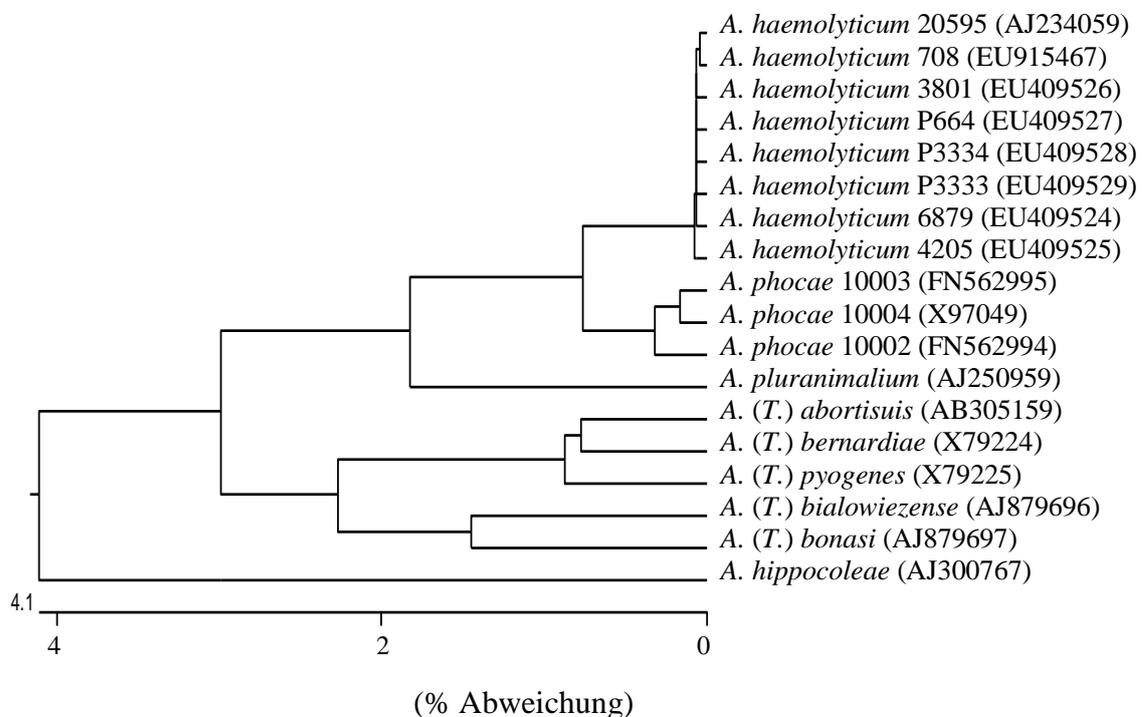
Phänotypische Eigenschaften	<i>A. haemolyticum</i> n=7	<i>A. haemolyticum</i> DSM 20595
Nitratreduktion	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrazinamidase	(+)(4) <sup>1</sup> , -(3) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Pyrrolidonyl-Arylamidase	(+)(6) <sup>1</sup> , -(1) <sup>1</sup> ; + <sup>3</sup>	- <sup>1,3</sup>
Alkalische Phosphatase	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>
β-Glucuronidase	+(2) <sup>1,2</sup> , -(5) <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>
β-Galactosidase	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
α-Glucosidase	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
Äsculin (β-Glucosidase)	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Urease	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Gelatine	+(1) <sup>1</sup> , +(6) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Glucose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Ribose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Xylose	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Mannitol	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Maltose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Lactose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Saccharose	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Glycogen	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Katalase	-	-
α-Mannosidase	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>
DNase	+	+
Hyaluronidase	-	-
Voges-Proskauer	-	-
Serolyse auf Löffler-Medium	(+)	-
Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum	-	-

n= Zahl der Kulturen; += positive Reaktion; (+)= schwache Reaktion; -= negative Reaktion; 1= „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2); 2= 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate (siehe 3.5.7); 3= Tablettentest (siehe 3.5.8)

#### 4.1.4.2 Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der *A. haemolyticum*-Kulturen

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

Die Amplifizierung der 16S rDNA der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, nach der unter 3.6.6 beschriebenen Methode, ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 1400 Bp (1392 Bp erwartete Größe). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der 16S-rDNA der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern EU409524, EU409525, EU409526, EU409527, EU409528, EU409529 und EU915467 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 16S rDNA-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind der **Abb. 33** zu entnehmen. Die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 zeigten untereinander eine Homologie zwischen 98,8 % bis 99,9 %. Die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 89,4 % bis 95,4 % auf.

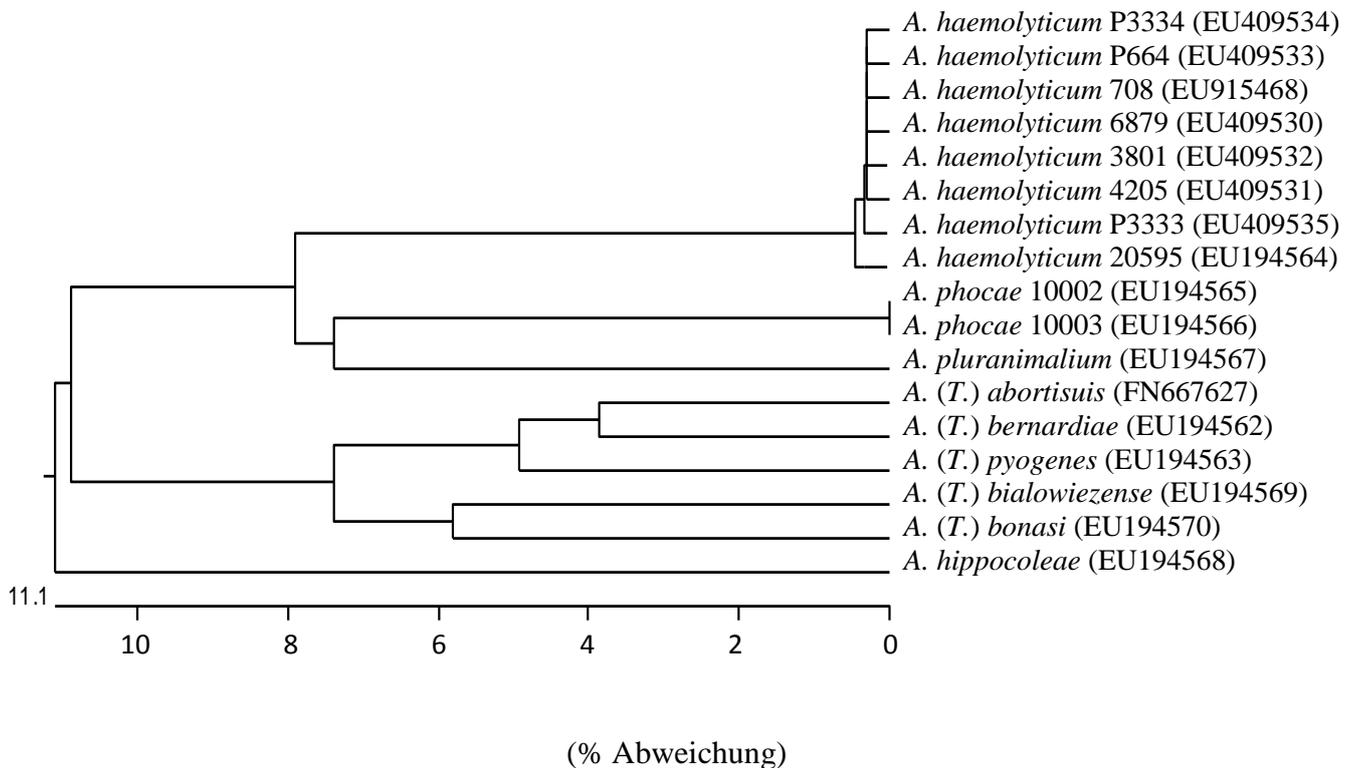


**Abb. 33:** Dendrogrammanalyse der 16S rDNA der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.4.2.2

### Amplifizierung und Sequenzierung der ISR

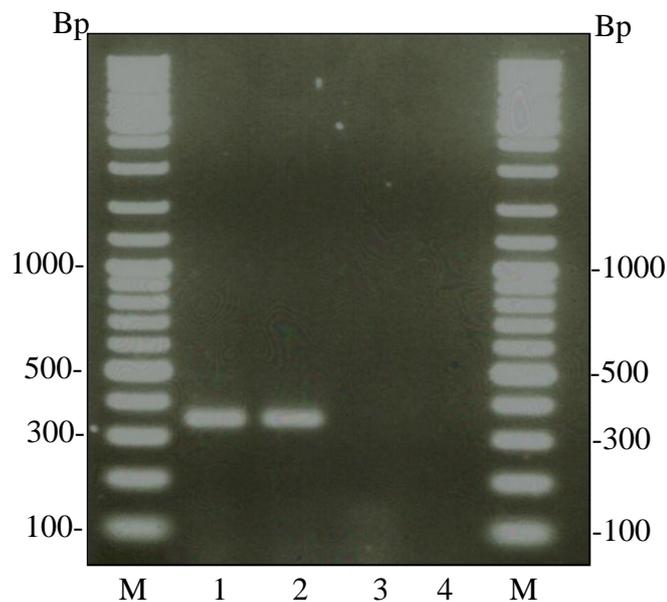
Die Amplifizierung der ISR der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, erfolgte nach der unter 3.6.7 beschriebenen Methode. Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der ISR der *A. haemolyticum*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern EU409530, EU409531, EU409532, EU409533, EU409534, EU409535 und EU915468 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der ISR-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind in **Abb. 34** dargestellt. Die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 zeigten untereinander eine Homologie zwischen 97,5 % bis 100,0 %. Die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 63,6 % bis 73,5 % auf.



**Abb. 34:** Dendrogrammanalyse der ISR der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.4.2.3 Amplifizierung von *A. haemolyticum*-ISR bzw. 23S rDNA-spezifischen Abschnitten

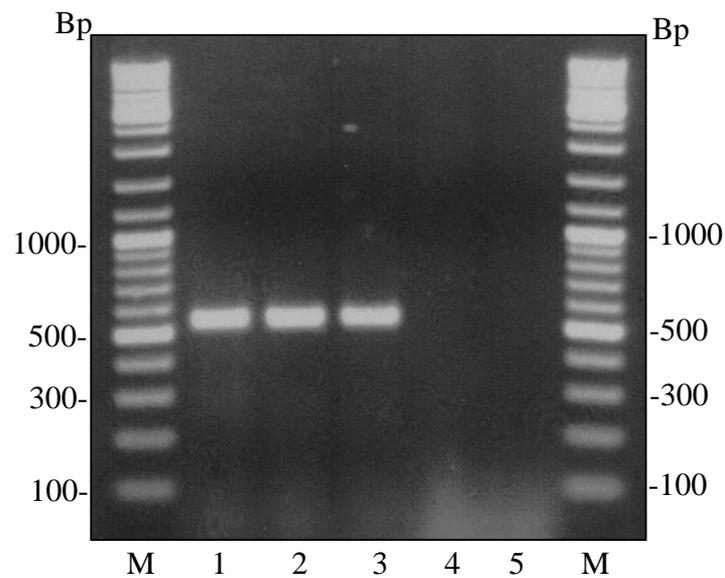
Mit den nach 3.6.11.3 entwickelten speziesspezifischen Oligonukleotidprimern der ISR bzw. 23S rDNA von *A. haemolyticum* konnte für alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und für *A. haemolyticum* DSM 20595 ein speziesspezifisches Amplikon mit einer Größe von ca. 350 Bp (346 Bp erwartete Größe) nachgewiesen werden (**Abb. 35**). Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich als negativ.



**Abb. 35:** Typische Amplikons (ca. 350 Bp) von *A. haemolyticum* DSM 20595 (1) und *A. haemolyticum* 708 (2) unter Verwendung der *A. haemolyticum*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer Aha-ISR-F und Aha-23S rDNA-R. Negative Reaktionen von *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (3) und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (4). M siehe Abb. 7.

#### 4.1.4.2.4 Nachweis des *A. haemolyticum*-Phospholipase D-kodierenden Gens *pld*

Die Amplifizierung des Phospholipase D-kodierenden Gens *pld* von *A. haemolyticum* DSM 20595 und der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, nach der unter 3.6.11.4 beschriebenen Methode, ergab ein Amplikon mit einer Größe von ca. 530 (528 Bp erwartete Größe) (**Abb. 36**). Die anderen untersuchten *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ.



**Abb. 36:** Typische Amplikons (ca. 530 Bp) von *A. haemolyticum* DSM 20595 (1), *A. haemolyticum* P3334 (2) und *A. haemolyticum* 4205 (3) unter Verwendung der *A. haemolyticum-pld*-spezifischen Oligonukleotidprimer Ah-F und Ah-R; Negative Reaktionen von *A. phocae* DSM 10003 (4) und *A. pluranimalium* DSM 13483 (5). M siehe Abb. 7.

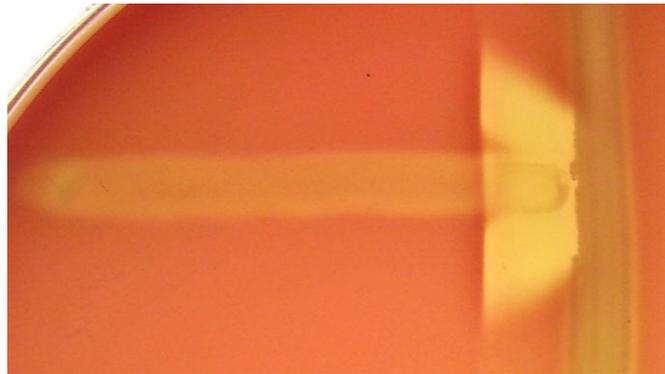
#### 4.1.5 Untersuchung von *A. pluranimalium*

##### 4.1.5.1 Phänotypische Eigenschaften

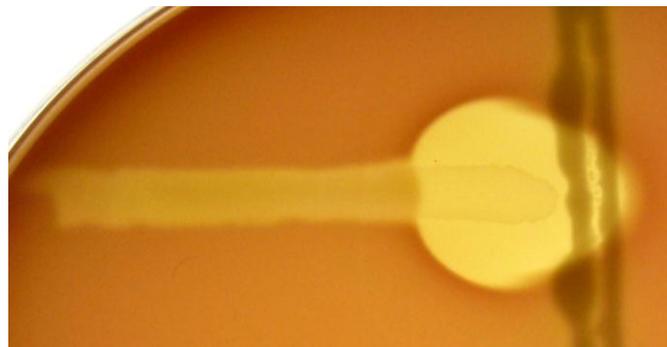
Die im weiteren untersuchte *A. pluranimalium*-Kultur 1128, isoliert von einem Hund (3.1), zeigte auf Schafblutagarplatten eine relativ breite Hämolysezone. Nach Anzüchtung auf Kaninchenblutagarplatten zeigte *A. pluranimalium* 1128, vergleichbar mit *A. pluranimalium* DSM 13483 (4.1.1.1), eine verstärkte Hämolyse (**Tab. 17**).

Der Nachweis synergistischer bzw. antagonistischer, CAMP-ähnlicher Reaktionen der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 wurde nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Synergistische Hämolysereaktionen von *A. pluranimalium* 1128 waren mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysin und mit *R. equi* als Indikatorstamm nachweisbar (**Abb. 37**). *A. pluranimalium* 1128 zeigte keine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins.

Die verschiedenen Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die Ergebnisse der Untersuchungen auf synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen von *A. pluranimalium* 1128 und der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 sind in **Tab. 17** zusammenfassend dargestellt.



**A**



**B**

**Abb. 37:** Typische synergistische Hämolysereaktion von *A. pluranimalium* 1128 (horizontal) mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysin (A, vertikal) und mit *R. equi* (B, vertikal).

**Tab. 17:** Hämolyseformen, bzw. synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen von *A. pluranimalium* 1128 und der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483

		<i>A. pluranimalium</i> 1128	<i>A. pluranimalium</i> DSM 13483
<b>Hämolyse auf</b>	<b>Schaf-BAP</b>	+*	+
	<b>Kaninchen-BAP</b>	+(+)	+(+)
<b>Synergistische Hämolyse mit</b>	<b>Staphylokokken <math>\beta</math>-Hämolysin</b>	+**	+
	<i>S. agalactiae</i>	-	-
	<i>R. equi</i>	+	+
	<i>P. phenylpyruvicus</i>	-	-
<b>Umgekehrter CAMP-Test</b>		-	-

\*= (+), +, +(+) , ++ Grad der Hämolyse; \*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktion

Die biochemischen Eigenschaften von *A. pluranimalium* 1128, ermittelt mit dem „API-Coryne-Testsystem“ (3.5.2), sind in **Tab. 18** zusammenfassend dargestellt. Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte nach der unter 3.5.3 beschriebenen Methode. *A. pluranimalium* 1128 wies eine positive Reaktion mit deutlicher Bläschenbildung und eine positive Reaktion auf DNase-Test-Agar (3.5.4) auf. *A. pluranimalium* 1128 erwies sich ferner als negativ für das Enzym Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test (3.5.6). *A. pluranimalium* 1128 war negativ für das Enzym N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (3.5.7), zeigte aber eine schwach positive Reaktion für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase und eine positive Reaktion für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase. *A. pluranimalium* 1128 erwies sich als negativ für das Enzym Alkalische Phosphatase, zeigte aber eine positive Reaktion für die Enzyme Pyrrolidonyl-Arylamidase und  $\alpha$ -Mannosidase (3.5.8). *A. pluranimalium* 1128 erzeugte keine Serolyse auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9) und wies keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf (3.5.10). Die phänotypischen Eigenschaften von *A. pluranimalium* 1128 und von *A. pluranimalium* DSM 13483 sind in **Tab. 18** zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 18:** Phänotypische Eigenschaften von *A. pluranimalium* 1128 und der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483

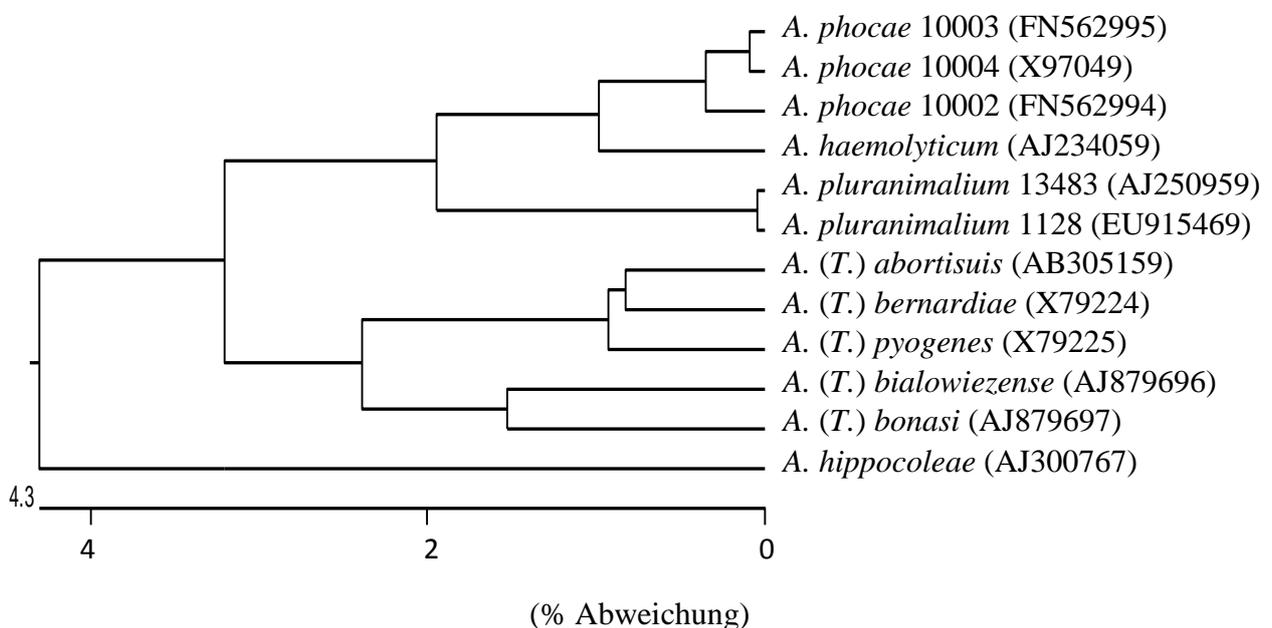
Phänotypische Eigenschaften	<i>A. pluranimalium</i> 1128	<i>A. pluranimalium</i> DSM 13483
Nitratreduktion	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrazinamidase	(+) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Pyrrolidonyl-Arylamidase	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1,3</sup>
Alkalische Phosphatase	- <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>
β-Glucuronidase	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
β-Galactosidase	- <sup>1</sup> , (+) <sup>2</sup>	- <sup>1</sup> , (+) <sup>2</sup>
α-Glucosidase	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	- <sup>1,2</sup>	- <sup>1,2</sup>
Äsculin (β-Glucosidase)	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Urease	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Gelatine	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Glucose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Ribose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Xylose	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Mannitol	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Maltose	- <sup>1</sup>	(+) <sup>1</sup>
Lactose	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Saccharose	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Glycogen	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Katalase	+	+
α-Mannosidase	+ <sup>3</sup>	+ <sup>3</sup>
DNase	+	+
Hyaluronidase	-	-
Voges-Proskauer	-	-
Serolyse auf Löffler-Medium	-	-
Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum	-	-

+ = positive Reaktion; (+) = schwache Reaktion; - = negative Reaktion; 1 = „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2); 2 = 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate (siehe 3.5.7); 3 = Tablettentest (siehe 3.5.8)

#### 4.1.5.2 Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte von *A. pluranimalium* 1128

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

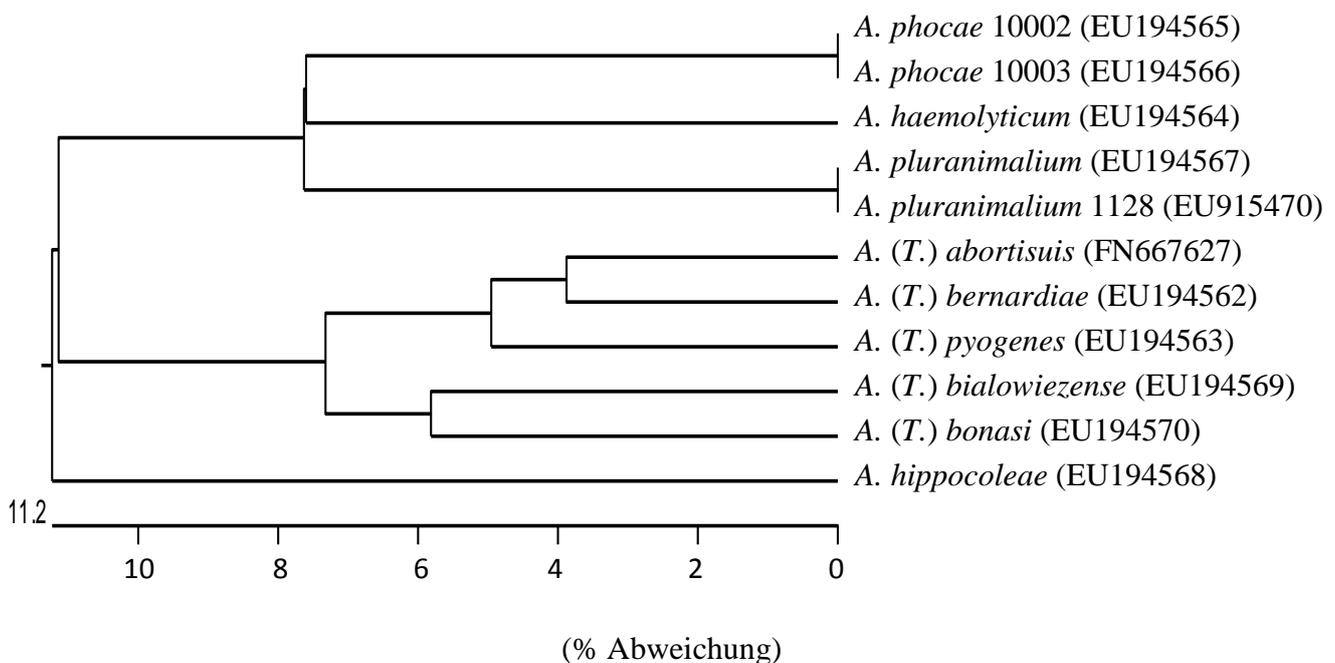
Die Amplifizierung der 16S rDNA von *A. pluranimalium* 1128, isoliert von einem Hund, nach der unter 3.6.6 beschriebenen Methode ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 1400 Bp (1392 Bp erwartete Größe). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelte Basensequenz der 16S rDNA von *A. pluranimalium* 1128 wurde unter der GenBank-Zugangsnummer EU915469 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 16S rDNA-Sequenzen der *A. pluranimalium* 1128 und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind **Abb. 38** zu entnehmen. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 zeigten untereinander eine Homologie von 99,6 %. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 89,9 % bis 94,0 % auf.



**Abb. 38:** Dendrogrammanalyse der 16S rDNA der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 der vorliegenden Untersuchungen und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.5.2.2 Amplifizierung und Sequenzierung der ISR

Die Amplifizierung der ISR von *A. pluranimalium* 1128 erfolgte nach der unter 3.6.7 beschriebenen Methode. Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelte Basensequenz der ISR von *A. pluranimalium* 1128 wurde unter der GenBank-Zugangsnummer EU915470 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der ISR-Sequenzen von *A. pluranimalium* 1128 und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind in **Abb. 39** dargestellt. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 zeigten untereinander eine Homologie von 98,0 %. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 60,7 % bis 73,6 % auf.

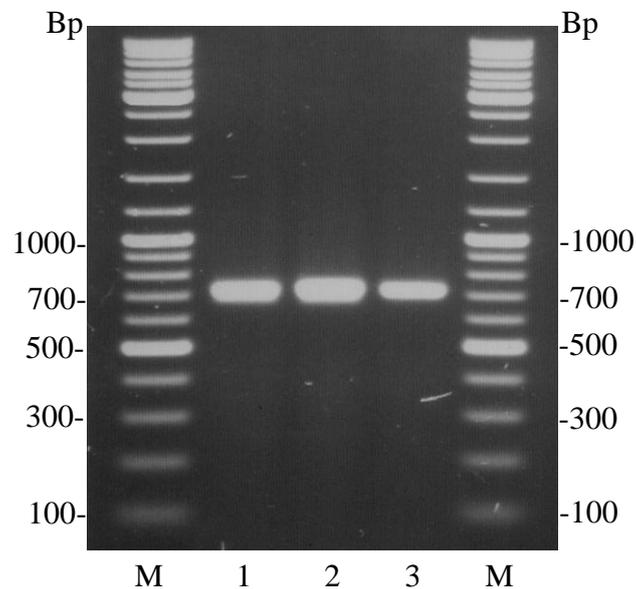


**Abb. 39:** Dendrogrammanalyse der ISR der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 der vorliegenden Untersuchungen und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

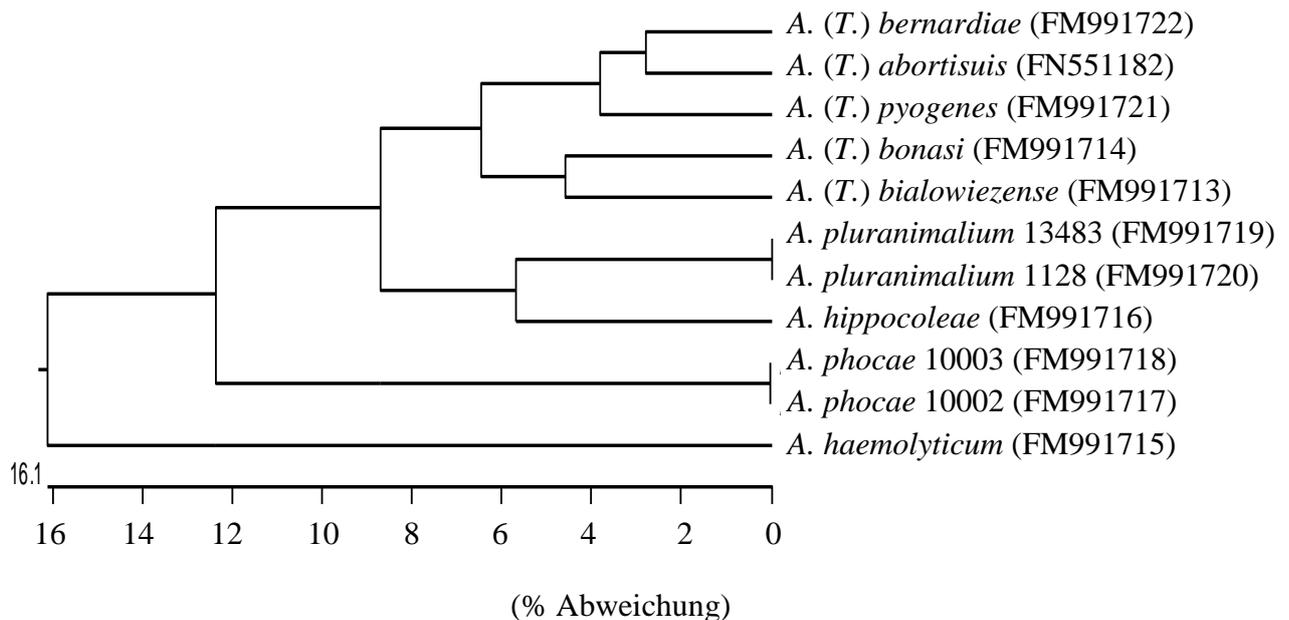
#### 4.1.5.2.3 Amplifizierung und Sequenzierung des 23S rRNA-Gens

Die Amplifizierung der 23S rDNA nach der unter 3.6.8 beschriebenen Methode, ergab für *A. pluranimalium* 1128 ein Amplikon mit einer Größe von ca. 700 Bp (704 Bp erwartete Größe)

(**Abb. 40**). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelte Basensequenz der 23S rDNA der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 wurde unter der GenBank-Zugangsnummer FM991720 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 23S rDNA-Sequenzen der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind in **Abb. 41** dargestellt. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 zeigten untereinander eine Homologie von 100,0 %. *A. pluranimalium* 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 94,1 % bis 97,5 % auf.



**Abb. 40:** Amplikons (ca. 700 Bp) der 23S rDNA von *A. pluranimalium* DSM 13483 (1), *A. pluranimalium* 1128 (2) und von *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (3) unter Verwendung der universellen 23S rDNA-Oligonukleotidprimer 23S-1 und 23S-2a (siehe 3.6.8). M siehe Abb. 7.



**Abb. 41:** Dendrogrammanalyse der 23S rDNA der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 der vorliegenden Untersuchungen und von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.6 Untersuchung von *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi*

##### 4.1.6.1 Phänotypische Eigenschaften

Die im weiteren untersuchten drei *A. (T.) bialowiezense*-Kulturen und sieben *A. (T.) bonasi*-Kulturen zeigten vergleichbare Hämolysereaktionen mit den *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Referenzkulturen (4.1.1.1). Für die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen war eine schmale Hämolysezone auf Schafblutagarplatten nachweisbar. Eine vergleichbare Hämolysereaktion wiesen beide Spezies auf Kaninchenblutagarplatten auf.

Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen zeigten, ebenso wie die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Referenzkulturen, keine synergistischen oder auch antagonistischen Hämolysereaktionen. Die Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die fehlenden synergistischen bzw. antagonistischen Hämolysereaktionen der *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen sind in **Tab. 19** zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 19:** Hämolyseformen, bzw. synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen der *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen und der Referenzkulturen *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163

		<i>A. (T.) bialowiezense</i> n=3	<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	<i>A. (T.) bonasi</i> n=7	<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163
<b>Hämolyse auf</b>	<b>Schaf-BAP</b>	(+)*(3)	(+)	(+)(7)	(+)
	<b>Kaninchen-BAP</b>	(+)(3)	(+)	(+)(7)	(+)
<b>Synergistische Hämolyse mit</b>	<b>Staphylokokken <math>\beta</math>-Hämolysin</b>	-(3)**	-	-(7)	-
	<i>S. agalactiae</i>	-(3)	-	-(7)	-
	<i>R. equi</i>	-(3)	-	-(7)	-
	<i>P. phenylpyruvicus</i>	-(3)	-	-(7)	-
<b>Umgekehrter CAMP-Test</b>		-(3)	-	-(7)	-

n= Zahl der Kulturen; \*= (+), +, ++ Grad der Hämolyse; \*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktion

Alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen waren negativ für die Enzyme Katalase (3.5.3), DNase (3.5.4), Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test (3.5.6). Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen waren ferner negativ für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (3.5.7), zeigten aber eine positive Reaktion für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase. Während alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*-Kulturen eine positive Reaktion für das Enzym Alkalische Phosphatase aufwiesen, zeigten die untersuchten *A. (T.) bonasi*-Kulturen keine vergleichbare Reaktion. Alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen erwiesen sich ferner als positiv für das Enzym Pyrrolidonyl-Arylamidase aber als negativ für das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase (3.5.8). Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen zeigten keine Serolyse auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9) und wiesen keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf (3.5.10). Die phänotypischen Eigenschaften der *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen sind in **Tab. 20** zusammenfassend dargestellt.

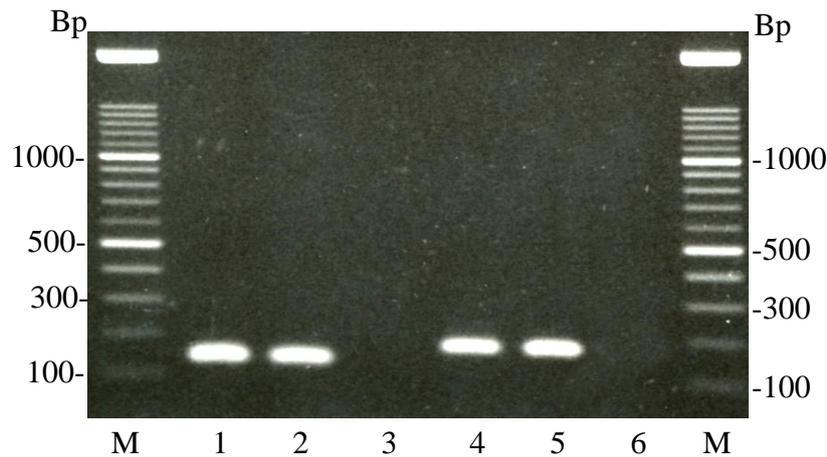
**Tab. 20:** Phänotypischen Eigenschaften der *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen und der beiden Referenzkulturen

Phänotypische Eigenschaften	<i>A. (T.) bialowiezense</i> n=3	<i>A. (T.) bialowiezense</i> DSM 17162	<i>A. (T.) bonasi</i> n=7	<i>A. (T.) bonasi</i> DSM 17163
N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	-(3)	-	-(7)	-
$\beta$ -Galactosidase	-(3)	-	-(7)	-
$\beta$ -Glucuronidase	+(3)	+	+(7)	+
Alkalische Phosphatase	+(3)	+	-(7)	-
$\alpha$ -Mannosidase	-(3)	-	-(7)	-
Pyrrolidonyl-Arylamidase	+(3)	+	+(7)	+
Katalase	-(3)	-	-(7)	-
DNase	-(3)	-	-(7)	-
Hyaluronidase	-(3)	-	-(7)	-
Voges-Proskauer	-(3)	-	-(7)	-
Serolyse auf Löffler-Agar	-(3)	-	-(7)	-
Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum	-(3)	-	-(7)	-

n= Zahl der Kulturen; + = positive Reaktion; (+) = schwache Reaktion; - = negative Reaktion

#### 4.1.6.2 Amplifizierung von *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-ISR-spezifischen Abschnitten

Mit den nach 3.6.11.7 und 3.6.11.8 entwickelten speziesspezifischen Oligonukleotidprimern konnte für *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* jeweils ein speziesspezifisches Amplikon mit einer Größe von ca. 140 Bp (*A. (T.) bialowiezense*, 141 Bp erwartete Größe) bzw. von ca. 180 Bp (*A. (T.) bonasi*, 178 Bp erwartete Größe) nachgewiesen werden. (Abb. 42). Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich unter diesen Bedingungen als negativ.



**Abb. 42:** Amplikons von *A. (T.) bialowiezense* (1, 2) und *A. (T.) bonasi* (4, 5) unter Verwendung der *A. (T.) bialowiezense*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer *Abi-ISR-F* und *Abi-ISR-R* (1-3) und der *A. (T.) bonasi*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer *Abo-ISR-F* und *Abo-ISR-R* (4-6). Negative Reaktionen von *A. (T.) bonasi* (3) und *A. (T.) bialowiezense* (6). M siehe Abb. 7.

#### 4.1.7 Untersuchung von *A. (T.) pyogenes*

##### 4.1.7.1 Phänotypische Eigenschaften

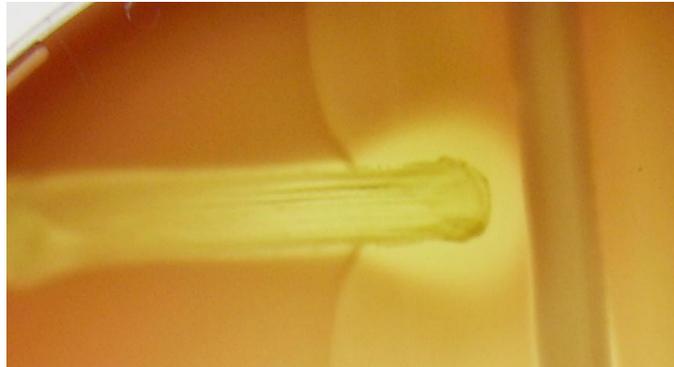
Die im weiteren untersuchten 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, davon 26 Kulturen, isoliert von Rindermastitiden und zwei Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame (3.1), zeigten auf Schafblutagarplatten eine relativ breite Hämolysezone. Auf Kaninchenblutagarplatten zeigten alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen eine vergleichbare Hämolysereaktion. Diese waren ebenso vergleichbar mit der jeweiligen Hämolysezone der *A. (T.) pyogenes*-Referenzkulturen (4.1.1.1) (**Tab. 21**).

Der Nachweis synergistischer bzw. antagonistischer, CAMP-ähnlicher Reaktionen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen wurde nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode durchgeführt.

Synergistische Hämolysereaktionen von *A. (T.) pyogenes* waren mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysin und mit *R. equi* nachweisbar (**Abb. 43**). Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen zeigten keine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins.

Die verschiedenen Hämolyseformen nach Anzüchtung auf Schafblut- bzw. Kaninchenblutagarplatten, sowie die synergistischen und antagonistischen

Hämolysereaktionen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen sind in **Tab. 21** zusammenfassend dargestellt.



**A**



**B**

**Abb. 43:** Typische synergistische Hämolysereaktion von *A. (T.) pyogenes* (horizontal) mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysins (A, vertikal) und mit *R. equi* (B, vertikal).

**Tab. 21:** Hämolyseformen, bzw. synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und der *A. (T.) pyogenes*-Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630

		<i>A. (T.) pyogenes</i> n=28	<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20594	<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630
<b>Hämolyse auf</b>	<b>Schaf-BAP</b>	+(28)*	+	+
	<b>Kaninchen-BAP</b>	+(28)	+	+
<b>Synergistische Hämolyse mit</b>	<b>Staphylokokken <math>\beta</math>-Hämolysin</b>	+(28)**	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	-(28)	-	-
	<i>R. equi</i>	+(28)	+	+
	<i>P. phenylpyruvicus</i>	-(28)	-	-
<b>Umgekehrter CAMP-Test</b>		-(28)	-	-

n= Zahl der Kulturen; \*= (+), +, ++ Grad der Hämolyse;

\*\*= vorhandene + oder fehlende - synergistische bzw. antagonistische Hämolysereaktion

Die biochemischen Eigenschaften der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen wurden für 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, freundlicherweise von Frau K. Schlez (LHL) mit dem „API-Coryne-Testsystem“ (3.5.2) überprüft und zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse, gemeinsam mit den phänotypischen Eigenschaften der beiden *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, und die Eigenschaften der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 sind in **Tab. 22** zusammenfassend dargestellt. Alle 28 untersuchten *A. (T.) pyogenes*-Kulturen wiesen eine negative Reaktion für das Enzym Katalase (3.5.3) und eine positive Reaktion auf DNase-Test-Agar (3.5.4) auf. Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen erwiesen sich ferner als negativ für das Enzym Hyaluronidase (3.5.5) und auch im Voges-Proskauer-Test (3.5.6). Die Ergebnisse für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase (3.5.7) und für die Enzyme Alkalische Phosphatase, Pyrrolidonyl-Arylamidase und  $\alpha$ -Mannosidase (3.5.8) sind ebenso in **Tab. 22** zusammenfassend dargestellt. Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen zeigten, vergleichbar mit den Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630, eine deutliche Serolysereaktion auf der Serumplatte nach Löffler (3.5.9) und eine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum (3.5.10) (**Tab. 22**).

**Tab. 22:** Phänotypische Eigenschaften der 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630

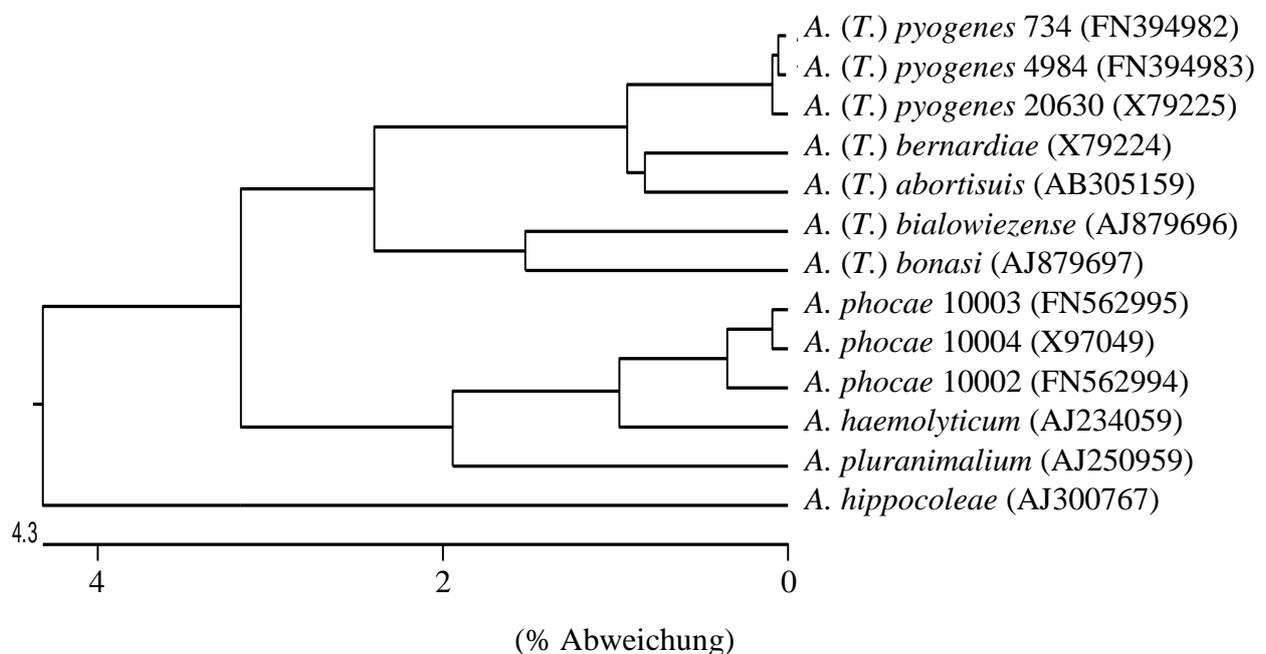
Phänotypische Eigenschaften	<i>A. (T.) pyogenes</i> n=28	<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20594	<i>A. (T.) pyogenes</i> DSM 20630
Nitratreduktion	+(1) <sup>1</sup> , -(27) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrazinamidase	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Pyrrolidonyl-Arylamidase	+(26) <sup>1</sup> , -(2) <sup>1</sup> ; +(25) <sup>3</sup> , (+)(3) <sup>3</sup>	+ <sup>1,3</sup>	+ <sup>1</sup> , - <sup>3</sup>
Alkalische Phosphatase	+ <sup>1</sup> ; +(25) <sup>3</sup> , (+)(3) <sup>3</sup>	- <sup>1,3</sup>	- <sup>1,3</sup>
β-Glucuronidase	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
β-Galactosidase	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
α-Glucosidase	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	+(4) <sup>1</sup> , -(24) <sup>1</sup> ; + <sup>2</sup>	+ <sup>1,2</sup>	+ <sup>1,2</sup>
Äsculin (β-Glucosidase)	+(1) <sup>1</sup> , -(27) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Urease	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Gelatine	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Glucose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Ribose	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Xylose	+(27) <sup>1</sup> , -(1) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Mannitol	+(4) <sup>1</sup> , -(24) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Maltose	+(27) <sup>1</sup> , -(1) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Lactose	+(25) <sup>1</sup> , -(3) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Saccharose	+(24) <sup>1</sup> , (+)(1) <sup>1</sup> , -(3) <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Glycogen	+(3) <sup>1</sup> , -(25) <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Katalase	-	-	-
α-Mannosidase	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>
DNase	+	+	+
Hyaluronidase	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Serolyse auf Löffler-Medium	+	+	+
Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum	+	+	+

n= Zahl der Kulturen; += positive Reaktion; (+)= schwache Reaktion; -= negative Reaktion; 1= „API-Coryne-Testsystem“ (siehe 3.5.2); 2= 4-Methylumbelliferyl-konjugierte Substrate (siehe 3.5.7); 3= Tablettentest (siehe 3.5.8)

#### 4.1.7.2 Amplifizierung und Sequenzierung unterschiedlicher Genomabschnitte der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen

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

Die Amplifizierung der 16S rDNA der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, nach der unter 3.6.6 beschriebenen Methode, ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 1400 Bp (1392 Bp erwartete Größe). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen der 16S rDNA der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern FN394982 und FN394983 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der 16S rDNA-Sequenzen der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen sowie von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind **Abb. 44** zu entnehmen. Die zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, und die Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 zeigten untereinander eine Homologie zwischen 98,9 % bis 99,5 %. Die zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und die Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 90,7 % bis 96,7 % auf.

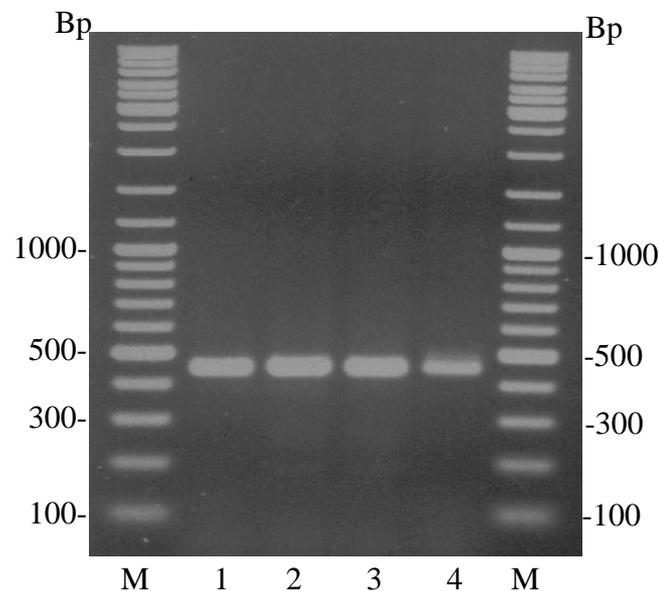


**Abb. 44:** Dendrogrammanalyse der 16S rDNA der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

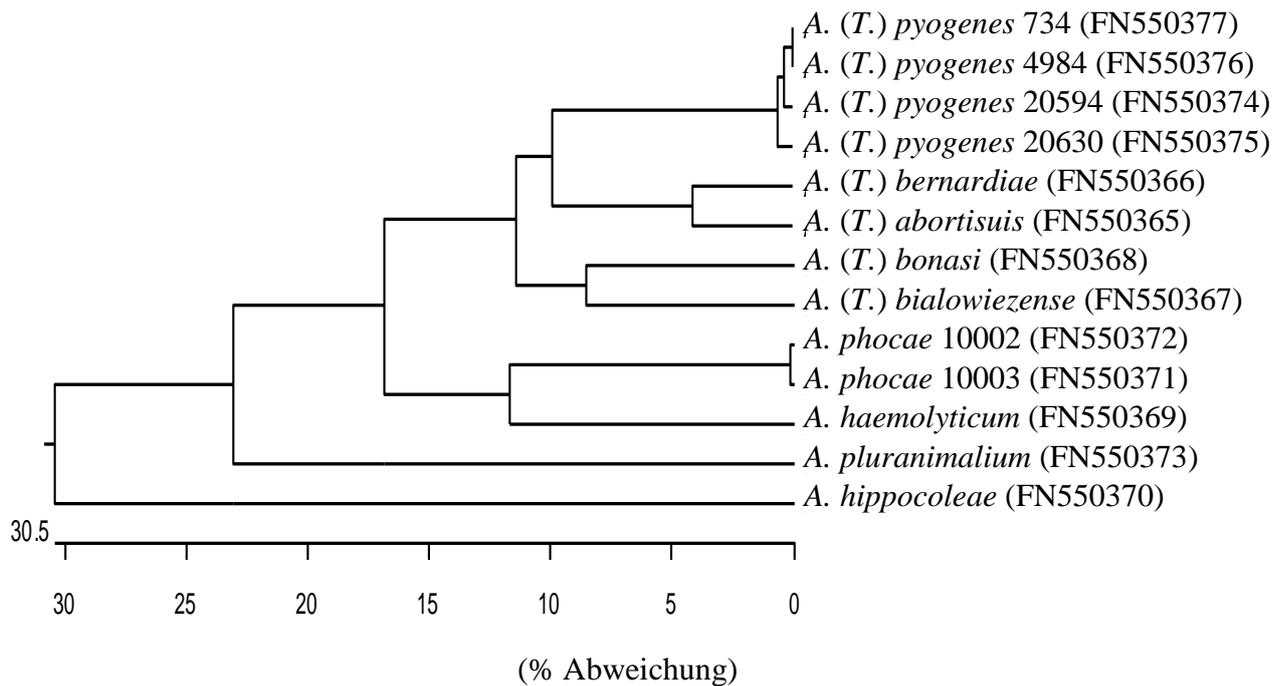
#### 4.1.7.2.2

### Amplifizierung und Sequenzierung des Gens *rpoB*

Die Amplifizierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase kodierenden Gens *rpoB* der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, nach der unter 3.6.10 beschriebenen Methode, ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 450 Bp (446 Bp erwartete Größe) (**Abb. 45**). Die nach Sequenzierung (3.6.5) ermittelten Basensequenzen des *rpoB*-Gens der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen wurden unter den GenBank-Zugangsnummern FN550376 und FN550377 abgelegt. Eine Dendrogrammanalyse der *rpoB*-Sequenzen der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* sind aus **Abb. 46** zu entnehmen. Die zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen von Gecko und Bartagame, und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 zeigten auf DNA-Ebene untereinander eine Homologie zwischen 98,5 % bis 100,0 %. Die zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 wiesen zu den acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Homologie zwischen 65,8 % bis 82,5 % auf.



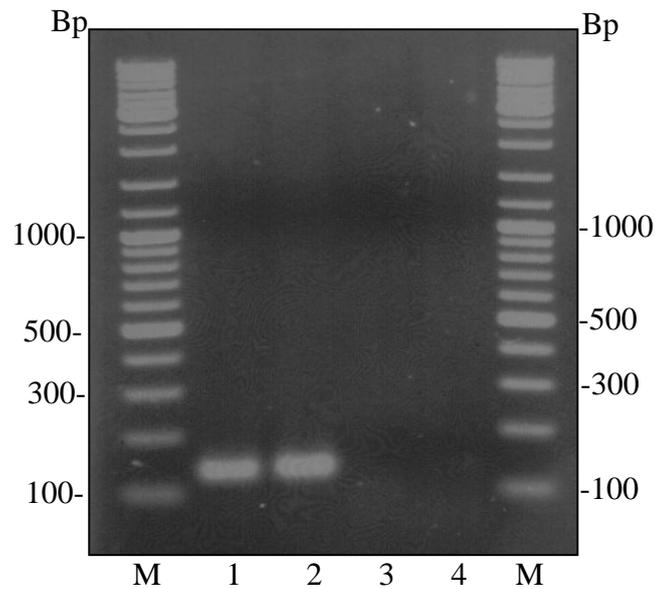
**Abb. 45:** Amplikons (ca. 400 Bp) von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 (1), *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (2), *A. (T.) pyogenes* 734 (3) und *A. (T.) pyogenes* 4984 (4) unter Verwendung der universellen *rpoB*-spezifischen Oligonukleotidprimer C2700-F und C3130-R (siehe 3.6.10). M siehe Abb. 7.



**Abb. 46:** Dendrogrammanalyse des Gens *rpoB* der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einem Gecko und einer Bartagame, und von elf Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

#### 4.1.7.2.3 Amplifizierung von *A. (T.) pyogenes*-ISR-spezifischen Abschnitten

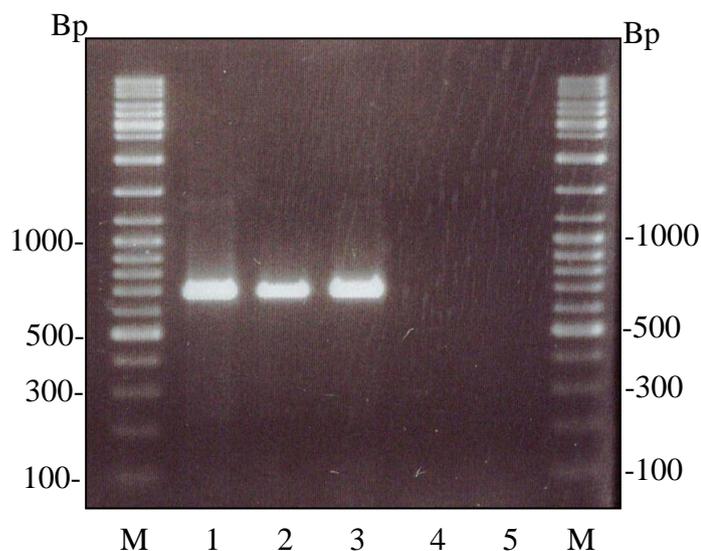
Mit den nach 3.6.11.9 entwickelten *A. (T.) pyogenes*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimern konnte für alle 28 untersuchten *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 ein speziesspezifisches Amplikon mit einer Größe von ca. 120 Bp (122 Bp erwartete Größe) nachgewiesen werden (**Abb. 47**). Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich als negativ.



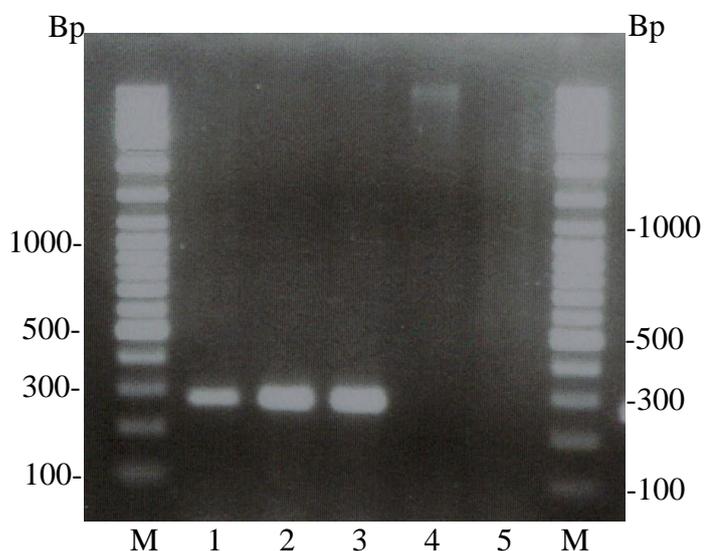
**Abb. 47:** Amplikons (ca. 120 Bp) von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 (1) und *A. (T.) pyogenes* 234/198 (2) unter Verwendung der *A. (T.) pyogenes*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer Apy-ISR-F und Apy-ISR-R. Negative Reaktionen von *A. haemolyticum* DSM 20595 (3) und *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (4). M siehe Abb. 7.

#### 4.1.7.2.4 Nachweis des *A. (T.) pyogenes*-Pyolysin-kodierenden Gens *ply*

Die Amplifizierung des Pyolysin-kodierenden Gens *ply* von 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630, erfolgte nach der unter 3.6.11.10 beschriebenen Methode. Die Amplifizierung des *A. (T.) pyogenes*-spezifischen Gens *ply* mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Oligonukleotidprimern (3.6.11.10) ergab für alle 30 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 700 Bp (704 Bp erwartete Größe) (**Abb. 48**) und mit den von Ertas et al. (2005) beschriebenen Oligonukleotidprimern (3.6.11.10) ein Amplikon mit einer Größe von ca. 270 Bp (270 Bp erwartete Größe) (**Abb. 49**). Die anderen untersuchten *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ.



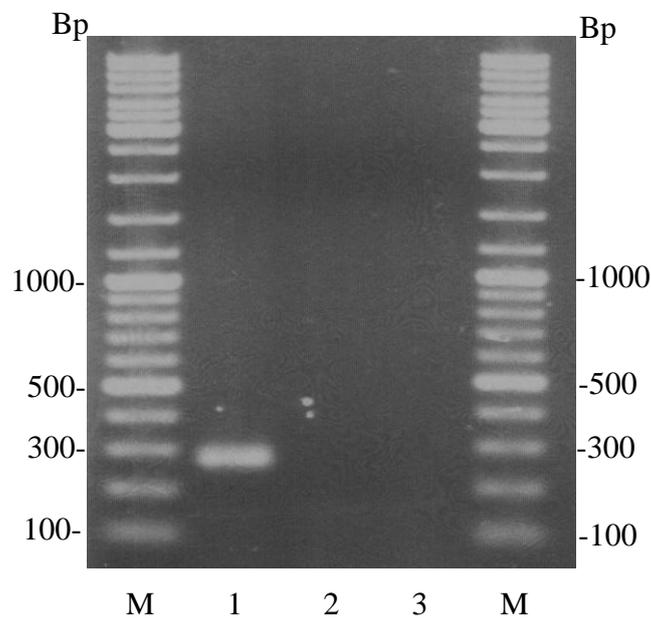
**Abb. 48:** Amplikons (ca. 700 Bp) von *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 (1), *A. (T.) pyogenes* 162/1 (2) und *A. (T.) pyogenes* 226/124 (3) unter Verwendung der *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer *plo-F* und *plo-R*. Negative Reaktionen von *A. haemolyticum* DSM 20595 (4) und *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 (5). M siehe Abb. 7.



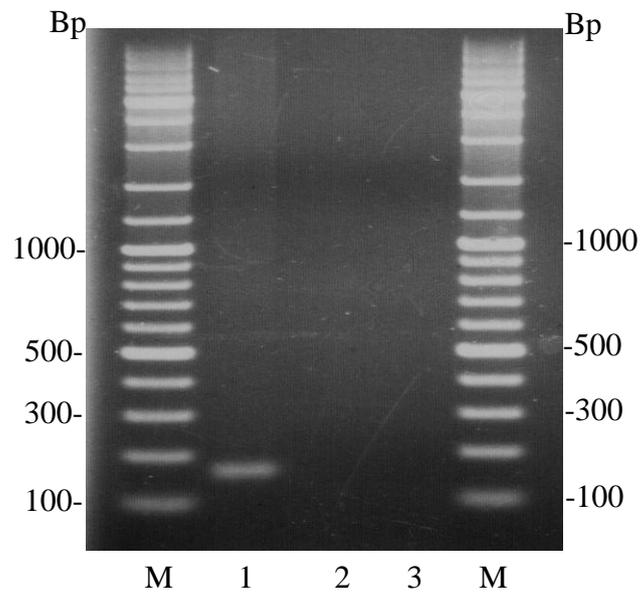
**Abb. 49:** Amplikons von *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 (1), *A. (T.) pyogenes* 233/122 (2) und von *A. (T.) pyogenes* 52/4 (3) unter Verwendung der von Ertas et al. (2005) beschriebenen *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer *plo-F* und *plo-R* mit einer Größe von ca. 270 Bp. Negative Reaktionen von *A. (T.) abortus* DSM 19515 (4) und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 (5). M siehe Abb. 7.

#### 4.1.8 Amplifizierung von *A. hippocoleae*- und *A. (T.) bernardiae*-16S rDNA bzw. ISR-spezifischen Abschnitten

Mit den nach 3.6.11.5 und 3.6.11.6 entwickelten speziesspezifischen Oligonukleotidprimern konnte für *A. hippocoleae* und *A. (T.) bernardiae* jeweils ein speziesspezifisches Amplikon mit einer Größe von ca. 270 Bp (*A. hippocoleae*, 265 Bp erwartete Größe) bzw. ca. 160 Bp (*A. (T.) bernardiae*, 157 Bp erwartete Größe) nachgewiesen werden (**Abb. 50**, **Abb. 51**). Alle anderen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich als negativ.



**Abb. 50:** Amplikons (ca. 270 Bp) von *A. hippocoleae* DSM 15539 (1) unter Verwendung der *A. hippocoleae*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer Ahi-16S rDNA-ISR-F und Ahi-ISR-R. Negative Reaktionen von *A. pluranimalium* DSM 13483 (2) und *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 (3). M siehe Abb. 7.



**Abb. 51:** Amplikons (ca. 160 Bp) von *A. (T) bernardiae* DSM 9152 (1) unter Verwendung der *A. (T) bernardiae*-ISR-spezifischen Oligonukleotidprimer Abe-16S rDNA-ISR-F und Abe-ISR-R. Negative Reaktionen von *A. phocae* DSM 10002 (2) und *A. (T) abortus* DSM 19515 (3). M siehe Abb. 7.

### 5.1 Phänotypische und genotypische Eigenschaften der Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*

Unter bakteriellen Hämolytinen versteht man membranzerstörende Exotoxine („membrane-damaging-toxins“), die in der Literatur auch als Zytolysine bezeichnet werden (McCartney und Arbuthnott, 1978). Diese Exosubstanzen schädigen Erythrozyten und andere Zellarten und bewirken bei der Anzucht der Bakterien auf Blutagarplatten unterschiedliche Hämolytisen, d.h. unterschiedlich starke Zersetzungen von Erythrozyten. Eine Unterscheidung der verschiedenen Hämolytine erfolgt, neben der Beurteilung der Art ihrer Hämolyse nach Anzucht auf Blutagarplatten mit Blut unterschiedlicher Herkunft, auch auf der Basis synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen mit Stoffwechselprodukten anderer Bakterienspezies (Skalka et al., 1979; Hebert und Hancock, 1985; Lämmler und Blobel, 1987). Das einzige bislang weitergehend charakterisierte Hämolytin von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* ist das Pyolysin von *A. (T.) pyogenes* (Ding und Lämmler, 1996; Billington et al., 1997). Dieses Hämolytin wurde als Cholesterol-abhängiges Zytolysin beschrieben (Billington et al., 1997).

Nach Anzucht der in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Referenzkulturen auf Schafblutagarplatten war eine relativ breite Hämolysezone für *A. phocae*, *A. pluranimalium* und *A. (T.) pyogenes* und eine schmale Hämolysezone für *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* nachweisbar.

Eine Hämolyseverstärkung, d.h. eine Verbreiterung der Hämolysezone, wurde schon früher für *A. haemolyticum* nach Anzucht auf Human-, Pferde- oder Kaninchenblutagarplatten im Vergleich zu Schafblutagarplatten beschrieben (Potel, 1982; Lämmler und Blobel, 1988). Dies konnte bereits als zusätzliches Kriterium zur Identifizierung von *A. haemolyticum* eingesetzt werden (Lämmler und Blobel, 1988). In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine vergleichbare Hämolyseverstärkung für einige weitere Referenzkulturen der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* nachgewiesen. Nach Anzucht auf Kaninchenblutagarplatten zeigten neben *A. haemolyticum* auch *A. pluranimalium* und *A. hippocoleae* eine verstärkte Hämolyse, wobei die Hämolyseverstärkung von *A. pluranimalium* und *A. hippocoleae*, im Vergleich zur Hämolyseverstärkung von *A.*

*haemolyticum*, weniger ausgeprägt war. Eine Verstärkung der Hämolyse von *C. pseudotuberculosis*, *A. haemolyticum* und von *C. ulcerans* wurde auch durch das Antibiotikum Polymyxin B hervorgerufen. Dabei reagierte das Polymyxin B mit dem negativ geladenen Ceramid-Phosphat, welches durch Sphingomyelinase von der Zellmembran freigesetzt worden war (Lämmler und Blobel, 1987).

Als charakteristische Eigenschaft von Streptokokken der serologische Gruppe B ist weltweit die positive CAMP-Reaktion, die nach den Anfangsbuchstaben der Erstbeschreiber Christie, Atkins und Munch-Petersen (1944) bezeichnet wurde, bekannt. Bei diesem diagnostischen Hilfsmittel kommt es durch ein extrazelluläres Protein von Streptokokken der serologischen Gruppe B, dem sogenannten CAMP-Faktor, in der unvollständigen Hämolysezone des  $\beta$ -Toxins, einer Sphingomyelinase von *S. aureus*, zu einer synergistischen Hämolyse von Schaferythrozyten (Bernheimer et al., 1979; Linder, 1984). Vergleichbare synergistische, CAMP-ähnliche Reaktionen wurden für *R. equi*, ebenso im Bereich des  $\beta$ -Toxins von *S. aureus* beschrieben (Fraser, 1964; Prescott et al., 1982; Lämmler und Blobel, 1987). Der Nachweis von synergistischen, CAMP-ähnlichen Reaktionen von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* erfolgte bislang für *A. haemolyticum*, *A. phocae* und *A. (T.) pyogenes* (Fraser, 1964; Lämmler und Blobel, 1987; 1988; Lämmler, 1994; Linder, 1997; Almuzara et al., 2002; Johnson et al., 2003). Fraser (1964) konnte für *A. haemolyticum* (*Corynebacterium haemolyticum*) und für *A. (T.) pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*) auch eine synergistische Hämolyse untereinander feststellen. In der vorliegenden Arbeit waren synergistische, CAMP-ähnliche Reaktionen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin für *A. pluranimalium*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) abortisuis* und *A. (T.) pyogenes*, mit *S. agalactiae* für *A. phocae* und *A. haemolyticum* und mit *R. equi* für *A. phocae*, *A. haemolyticum*, *A. pluranimalium*, *A. (T.) abortisuis* und *A. (T.) pyogenes* nachweisbar.

Darüber hinaus wurde erstmalig eine neuartige synergistische Hämolysereaktion zwischen einer *P. phenylpyruvicus*-Kultur, isoliert von einem Seehund, und Exosubstanzen von *A. phocae* und auch *A. haemolyticum* festgestellt. Die zunächst nicht sicher identifizierte *P. phenylpyruvicus*-Kultur konnte durch 16S rDNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen als *P. phenylpyruvicus* erkannt werden. Die 16S rDNA-Sequenz der *P. phenylpyruvicus*-Kultur der vorliegenden Untersuchung zeigte eine nahezu vollständige Identität mit der 16S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *P. phenylpyruvicus* DSM 7000. Die 16S rDNA-Sequenz der *P. phenylpyruvicus*-Kultur der vorliegenden Untersuchung wurde unter der GenBank-Nummer

EU915471 abgelegt. Die CAMP-ähnliche Reaktion von *A. phocae* und *A. haemolyticum* mit der vergleichsweise untersuchten *P. phenylpyruvicus*-Kultur DSM 7000 war, im Gegensatz zu der CAMP-ähnlichen Reaktion der von einem Seehund isolierten *P. phenylpyruvicus*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen, weniger ausgeprägt (nicht aufgeführt im Ergebnissteil). Dies deutet auf stammspezifische Unterschiede in der Expression der verantwortlichen Exosubstanz hin. Die stoffliche Natur der Exosubstanz von *P. phenylpyruvicus* ist bislang unbekannt.

Die umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins ist eine bereits bekannte charakteristische Eigenschaft von *A. haemolyticum* (Fraser, 1964; Lämmler und Blobel, 1987; 1988; Lämmler, 1994; Lämmler und Hartwig, 1995; Linder, 1997; Almuzara et al., 2002) und bei den neu beschriebenen *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies von *A. phocae* (Johnson et al., 2003). Bei beiden *A. phocae*-Referenzkulturen und der *A. haemolyticum*-Referenzkultur der vorliegenden Untersuchungen war ebenso eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der unvollständigen Hämolysezone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins nachweisbar. Linder (1997) konnte für *A. haemolyticum* eine synergistische Hämolyse mit *R. equi* und auch eine umgekehrte CAMP-Reaktion im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins nachweisen.

Die *A. (T.) bernardiae*-, *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Referenzkulturen der vorliegenden Untersuchungen zeigten keine synergistischen oder auch antagonistischen Hämolysereaktionen.

Sowohl die Hämolysereaktionen von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* auf Schaf- und Kaninchenblutagarplatten, als auch die synergistischen Hämolysereaktionen und auch die umgekehrte CAMP-Reaktion von *A. phocae* und *A. haemolyticum* im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins können somit nach heutigem Kenntnisstand in der Routinediagnostik zur vorläufigen Einordnung von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eingesetzt werden.

Zur biochemischen Charakterisierung der Referenzkulturen der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen das kommerzielle Identifizierungssystem „API-Coryne“ als hilfreich. Freney et al. (1991) und Gavin et al. (1992) beschrieben die Anwendung des Identifizierungssystems „API-Coryne“ bzw. „Rapid-Coryne“ im Vergleich zu konventionellen Methoden zur Identifizierung von Bakterien der Gattung *Corynebacterium* und anderen coryneformen Bakterien, darunter auch *A. haemolyticum* und *A. (T.) pyogenes*. Die Ergebnisse des Identifizierungssystems „API-

Coryne“ der 11 untersuchten *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen der vorliegenden Untersuchungen stimmten weitestgehend mit den Untersuchungsergebnissen von Ding und Lämmler (1992), Ramos et al. (1997), Lawson et al. (2001), Hoyles et al. (2002), Johnson et al. (2003), Lehnen et al. (2006) und Azuma et al. (2009) überein.

Zusätzlich wurde die Untersuchung der Enzyme Katalase, DNase und Hyaluronidase sowie der Voges-Proskauer-Test durchgeführt.

Katalase löst  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) auf. Dadurch schützen sich phagozytierte Bakterien gegen das in den Phagozyten gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Bildung des Enzyms Katalase war, innerhalb der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, als eine typische Eigenschaft für *A. pluranimalium* und *A. phocae* nachweisbar. Alle anderen sieben *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies erwiesen sich als katalasenegativ. Diese Ergebnisse entsprachen den Angaben von Collins et al. (1982b), Ding und Lämmler (1992), Ramos et al. (1997), Lawson et al. (2001), Hoyles et al. (2002), Johnson et al. (2003), Lehnen et al. (2006) und Azuma et al. (2009).

Das Vorhandensein des Enzyms DNase wurde mit Hilfe des Fertignährmediums DNase-Testagar nach Jeffries et al. (1957) untersucht. Die Kulturen, die diese Enzyme bildeten, zeigten den Abbau der dem Nährmedium zugesetzten Desoxyribonukleinsäure durch Bildung eines klaren Hofes um die Kolonien, wenn die Agarplatte nach der Bebrütung mit Salzsäure überschichtet wurde. Außer *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* erwiesen sich alle *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen als DNase-positiv. Für ein eventuell nur schwaches DNase-Bildungsvermögen der hier negativen Spezies *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* ist der verwendete DNase-Testagar offenbar nicht geeignet. Der Nachweis des Enzyms DNase bei Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurde bislang nur für *A. haemolyticum* und *A. (T.) pyogenes* beschrieben (Collins et al., 1982b; Lämmler und Blobel, 1988; Ding und Lämmler, 1992; Lämmler und Hartwig, 1995; Goyal et al., 2005; Parija et al., 2005).

Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase wurde mittels des von Winkle (1979) beschriebenen Dekapsulationstests geprüft und zeigte sich als Hemmung des mukoiden Wachstums einer *S. equi* subsp. *equi*-Testkultur. Dieses Enzym konnte für Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* nicht nachgewiesen werden.

Mit dem Voges-Proskauer-Test werden Bakterienkulturen auf die Bildung von Acetoin (Acetylmethylcarbinol) geprüft, das im alkalischen Milieu mit  $\alpha$ -Naphthol eine Rotfärbung bewirkt (Voges und Proskauer, 1898). Dieser Test kann zur biochemischen Differenzierung

von Bakterien eingesetzt werden; ebenso wie für den Hyaluronidasenachweis beschrieben, erwiesen sich alle untersuchten Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* als Voges-Proskauer-negativ.

Ein weiterer Enzymnachweis war in der vorliegenden Arbeit mit Methylumbelliferyl-konjugierten-Substraten möglich (3.5.7). Der Test mit Methylumbelliferyl-konjugierten-Substraten beruht auf dem Nachweis von bestimmten Enzymen, die Methylumbelliferyl-konjugierte-Substrate spalten können. Dieser erfolgte nach Maddocks und Greenan (1975) und Slifkin und Gil (1983) durch Abspaltung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons von dem nicht-fluoreszierenden Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid, 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid oder 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid. Im positiven Fall zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz unter UV-Licht.

Der zusätzlich durchgeführte Nachweis der Enzyme Alkalische Phosphatase,  $\alpha$ -Mannosidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase durch den unter 3.5.8 beschriebenen Tablettentest ermöglichte ebenso eine weitergehende Differenzierung von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*. Das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase wurde bereits früher als typisch für *A. haemolyticum* beschrieben (Carlson und Kontiainen, 1994).

Die Reaktionen der Enzyme  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, Alkalische Phosphatase und Pyrrolidonyl-Arylamidase mit den jeweiligen Substraten bestätigten weitestgehend die Ergebnisse des „API-Coryne-Identifizierungssystems“.

Vereinzelte auftretende abweichende Reaktionen könnten auf Unterschiede in der Empfindlichkeit der Testsysteme zurückzuführen sein. Die durchgeführten Enzymnachweise mit Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten bzw. mit dem Tablettentest erwiesen sich als hilfreich für eine zeit- und kostengünstige Differenzierung von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* und könnten Einsatz in der Routinediagnostik finden.

Die Serumplatte nach Löffler eignete sich für den Nachweis der Serolyse, d.h. für den Nachweis proteolytischer Eigenschaften.

Mit Hilfe eines kommerziellen Latex-Objekträgeragglutinationstests konnten die Bakterienkulturen im weiteren hinsichtlich des kreuzreagierenden Antigens der Streptokokken-Lancefield Serogruppe G geprüft werden. Sowohl die Serumplatte nach Löffler als auch die Kreuzreaktion mit Serogruppe G-spezifischem Antiserum wurden als typische Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes* beschrieben (Hartwig und Marcus, 1962; Bisping und Amstberg, 1988; Lämmler und Blobel, 1988; Lämmler und Hartwig, 1995). In den vorliegenden Untersuchungen zeigten außer *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.)*

*pyogenes* DSM 20630 keine der anderen Referenzkulturen der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* proteolytische Aktivitäten auf dem Löffler-Medium, bzw. eine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum.

Die direkteste und genaueste Methode zur Identifizierung einer Bakterienspezies ist die Amplifizierung und Sequenzierung bestimmter Zielgene oder Genomabschnitte. Dies liefert auch Daten zum genetischen Vergleich von Bakterienkulturen, wie zum Beispiel bei der Untersuchung epidemiologischer oder phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen. In den vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich dazu das 16S rRNA-Gen, die 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR), das 23S rRNA-Gen, das Superoxid Dismutase A-kodierende Gen *sodA* und das die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase-kodierende Gen *rpoB* als geeignet.

Für die vorliegenden Referenzkulturen der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden die ISR (3.6.7), die 23S rDNA (3.6.8), das Gen *sodA* (3.6.9) und das Gen *rpoB* (3.6.10) amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung der ISR, der 23S rDNA und der Gene *sodA* und *rpoB* der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen ermöglichte, ebenso wie die bislang durchgeführte Sequenzierung der 16S rDNA, eine bislang noch nicht beschriebene, eindeutige genotypische Unterscheidung der verschiedenen Bakterienspezies der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* und bestätigte die jüngst von Yassin et al. (2010) vorgeschlagene Trennung der Gattungen *Arcanobacterium* und *Trueperella*.

Die Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der ISR waren in konservierten Regionen des 16S rRNA- und des 23S rRNA-Gens lokalisiert. Die zuerst von Kostman et al. (1995) beschriebenen und von Chanter et al. (1997) zur molekularen Identifizierung von Bakterien der Gattung *Streptococcus* verwendeten, universellen Oligonukleotidprimer wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig zur molekularen Identifizierung von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* verwendet. Aufgrund der ausgewählten Oligonukleotidprimer beinhalteten die Amplikons die ISR und Teilabschnitte der 16S rDNA und der 23S rDNA. Die amplifizierten ISR der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen mit den beiden Teilabschnitten zeigten unterschiedliche Amplikons mit einer Größe zwischen 580 und 620 Bp. Die nach Auswertung der ISR-Sequenzen erhaltenen Größen der ISR variierten zwischen 333 und 380 Bp. Die ISR-Sequenzen von zehn Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden durch Dendrogrammanalyse untersucht. Dies ermöglichte, ebenso wie

die vergleichsweise durchgeführte Dendrogrammanalyse der 16S rDNA-Sequenzen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies, eine eindeutige Unterscheidung und Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eine Sequenzheterogenität im Bereich der ISR und im Bereich der benachbarten 16S rDNA und der 23S rDNA aufwiesen, die sich zur Identifizierung verschiedener Spezies dieser Gattung eignete. Diese Sequenzheterogenität erwies sich desweiteren als hilfreich für die Auswahl von Bereichen für Ansatzstellen speziesspezifischer Oligonukleotidprimer. In der vorliegenden Arbeit wurden für die *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies *A. phocae*, *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) bernardiae*, *A. (T.) bialowiezense*, *A. (T.) bonasi* und *A. (T.) pyogenes* speziesspezifische Oligonukleotidprimer erstellt. Die Oligonukleotidprimer-Ansatzstellen für *A. hippocoleae* und *A. (T.) bernardiae* lagen dabei im Bereich der ISR und der benachbarten 16S rDNA und für *A. phocae* und *A. haemolyticum* im Bereich der ISR und der benachbarten 23S rDNA und für *A. (T.) bialowiezense*, *A. (T.) bonasi* und *A. (T.) pyogenes* ausschließlich im Bereich der ISR.

Eine Sequenzierung des 23S rRNA-Gens von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurde bereits von Jost et al. (2004b) zur Erkennung von 23S rDNA-Mutanten makrolidresistenter *A. (T.) pyogenes* durchgeführt. Zur Amplifizierung der 23S rDNA der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen der vorliegenden Untersuchungen wurde der von Jost et al. (2004b) beschriebene Oligonukleotidprimer 23S-1 und der ebenso von Jost et al. (2004b) beschriebene und in der vorliegenden Arbeit modifizierte Oligonukleotidprimer 23S-2a verwendet. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 730 Bp. Die 23S rDNA-Sequenzen von 10 Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden amplifiziert, sequenziert und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte ebenso eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen.

Eine Amplifizierung und Sequenzierung des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* von *A. phocae* DSM 10002, *A. haemolyticum* DSM 20595, *A. pluranimalium* DSM 13483, *A. (T.) bernardiae* DSM 9152 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 erfolgte mit den von Zolig und Philippi-Schulz (1994) zur *sodA*-Sequenzierung von Bakterien der Gattung *Mycobacterium* beschriebenen Oligonukleotidprimern. Das *sodA*-Amplikon der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen ergab Größen von ca. 490 Bp. Nach Sequenzierung des *sodA*-Amplikons der oben genannten *Arcanobacterium*- bzw.

*Trueperella*-Referenzkulturen konnte mit den erhaltenen *sodA*-Sequenzen ein zweites universelles Oligonukleotidprimerpaar entwickelt werden. Mit diesem war das *sodA*-Gen von *A. hippocoleae* DSM 15539, *A. (T.) abortisuis* DSM 19515 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163 amplifizierbar, nicht aber das *sodA*-Gen von *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 300 Bp. Das *sodA*-Gen von acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurde nunmehr durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte ebenso eine eindeutige Abgrenzung von acht Spezies dieser Gattung. Eine Sequenzierung des *sodA*-Gens von *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 steht bislang noch aus.

Im weiteren wurden zur Sequenzierung des Gens *rpoB* der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen die von Khamis et al. (2004) zur Amplifizierung von *rpoB*-Genen von Bakterien der Gattung *Corynebacterium* eingesetzten Oligonukleotidprimer verwendet. Das amplifizierte *rpoB*-Gen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen, erstmalig zur molekularen Identifizierung von Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* eingesetzt, zeigte Amplikons mit einer Größe von ca. 450 Bp. Die *rpoB*-Gene von 11 Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden sequenziert und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Auch dies ermöglichte eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen.

Bei einem Vergleich der Dendrogrammanalysen der Zielgene bzw. der Genomabschnitte untereinander zeigten die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, ISR-, 23S rDNA-, *sodA*- und *rpoB*-Gen- bzw. Genomabschnitte ähnliche Verwandtschaftsbeziehungen der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Spezies untereinander wie eine vergleichsweise durchgeführte Dendrogrammanalyse der 16S rDNA.

## **5.2 Phänotypische und genotypische Eigenschaften von *A. phocae***

Eine erste Beschreibung von *A. phocae* aus Untersuchungsproben von Meeressäugern erfolgte von Ramos et al. (1997). Johnson et al. (2003) konnten in einer weiteren Arbeit *A. phocae* aus Untersuchungsproben von Seehund, Kegelrobbe, Kalifornischem Seelöwen, Nördlichem See-Elefanten, Kalifornischem Seeotter und Delfin nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden 43 *A. phocae*, isoliert von Seehunden und einer Kegelrobbe, phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

Nach Anzuchtung der *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Arbeit (n=45), dies beinhaltete auch die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, auf Schafblutagarplatten war die Ausbildung einer Hämolyse feststellbar. Nach Ramos et al. (1997) und Johnson et al. (2003) wurde für *A. phocae* eine  $\beta$ -Hämolyse beschrieben. Die nähere Charakterisierung des Hämolsins von *A. phocae* steht bislang noch aus. Nach der Größe der Hämolysezone konnten die *A. phocae*-Kulturen in zwei Gruppen unterschieden werden. Für 15 der 45 untersuchten *A. phocae*-Kulturen, einschließlich der Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, war eine relativ breite Hämolysezone auf Schafblutagarplatten feststellbar. Die verbleibenden Kulturen (n=30) zeigten eine weniger ausgeprägte Hämolysezone. Nach Anzuchtung auf Kaninchenblutagarplatten war für alle *A. phocae*-Kulturen, einschließlich der Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, im Vergleich zur Anzuchtung auf Schafblutagarplatten, keine Hämolyseverstärkung nachweisbar.

Synergistische, CAMP-ähnliche Reaktionen der *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Arbeit waren, wie bereits für die beiden *A. phocae*-Referenzkulturen beschrieben (5.1), für alle 43 untersuchten Kulturen mit *S. agalactiae*, mit *R. equi* und mit den bislang noch nicht beschriebenen Exosubstanzen von *P. phenylpyruvicus* nachweisbar; ferner eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins. Eine vergleichbare synergistische und antagonistische Hämolysereaktion von *A. phocae* mit *R. equi* bzw. mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin war auch von Johnson et al. (2003) beschrieben worden.

Die Größe der Hämolysezone auf Schafblutagarplatten und die synergistischen und antagonistischen Hämolysereaktionen von *A. phocae* mit Exosubstanzen verschiedener Bakterienspezies könnten zukünftig in der Routinediagnostik zur vorläufigen Einordnung von *A. phocae* eingesetzt werden.

Zur biochemischen Charakterisierung der 43 *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen, wie auch der Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 (5.1), erwies sich das kommerzielle Identifizierungssystem „API-Coryne“ als hilfreich. Die Ergebnisse wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Ramos et al. (1997), Pascual et al. (1999), Lawson et al. (2001), Hoyles et al. (2002), Johnson et al. (2003) und Lehnen et al. (2006) auf.

Das Enzym Katalase war bei allen 45 *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen, einschließlich der Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003 (5.1), nachweisbar. Die Bildung des Enzyms Katalase gilt als eine typische Eigenschaft dieser

Spezies (Johnson et al., 2003). Ramos et al. (1997) konnten das Enzym Katalase bei mehr als der Hälfte ihrer *A. phocae*-Kulturen nachweisen. Bei Bakterien der Gattung *Arcanobacterium* wurden von Lawson et al. (2001) Katalaseaktivitäten für *A. phocae* und auch für *A. pluranimalium* beschrieben.

Innerhalb der 45 *A. phocae*-Kulturen erwiesen sich 44 Kulturen als DNase-positiv. Das eventuell schwache DNase-Bildungsvermögen der negativen *A. phocae*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen konnte möglicherweise mit dem verwendeten DNase-Testagar nicht erfaßt werden. Ferner waren alle 45 *A. phocae*-Kulturen negativ für das Enzym Hyaluronidase und auch im Voges-Proskauer-Test. Die Ergebnisse des Voges-Proskauer-Tests waren vergleichbar mit den Ergebnissen von Johnson et al. (2003).

Alle 43 *A. phocae*-Kulturen und die zwei Referenzkulturen zeigten mit Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten bzw. in dem unter 3.5.8 beschriebenen Tablettentest eine positive Reaktion für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase und  $\alpha$ -Mannosidase, jedoch eine negative Reaktion für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase. Ramos et al. (1997) hatten dagegen für das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase eine negative Reaktion beschrieben.

Die Untersuchungsergebnisse bei Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter Substrate bzw. des Tablettentest wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des „API-Coryne-Identifizierungssystems“ auf. Die durchgeführten Enzymnachweise mit Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten bzw. mit dem Tablettentest erwiesen sich als hilfreich für eine schnelle und kostengünstige Differenzierung von *A. phocae* und könnten einen Einsatz in der Routinediagnostik finden.

Die 45 untersuchten *A. phocae*-Kulturen wiesen keine proteolytische Aktivität auf der Serumplatte nach Löffler auf und zeigten keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum. Dies ist, wie bereits aufgeführt (5.1), eine typische Eigenschaft von *A. (T.) pyogenes*.

Für sechs *A. phocae*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen, darunter die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, wurde die 16S rDNA (3.6.6) und die ISR (3.6.7) amplifiziert und sequenziert. Die 16S rDNA-Sequenzen dieser sechs *A. phocae*-Kulturen, der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10004 und von acht weiteren Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, entnommen aus der GenBank, wurden durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen. Die 16S rDNA-Sequenzen

der sechs *A. phocae*-Kulturen und die Sequenz der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10004 der GenBank wiesen dabei eine Homologie von 94,9 % bis 99,5 % zueinander auf. Die nächste verwandte Spezies *A. haemolyticum* zeigte eine 16S rDNA-Homologie von 91,1 % bis 95,4 %. Ein 16S rDNA-Homologieunterschied < 97 % wies bereits auf Besonderheiten für einige *A. phocae* hin.

Außerdem wurde die ISR-Sequenz dieser sechs *A. phocae*-Kulturen und von acht Referenzkulturen bestehend aus acht Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte zunächst eine eindeutige Abgrenzung aller acht Nicht-*A. phocae*-Spezies dieser Gattung. Die Dendrogrammanalyse der ISR der sechs *A. phocae*-Kulturen ergab, im Gegensatz zu der Dendrogrammanalyse der 16S rDNA, drei abgrenzbare ISR-Gruppen. Die *A. phocae*-ISR-Gruppe I, dies waren die beiden Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, wiesen dabei untereinander eine Homologie von 100,0 %, die beiden *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe II untereinander eine Homologie ebenso von 100,0 % und die beiden *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe III untereinander eine Homologie von 99,5 % auf. Die ISR-Gruppen I bis III-Sequenzen wiesen untereinander eine Homologie von 72,0 % bis 80,0 % auf. Die neben *A. phocae* nächste verwandte Spezies *A. haemolyticum* zeigte eine ISR- Homologie von 68,2 % bis 71,3 %. Auf ISR-Ebene scheint *A. phocae* somit keine einheitliche Spezies darzustellen und in drei Genospezies unterscheidbar zu sein. Ein Vergleich der ISR-Gruppen I bis III mit den zuvor durchgeführten 16S rDNA-Analysen ergab eine 16S rDNA-Sequenzhomologie innerhalb der *A. phocae*-ISR-Gruppe-I von 98,9 %, innerhalb der *A. phocae*-ISR-Gruppe-II von 98,2 % und innerhalb der *A. phocae*-ISR-Gruppe-III von 99,5 % und zwischen den *A. phocae*-ISR-Gruppe-I und -II eine 16S rDNA-Sequenzhomologie von 97,7 % bis 98,8 %, zwischen den *A. phocae*-ISR-Gruppe-I und -III eine 16S rDNA-Sequenzhomologie von 96,2 % bis 97,0 % und zwischen den *A. phocae*-ISR-Gruppe-II und -III eine 16S rDNA-Sequenzhomologie von 95,1 % bis 96,2 %.

Für die drei *A. phocae*-ISR-Gruppen, die voneinander abgrenzbare ISR-Sequenzen aufwiesen, wurden nunmehr drei unterschiedliche Oligonukleotidprimerpaare entwickelt (3.6.11.1). Die Ansatzstellen der Aph1-ISR-F-, Aph2-ISR-F- und Aph3-ISR-F-Oligonukleotidprimer waren dabei in einer spezifischen Region der *A. phocae*-ISR, die Ansatzstelle des Aph1-23S rDNA-R-Oligonukleotidprimers in einer spezifischen Region des *A. phocae*-23S rRNA-Gens und die

Ansatzstelle des Aph3-ISR-23S rDNA-R-Oligonukleotidprimers teilweise in einer spezifischen Region der *A. phocae* ISR und des 23S rRNA-Gens lokalisiert.

Primerpaar I erkannte 15 der hier untersuchten 45 *A. phocae*-Kulturen, darunter auch die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, Primerpaar II 19 *A. phocae*-Kulturen und das Primerpaar III 11 *A. phocae*-Kulturen. Die gewählten Oligonukleotidprimer ermöglichten somit eine molekulare Unterscheidung aller drei Genospezies innerhalb der Spezies *A. phocae*.

Zur weiteren molekularen Untersuchung der drei mutmaßlichen Genospezies wurden die unter 3.6.11.2 beschriebenen *A. phocae*-*sodA*-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimer verwendet. Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar wiesen alle 15 *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I, darunter die zwei Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, eine positive Reaktion auf. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab für *A. phocae* ein Amplikon mit einer Größe von ca. 140 Bp (135 Bp erwartete Größe). Die verbleibenden 30 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III waren negativ, d.h. die beschriebenen *sodA*-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimer würden sich ebenso zur molekularen Identifizierung der *A. phocae*-ISR-Gruppe I eignen.

Zur Amplifizierung des im weiteren untersuchten *A. phocae*-Phocaelysin-kodierenden Gens wurden zunächst die unter 3.6.11.10 beschriebenen *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer verwendet. In der *A. phocae*-ISR-Gruppe I, darunter die zwei Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, war mit *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimern bei abgesenkter Primeranlagerungstemperatur auf 45 °C (3.6.11.10) eine Kreuzreaktion feststellbar. Die *plo*-kruzreagierenden Amplikons ergaben für *A. phocae* eine Größe von ca. 700 Bp. Nach Sequenzierung des *plo*-kruzreagierenden Amplikons der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10002 (nunmehr als Phocaelysin-Gen *phl* bezeichnet) konnte ein *phl*-spezifisches Oligonukleotidprimerpaar entwickelt werden. Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar zeigten neun der 15 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppe I, dies beinhaltete auch die Referenzkultur *A. phocae* DSM 10002, nicht aber die Referenzkultur *A. phocae* DSM 10003, eine positive Reaktion. Die Amplifizierung dieses speziesspezifischen Genabschnittes des Phocaelysin-Gens ergab für diese *A. phocae* ein Amplikon mit einer Größe von ca. 160 Bp.

Ferner wurde das *plo*-kruzreagierende Amplikon der Referenzkultur *A. phocae* DSM 10003 sequenziert und ein zweites Phocaelysin-Gen-spezifisches Oligonukleotidprimerpaar entwickelt. Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar wiesen alle 15 *A. phocae*-Kulturen der *A.*

*phocae*-ISR-Gruppe I eine positive Reaktion auf. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab für *A. phocae* ein Amplikon mit einer Größe von ca. 310 Bp (311 Bp erwartete Größe). Die verbleibenden 30 *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III waren negativ, d.h. das Phocaelysin-kodierende Gen scheint spezifisch für *A. phocae*-ISR-Gruppe I zu sein.

Die Sequenz von *phl*, *pho* und weiterer Porenbildner-kodierender Gene wurde durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Das Phocaelysin-Gen *phl* der *A. phocae*-ISR-Gruppe I scheint das Gen eines bislang noch nicht beschriebenen Porenbildners innerhalb der Gattung *Arcanobacterium* zu sein. Weitere Informationen zu Eigenschaften dieses mutmaßlich Cholesterol-abhängigen Porenbildners liegen bislang noch nicht vor.

Ein Vergleich der aufgeführten genotypischen Eigenschaften mit den zuvor genannten kulturellen Eigenschaften ergab zunächst eine Beziehung zwischen dem Auftreten von *phl* und der Größe der Hämolysezone von *A. phocae*. Alle 15 *phl*-positiven *A. phocae*-Kulturen der *A. phocae*-ISR-Gruppe I, dies beinhaltet auch die Referenzkulturen *A. phocae* DSM 10002 und *A. phocae* DSM 10003, zeigten im Vergleich zu den *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III, eine etwas verstärkte Hämolyse auf Schafblutagarplatten. Bei *A. phocae*-Kulturen der ISR-Gruppen II und III war eine weniger ausgeprägte Hämolysezone feststellbar.

Ein Vergleich der genotypischen Eigenschaften mit den weiteren zuvor genannten biochemischen Eigenschaften ergab eine hoch signifikante Korrelation zwischen der *phl*-positiven *A. phocae*-ISR-Gruppe I und einer positiven Reaktion bezüglich N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, D-Lactose und D-Saccharose; ferner eine hoch signifikante Korrelation zwischen der *A. phocae*-ISR-Gruppe II und einer positiven Pyrazinamidase-Reaktion, bei fehlender *phl*-Reaktion und eine hoch signifikante Korrelation zwischen *A. phocae*-ISR-Gruppe III und einer positiven Pyrazinamidase-, D-Lactose- und D-Saccharose-Reaktion, ebenso bei fehlender *phl*-Reaktion.

Neben den unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften ermöglichten die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen neuen ISR bzw. *sodA*-Genabschnitte und das Gen *phl* eine weitere molekulare Charakterisierung von *A. phocae*. Die Bedeutung der drei unterschiedlichen Genospezies von *A. phocae* mit eindeutig voneinander abgrenzbaren phänotypischen und genotypischen Eigenschaften für die taxonomische Position von *A. phocae* ist bislang noch unklar.

Möglicherweise stellen *A. phocae*, insbesondere der ISR-Gruppe III, mit einer 16S rDNA-Sequenzhomologie  $< 97\%$ , zu den *A. phocae* der ISR-Gruppen I und II, eine neue von Seehunden und Kegelrobben isolierbare Spezies des Genus *Arcanobacterium* oder sogar eine neue Gattung dar. Nach den Angaben von Drancaout et al. (2000) weisen 16S rDNA-Sequenzhomologien  $\geq 99\%$  auf eine gemeinsame Spezies und 16S rDNA-Sequenzhomologien  $\geq 97\%$  auf eine gemeinsame Gattung hin.

### **5.3 Phänotypische und genotypische Eigenschaften von *A. haemolyticum***

*A. haemolyticum* ist weltweit bekannt als Erreger von Pharyngitiden und Wundinfektionen beim Menschen. *A. haemolyticum* wurde erstmals bei überwiegend nasopharyngealen Infektionen amerikanischer Soldaten von MacLean et al. (1946) beschrieben. Über die Bedeutung von *A. haemolyticum* als Krankheitserreger bei Tieren liegen bislang noch kaum Informationen vor. Tyrrell et al. (2002) berichteten über die ätiologische Rolle einer einzigen *A. haemolyticum*-Kultur bei einer parodontalen Infektion eines Kaninchens. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals *A. haemolyticum*, isoliert von Wundinfektionen von Pferden, phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

Nach Anzüchtung der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen der vorliegenden Arbeit, isoliert von sechs Pferden, und der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 auf Schafblutagarplatten, war die Ausbildung einer Hämolyse feststellbar. Nach MacLean et al. (1946), Jobanputra und Swain (1975), Collins et al. (1982b), Potel (1982), Cummings et al. (1993), Carlson et al. (1994), Lämmler und Hartwigk (1995), Funke et al. (1995), Almuzara et al. (2002), Goyal et al. (2005) und Tan et al. (2006) wurde das Hämolysin von *A. haemolyticum* als  $\beta$ -Hämolysin beschrieben.

Die Hämolysezone der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, erwies sich als etwas breiter als die Hämolysezone der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595. Nach Anzüchtung auf Kaninchenblutagarplatten war für alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, ebenso wie für die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595, im Vergleich zur Anzüchtung auf Schafblutagarplatten, eine Hämolyseverstärkung zu beobachten. Eine vergleichbare Hämolyseverstärkung von *A. haemolyticum* wurde bereits von Potel (1982), Lämmler und Blobel (1988), Cummings et al. (1993), Lämmler (1994), Lämmler und Hartwigk (1995) und Funke et al. (1995) beschrieben. Eine ähnliche Hämolyseverstärkung war auch nach Anzüchtung von *A. haemolyticum* auf Humanblutagarplatten nachweisbar

(Potel, 1982; Lämmler und Blobel, 1988; Lämmler und Hartwig, 1995; Funke et al., 1995; Goyal et al., 2005).

Synergistische, CAMP-ähnliche Reaktionen der *A. haemolyticum*-Kulturen der vorliegenden Arbeit waren für alle sieben untersuchten Kulturen und auch für die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 mit *S. agalactiae* und mit *R. equi* sowie mit den bislang noch nicht beschriebenen Exosubstanzen von *P. phenylpyruvicus* nachweisbar, ferner eine umgekehrte CAMP-Reaktion in der Zone des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins. Synergistische Hämolysereaktionen von *A. haemolyticum* mit *S. agalactiae*, mit *R. equi* und die umgekehrte CAMP-Reaktion im Bereich des Staphylokokken- $\beta$ -Toxins wurden auch von Fraser (1964) beschrieben. Über vergleichbare synergistische und antagonistische Hämolysereaktionen von *A. haemolyticum* berichteten ferner Lämmler und Blobel (1987, 1988), Lämmler (1994), Lämmler und Hartwig (1995), Linder (1997), Funke et al. (1995), Almuzara et al. (2002), Goyal et al. (2005), Parija et al. (2005) und Tan et al. (2006).

Die für die antagonistische Hämolysereaktion verantwortliche Substanz konnte als Phospholipase D erkannt werden. Nach Souckova und Soucek (1972) zeigten die aus dem Überstand von *A. haemolyticum* isolierten Fraktionen dermonekrotische Eigenschaften, ferner Eigenschaften einer Phospholipase D. Diese führte zu einer Hemmung des Staphylokokken- $\beta$ -Hämolytins. Die Phospholipase D erwies sich als 31,5 kDa großes Protein (Cuevas und Songer, 1993). Sie reagierte mit dem Sphingomyelin der Zielzelle und bildete Ceramid-Phosphat (Linder, 1997). Das Phospholipase D-kodierende Gen *pld* von *A. haemolyticum* wurde kloniert und sequenziert und zeigte einige Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Genen von *C. pseudotuberculosis* und *C. ulcerans* (Cuevas und Songer, 1993; McNamara et al., 1995).

Die Hämolyseverstärkung auf Kaninchenblutagarplatten und die synergistischen und antagonistischen Hämolysereaktionen von *A. haemolyticum* mit Exosubstanzen verschiedener Bakterienspezies erwiesen sich auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, als nützlich für die Routinediagnostik zur vorläufigen Einordnung dieser Spezies.

Zur biochemischen Charakterisierung der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und auch der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 erwies sich das kommerzielle Identifizierungssystem „API-Coryne“ ebenfalls als hilfreich. Die Reaktionen wiesen eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von MacLean et al. (1946), Jobanputra und Swain (1975), Ding und Lämmler (1992), Carlson et al. (1994), von

Graevenitz und Funke (1996), Lawson et al. (2001), Hoyles et al. (2002), Johnson et al. (2003), Goyal et al. (2005), Parija et al. (2005) und Lehnen et al. (2006) auf.

Für das Enzym Gelatinase war, im Gegensatz zur Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595, für eine *A. haemolyticum*-Kultur eine positive Reaktion und für die restlichen sechs *A. haemolyticum*-Kulturen schwachpositive Reaktionen zu beobachten. Eine positive Gelatinase-Reaktion gilt als charakteristisches Merkmal von *A. (T.) pyogenes* und *A. pluranimalium* (Gahrn-Hansen und Frederiksen, 1992; Lawson et al., 2001).

Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und auch die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 bildeten keine Katalase, jedoch das Enzym DNase. Zum gleichen Ergebnis kamen bereits Jobanputra und Swain (1975), Collins et al. (1982b), Potel (1982), Lämmler und Blobel (1988), Morrison und Tillotson (1988), Lämmler und Hartwig (1995), Goyal et al. (2005), Parija et al. (2005) und Tan et al. (2006). Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 bildeten keine Hyaluronidase und waren im Voges-Proskauer-Test negativ. Diese negativen Reaktionen wurden ebenfalls von Lämmler und Blobel (1988), Morrison und Tillotson (1988) und Lämmler und Hartwig (1995) beschrieben.

Die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und auch die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 zeigten mit Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten (3.5.7) bzw. im Tablettentest (3.5.8) eine positive Reaktion für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase,  $\alpha$ -Mannosidase und Alkalische Phosphatase. Die Bildung des Enzyms  $\alpha$ -Mannosidase wurde bereits von Carlson und Kontiainen (1994) als typische Eigenschaft und als geeignet zur Identifizierung von *A. haemolyticum* beschrieben. Unterschiede innerhalb der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und auch der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 waren für die Enzyme  $\beta$ -Glucuronidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase nachweisbar. Das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase war bei fünf von sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und für die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 nicht feststellbar. Das Enzym Pyrrolidonyl-Arylamidase wurde, im Gegensatz zur Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595, bei allen sieben *A. haemolyticum*-Kulturen nachgewiesen.

Das Untersuchungsergebnis bei Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter Substrate bzw. des Tablettentests wies eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des „API-Coryne-Identifizierungssystems“ auf. Eine positive Reaktion von *A. haemolyticum* für die Enzyme Pyrrolidonyl-Arylamidase und  $\alpha$ -Mannosidase wurde bereits von Almuzara et al. (2002) und Tan et al. (2006) beschrieben. Die Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter

Substrate bzw. des Tablettentests könnten einen kostengünstigen Einsatz in der Routinediagnostik zur Identifizierung von *A. haemolyticum* finden.

Alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen zeigten, im Gegensatz zur Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595, eine schwachpositive Serolysereaktion auf der Serumplatte nach Löffler, wiesen aber keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf. Beides sind bekannte Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes* (Bisping und Amtsberg, 1988; Lämmler und Hartwigk, 1995). Die schwache Reaktion auf dem Löffler-Medium korrespondierte mit der schwachpositiven Reaktion des Gelatinasetests des „API-Coryne-Identifizierungssystems“. Auffallend war, dass die Gelatinase-Reaktion bzw. die Reaktion auf der Serumplatte nach Löffler, nur bei den sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, nicht aber bei der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 nachweisbar war. Über die Natur dieser bislang noch nicht beschriebenen Protease von *A. haemolyticum*, möglicherweise ähnlich der Protease von *A. (T.) pyogenes* (Schaufuss, et al., 1989), ist bislang noch nichts bekannt.

Für die sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, wurden die 16S rDNA (3.6.6) und die ISR (3.6.7) amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung der 16S rDNA und der ISR zeigte für alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen eine Übereinstimmung mit der 16S rDNA- und der ISR-Sequenz der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595. Die 16S rDNA-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und die 16S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 aus der GenBank wiesen dabei eine Homologie von 98,8 % bis 99,9 % zueinander auf. Die nächste verwandte Spezies, *A. phocae*, zeigte eine 16S rDNA-Homologie zu den sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und zu der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 von 93,7 % bis 95,4 %. Die 16S rDNA-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und auch von 11 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, entnommen aus der GenBank, wurden durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen. Auf 16S rDNA-Ebene lassen sich die *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, somit eindeutig der Spezies *A. haemolyticum* zuordnen.

Die ISR-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, und von 10 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden, vergleichbar der 16S rDNA, durch Sequenzanalysen und durch Dendrogrammanalyse untersucht. Dies ermöglichte ebenso eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen. Die

ISR-Sequenzen der sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von sechs Pferden, und die ISR-Sequenz der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 wiesen dabei eine Homologie von 97,5 % bis 100,0 % zueinander auf. Die nächste verwandte Spezies *A. phocae* zeigte eine ISR-Homologie zu den sieben *A. haemolyticum*-Kulturen und zu der Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 von 68,2 % bis 72,7 %. Auf ISR-Ebene lassen sich die *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, somit ebenso eindeutig der Spezies *A. haemolyticum* zuordnen.

Die unter 3.6.8 beschriebene Sequenzierung der ISR und von Teilbereichen der 23S rDNA ermöglichte nach 3.6.11.3 die Erstellung von *A. haemolyticum*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Ansatzstelle des Oligonukleotidprimers Aha-ISR-F war dabei in der speziesspezifischen Region der *A. haemolyticum*-ISR, die Ansatzstelle des Oligonukleotidprimers Aha-23S rDNA-R in der speziesspezifischen Region des *A. haemolyticum*-23S rRNA-Gens lokalisiert. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 350 Bp. Mit diesen Oligonukleotidprimern wiesen alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, und die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 eine positive Reaktion auf.

Die Sequenz des Phospholipase D-kodierenden Gens *pld* aus der GenBank ermöglichte nach 3.6.11.4 die Erstellung von *A. haemolyticum*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Amplifizierung dieses ebenso speziesspezifischen Genabschnitts von *A. haemolyticum* ergab ein Amplikon mit einer Größe von ca. 530 Bp. Mit diesem Oligonukleotidprimerpaar zeigten alle sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, und auch die Referenzkultur *A. haemolyticum* DSM 20595 eine positive Reaktion. Die 10 Referenzkulturen der acht weiteren Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* waren mit beiden Oligonukleotidprimerpaaren negativ.

Die speziesspezifischen Primerpaare aus dem Bereich der ISR bzw. 23S-rDNA und auch des Gens *pld* waren somit zur molekularen Identifizierung von *A. haemolyticum* geeignet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ermöglichten eine eindeutige phänotypische und genotypische Identifizierung von *A. haemolyticum* und könnten zukünftig die Diagnosestellung von *A. haemolyticum* bei Infektionen des Menschen und, wie in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben, auch bei Pferden erleichtern.

Neben *A. haemolyticum* wurden von den Wundinfektionen bzw. Dermatitiden der Pferde weitere Mikroorganismen, wie  $\alpha$ -hämolisierende Streptokokken, *A. equuli*, aerobe Bazillen, *C. koseri*, coliforme Keime, *Corynebacterium* spp., *E. coli*, *F. nucleatum*, *M. morganii*, *P.*

*caballi*, *Proteus* spp., *S. aureus* und *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isoliert (siehe **Tab. 6**). Aus diesem Grund kann über die eigentliche Bedeutung von *A. haemolyticum* als Ursache der Wundinfektionen bzw. Dermatitis der Pferde keine Aussage getroffen werden. Ferner ergibt sich aus den vorliegenden Informationen keine Auskunft über den Infektionsweg der *A. haemolyticum*-Kulturen und über das mögliche Zoonosepotential.

#### **5.4 Phänotypische und genotypische Eigenschaften von *A. pluranimalium***

Die Spezies *A. pluranimalium* wurde erstmals anhand von zwei Kulturen, die ursprünglich von einem toten Schweinswal und einem toten Hirsch isoliert wurden, von Lawson et al. (2001) beschrieben. Die Bedeutung von *A. pluranimalium* für das Krankheitsgeschehen des Schweinswals und des Hirschs war allerdings unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte eine einzelne *A. pluranimalium*-Kultur (*A. pluranimalium* 1128), isoliert von einer Pyodermie eines Hundes, phänotypisch und genotypisch charakterisiert werden.

Nach Anzüchtung der *A. pluranimalium*-Kultur und auch der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 auf Schafblutagarplatten war die Ausbildung einer Hämolyse feststellbar. Lawson et al. (2001) beschrieben für *A. pluranimalium* eine  $\alpha$ -Hämolyse. Eine Charakterisierung des Hämolsins von *A. pluranimalium* steht bislang allerdings noch aus. Nach Anzüchtung auf Kaninchenblutagarplatten war für die *A. pluranimalium*-Kultur 1128, ebenso wie für die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483, im Vergleich zur Anzüchtung auf Schafblutagarplatten, eine leicht verstärkte Hämolyse nachweisbar. Eine deutliche Hämolyseverstärkung wurde bereits für *A. haemolyticum* beschrieben (5.3).

Bislang noch nicht beschriebene synergistische Hämolysereaktionen von *A. pluranimalium* waren mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin und mit *R. equi* nachweisbar. Die Hämolyseverstärkung auf Kaninchenblutagarplatten und die synergistischen Hämolysereaktionen von *A. pluranimalium* mit Exosubstanzen verschiedener Bakterienspezies erwiesen sich auch für *A. pluranimalium* als nützlich zur vorläufigen Einordnung dieser Spezies.

Zur biochemischen Charakterisierung der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und auch der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 erwies sich ebenso das kommerzielle Identifizierungssystem „API-Coryne“ als hilfreich.

Die Reaktionen wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Lawson et al. (2001) und Lehnen et al. (2006) auf.

Die untersuchte *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und die Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 erwiesen sich ferner als positiv für die Enzyme Katalase und DNase, aber als negativ für den Hyaluronidase- und Voges-Proskauer-Test. Die positive Reaktion für das Enzym Katalase und die negative Reaktion im Voges-Proskauer-Test wurden bereits von Lawson et al. (2001) beschrieben. Beide Kulturen zeigten bei Verwendung von Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten (3.5.7) bzw. im Tablettentest (3.5.8) eine positive Reaktion für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ -Mannosidase und Pyrrolidonyl-Arylamidase und eine negative Reaktion für die Enzyme N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase und Alkalische Phosphatase. Die Untersuchungsergebnisse bei Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter Substrate bzw. des Tablettentests wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des „API-Coryne-Identifizierungssystem“ auf. Die Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter Substrate bzw. des Tablettentests könnten, wie bereits zuvor für *A. haemolyticum* (5.3) beschrieben, einen kostengünstigen Einsatz in der Routinediagnostik zur Identifizierung von *A. pluranimalium* finden. Die *A. pluranimalium*-Kultur 1128 zeigte keine proteolytische Aktivität auf der Serumplatte nach Löffler und wies keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf. Wie bereits aufgeführt sind beides Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes* (Hartwigk und Marcus, 1962; Lämmler und Blobel, 1988).

Für die *A. pluranimalium*-Kultur 1128 wurde die 16S rDNA (3.6.6), die ISR (3.6.7) und die 23S rDNA (3.6.8) amplifiziert und sequenziert. Die ISR- und 23S rDNA-Sequenzierung ermöglichte eine bislang noch nicht beschriebene, zusätzliche, eindeutige genotypische Identifizierung von *A. pluranimalium*.

Die 16S rDNA-Sequenz der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und von 11 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, entnommen aus der GenBank, wurden durch Sequenzanalysen und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Die 16S rDNA-Sequenz der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und die 16S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 zeigten dabei eine Homologie von 99,6 % zueinander. Die nächsten verwandten Spezies *A. haemolyticum* und *A. phocae* zeigten eine 16S rDNA-Homologie zu den beiden *A. pluranimalium*-Kulturen von 91,9 % bis 94,0 %. Auf 16S rDNA-Ebene lässt sich die *A. pluranimalium*-Kultur 1128, isoliert von einem Hund, somit eindeutig der Spezies *A. pluranimalium* zuordnen.

Die ISR-Sequenz der *A. pluranimalium*-Kultur 1128 und von 10 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden ebenso durch Sequenzanalysen und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Die ISR-Sequenz von *A. pluranimalium* 1128 und die ISR-Sequenz der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 wiesen dabei eine Homologie von 98,0 % zueinander auf. Die nächsten verwandten Spezies *A. haemolyticum* und *A. phocae* zeigten eine ISR-Homologie zu den beiden *A. pluranimalium*-Kulturen von 68,8 % bis 73,5 %. Auf ISR-Ebene lässt sich die *A. pluranimalium* 1128 somit ebenso eindeutig der Spezies *A. pluranimalium* zuordnen.

Eine Sequenzierung des 23S rDNA-Gens von *A. pyogenes* wurde bereits von Jost et al. (2004b) zur Erkennung von 23S rDNA-Mutationen makrolidresistenter Kulturen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte der von Jost et al. (2004b) beschriebene Oligonukleotidprimer 23S-1 bzw. der ebenso von Jost et al. (2004b) beschriebene Oligonukleotidprimer 23S-2 in modifizierter Form (23S-2a) verwendet werden. Die 23S rDNA-Sequenzen von *A. pluranimalium* 1128 und von 10 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden durch Sequenzanalysen und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Die 23S rDNA-Sequenz von *A. pluranimalium* 1128 und die 23S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *A. pluranimalium* DSM 13483 wiesen dabei eine Homologie von 100,0 % zueinander auf. Die nächste verwandte Spezies *A. hippocoleae* zeigte eine 23S rDNA-Homologie von 97,4 %. Auf 23S rDNA-Ebene, wie bereits für die 16S rDNA und die ISR beschrieben, lässt sich die *A. pluranimalium*-Kultur 1128, isoliert von einem Hund, somit ebenso eindeutig der Spezies *A. pluranimalium* zuordnen.

Neben *A. pluranimalium* wurden von der Pyodermie des Hundes weitere Mikroorganismen, wie *Corynebacterium* spp., *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* und *S. intermedius*-Gruppe, isoliert (siehe **Tab. 6**). Aus diesem Grund kann über die mögliche Bedeutung von *A. pluranimalium* für die Pyodermie des Hundes keine Aussage getroffen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ermöglichten eine eindeutige phänotypische und genotypische Identifizierung von *A. pluranimalium* und könnten zukünftig die Diagnosestellung von *A. pluranimalium* bei Infektionen von Tieren, möglicherweise auch des Menschen, erleichtern.

## 5.5 Phänotypische und genotypische Eigenschaften von *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi*

*A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* wurden erstmals als Ursache von Balanoposthitis des Europäischen Bison (*Bison bonasus*) von Lehnen et al. (2006) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden drei *A. (T.) bialowiezense*- und sieben *A. (T.) bonasi*-Kulturen phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

Die untersuchten *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen, dies beinhaltete auch die Referenzkulturen *A. (T.) bialowiezense* DSM 17162 und *A. (T.) bonasi* DSM 17163, zeigten vergleichbare Hämolysereaktionen. Für die vier *A. (T.) bialowiezense*- und acht *A. (T.) bonasi*-Kulturen war eine schmale Hämolysezone auf Schafblutagarplatten nachweisbar. Nach Anzucht auf Kaninchenblutagarplatten war eine vergleichbare Hämolysereaktion, d.h. keine Hämolyseverstärkung nachweisbar.

Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen zeigten, ebenso wie die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Referenzkulturen, keine synergistischen oder auch antagonistischen Hämolysereaktionen.

Alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen waren negativ für die Enzyme Katalase, DNase, Hyaluronidase und auch im Voges-Proskauer-Test. Die negative Katalasereaktion entsprach den Ergebnissen von Lehnen et al. (2006). Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen waren ferner negativ für die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase und N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, zeigten aber eine positive Reaktion für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase. Während alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*-Kulturen eine positive Reaktion für das Enzym Alkalische Phosphatase aufwiesen, zeigten die untersuchten *A. (T.) bonasi*-Kulturen keine vergleichbare Reaktion. Alle untersuchten *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen erwiesen sich als positiv für das Enzym Pyrrolidonyl-Arylamidase aber als negativ für das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase.

Die oben genannten Reaktionen wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Lehnen et al. (2006) auf. Diese Autoren beschrieben allerdings für die Enzyme Alkalische Phosphatase und Pyrrolidonyl-Arylamidase eine negative Reaktion für *A. (T.) bialowiezense*. Diese Unterschiede könnten auf unterschiedliche Empfindlichkeiten des von Lehnen et al. (2006) verwendeten „API-Coryne-

Identifizierungssystem“ und des Tablettentests der vorliegenden Untersuchungen zurückzuführen sein.

Die *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-Kulturen zeigten keine proteolytische Aktivität auf der Serumplatte nach Löffler und wiesen keine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum auf. Die Ergebnisse auf dem Löffler-Medium entsprachen den Ergebnissen von Lehnen et al. (2006).

Die unter 3.6.7 beschriebene Amplifizierung und Sequenzierung der ISR erlaubte nach 3.6.11.7 und 3.6.11.8 die Erstellung von *A. (T.) bialowiezense*- und *A. (T.) bonasi*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Beide Oligonukleotidprimer ermöglichten die PCR-vermittelte Identifizierung beider Spezies und könnten zukünftig die Diagnosestellung von *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* erleichtern.

## **5.6 Phänotypische und genotypische Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes***

*A. (T.) pyogenes* ist weltweit bekannt als Erreger von Rindermastitiden und kann darüber hinaus bei eitrigen Erkrankungen, besonderes bei Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Pferd isoliert werden (Lämmler und Hartwig, 1995). Infektionen des Menschen mit *A. (T.) pyogenes* waren bisher nur vereinzelt nachweisbar (Plamondon et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Reptilien (Bartagame und Gecko) und 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

Nach Anzüchtung der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen der vorliegenden Arbeit (n=28) auf Schafblutagarplatten war die Ausbildung einer Hämolyse feststellbar. Nach Hartwig und Marcus (1962), Potel (1982), Gahrn-Hansen und Frederiksen (1992), Ding und Lämmler (1996), Lämmler und Hartwig (1995), Ramos et al. (1997), Lynch et al. (1998), Narayanan et al. (1998), Goyal et al. (2005), Plamondon et al. (2007) wurde für *A. (T.) pyogenes* eine  $\beta$ -Hämolyse beschrieben. Nähere Angaben zu dem Hämolysin von *A. (T.) pyogenes* sind unter 2.2.8.1 und im Folgenden aufgeführt. Nach Anzüchtung auf Kaninchenblutagarplatten war für die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, ebenso wie für die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630, im Vergleich zur Anzüchtung auf Schafblutagarplatten, keine Hämolyseverstärkung nachweisbar. Eine Hämolyseverstärkung

auf Kaninchenblutagarplatten wurde bereits als charakteristische Eigenschaft von *A. haemolyticum* (5.1, 5.3), *A. pluranimalium* (5.1, 5.4) und *A. hippocoleae* (5.1) beschrieben.

Synergistische, CAMP-ähnliche Reaktionen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen der vorliegenden Arbeit waren für alle 28 untersuchten Kulturen mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin und mit *R. equi* nachweisbar. Synergistische Hämolysereaktionen von *A. (T.) pyogenes* mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin und mit *R. equi* wurden auch von Fraser (1964), synergistische Hämolysereaktionen mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Toxin auch von Lämmler und Blobel (1988) und Gahrn-Hansen und Frederiksen (1992) beschrieben.

Die Hämolyse auf Schafblutagarplatten und die synergistischen Hämolysereaktionen von *A. (T.) pyogenes* mit Exosubstanzen verschiedener Bakterienspezies erwiesen sich auch für *A. (T.) pyogenes* als nützlich zur vorläufigen Einordnung dieser Spezies.

Zur biochemischen Charakterisierung der 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und auch der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 erwies sich das kommerzielle Identifizierungssystem „API-Coryne“ als hilfreich.

Die „API-Coryne“-Reaktionen wiesen eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Morrison und Tillotson (1988), Ding und Lämmler (1992), Gahrn-Hansen und Frederiksen (1992), Lämmler und Hartwig (1995), Narayanan et al. (1998), Lawson et al. (2001), Hoyles et al. (2002), Johnson et al. (2003) und Lehnen et al. (2006) auf.

Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen erwiesen sich als negativ für das Enzym Katalase, aber positiv für das Enzym DNase. In der vorliegenden Arbeit waren die genannten Kulturen ferner negativ für das Enzym Hyaluronidase und auch im Voges-Proskauer-Test. Die negative Reaktion für das Enzym Katalase und die positive Reaktion für das Enzym DNase wurden bereits von Lämmler und Blobel, (1988), Morrison und Tillotson (1988), Ding und Lämmler (1992), Gahrn-Hansen und Frederiksen (1992), Lämmler und Hartwig (1995), Ramos et al. (1997), Lynch et al. (1998), Narayanan et al. (1998) und Goyal et al. (2005) beschrieben.

Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und auch die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* 20630 waren bei Verwendung von Methylumbelliferyl-konjugierten Substraten (3.5.7) bzw. dem Tablettentest (3.5.8) positiv für die Enzyme  $\beta$ -Glucuronidase und  $\beta$ -Galactosidase und negativ für das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase, 27 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und auch die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* 20630 waren positiv für das Enzym N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase. Eine positive  $\alpha$ -Mannosidase-Reaktion wurde bereits als charakteristische Eigenschaft von *A. haemolyticum*

beschrieben (Carlson und Kontiainen, 1994). Unterschiede innerhalb der 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und auch der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 waren für die Enzyme Alkalische Phosphatase und Pyrrolidonyl-Arylamidase nachweisbar. Für das Enzym Alkalische Phosphatase zeigten, im Gegensatz zu den Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630, alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen eine positive Reaktion. Für das Enzym Pyrrolidonyl-Arylamidase zeigten, im Gegensatz zu der Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630, alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und die Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20594, eine positive Reaktion.

Das Untersuchungsergebnis bei Verwendung Methylumbelliferyl-konjugierter Substrate bzw. des Tabletentests wiesen eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des „API-Coryne-Identifizierungssystems“ auf. Alle 28 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 zeigten ferner eine positive Serolysereaktion auf der Serumplatte nach Löffler und eine Kreuzreaktion mit Streptokokken-Serogruppe G-spezifischem Antiserum. Beides sind bereits beschriebene Eigenschaften von *A. (T.) pyogenes* (Hartwigk und Marcus, 1962; Lämmler und Blobel, 1988; Gahrn-Hansen und Frederiksen, 1992; Lämmler und Hartwigk, 1995; Lynch et al., 1998; Narayanan et al., 1998; Goyal et al., 2005; Plamondon et al., 2007).

Zur genotypische Charakterisierung der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko, wurde die 16S rDNA (3.6.6) und das Gen *rpoB* (3.6.10) amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen der 16S rDNA und des Gens *rpoB* zeigten für beide *A. (T.) pyogenes*-Kulturen eine weitestgehende Übereinstimmung mit der 16S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 und mit den *rpoB*-Sequenzen der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630.

Die 16S rDNA-Sequenzen der beiden *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko und die 16S rDNA-Sequenz der Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 der GenBank wiesen dabei eine Homologie zwischen 98,9 % und 99,5 % zueinander auf. Die nächsten verwandten Spezies *A. (T.) abortisuis* und *A. (T.) bernardiae* zeigten eine 16S rDNA-Homologie zu den zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und zu der Referenzkultur *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 von 95,9 % bis 96,7 %. Die 16S rDNA-Sequenzen der beiden *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko, und von 11 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, entnommen aus der

GenBank, wurden durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Auf 16S rDNA-Ebene lassen sich die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Bartagame und Gecko, somit eindeutig der Spezies *A. (T.) pyogenes* zuordnen.

Zur Sequenzierung des Gens *rpoB* der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen und der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko, wurden die bereits von Khamis et al. (2004) zur Sequenzierung des Gens *rpoB* von Bakterien der Gattung *Corynebacterium* eingesetzten Oligonukleotidprimer verwendet. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 450 Bp. Mit diesen universellen Oligonukleotidprimern wiesen die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko, und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 eine positive Reaktion auf. Dies ermöglichte die Sequenzierung der *rpoB*-Gene der zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und, wie bereits unter 5.1 beschrieben, die Sequenzierung der *rpoB*-Gene von 11 *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen. Die *rpoB*-Sequenzen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko, und die *rpoB*-Sequenzen der Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 wiesen dabei eine Homologie von 98,5 % bis 100,0 % zueinander auf. Die nächsten verwandten Spezies *A. (T.) abortus* und *A. (T.) bernardiae* zeigten eine *rpoB*-Homologie zu den zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen und zu den Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 von 80,3 % bis 82,5 %. Die *rpoB*-Sequenzen der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen von Bartagame und Gecko und von 11 Referenzkulturen der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* wurden durch Sequenzanalysen und durch Dendrogrammanalyse vergleichend untersucht. Dies ermöglichte eine eindeutige Abgrenzung aller neun Spezies dieser Gattungen. Auf *rpoB*-Ebene lassen sich die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Bartagame und Gecko, somit ebenso eindeutig der Spezies *A. (T.) pyogenes* zuordnen. Das Zielgen *rpoB* scheint somit, wie bereits für die *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Referenzkulturen beschrieben (5.1), ebenso zur genotypische Charakterisierung von *A. (T.) pyogenes* geeignet zu sein.

Die unter 3.6.7 beschriebene Amplifizierung der ISR von *A. (T.) pyogenes* ermöglichte nach 3.6.11.9 die Erstellung von *A. (T.) pyogenes*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 120 Bp. Mit diesen spezifischen Oligonukleotidprimern wiesen alle 30 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, d.h. alle 26 *A. (T.) pyogenes*-Mastitisisolate und die zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von

einer Bartagame und dem Gecko, und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 eine positive Reaktion auf.

Als verantwortlich für die Hämolyse von *A. (T.) pyogenes* gilt das Cholesterin-abhängige Pyolysin (Ding und Lämmler, 1996; Billington et al., 1997). Das Pyolysin von *A. (T.) pyogenes* gehört zur Familie der Thiol-aktivierten Zytolysine bzw. der porenbildenden Toxine. Dabei handelt es sich um ein extrazelluläres Toxin, das an eukaryotische Zellmembranen bindet, Poren ausbildet und damit eine Zelllysis verursacht (Jost et al., 1999; Billington et al., 2000; Jost und Billington, 2005). Die Sequenz des Pyolysin-kodierenden Gens *plo* der GenBank, ermöglichte nach 3.6.11.10 die Erstellung von *A. (T.) pyogenes-plo*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Verwendung dieser Oligonukleotidprimer ergab Amplikons mit einer Größe von ca. 700 Bp. Verwendung fanden ferner die von Ertas et al. (2005) beschriebenen *plo*-spezifischen Oligonukleotidprimer (3.6.11.10). Diese ergaben ein Amplikon mit einer Größe von ca. 270 Bp. Mit diesen beiden *plo*-spezifischen Oligonukleotidprimern wiesen alle 30 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, darunter auch die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und dem Gecko und die Referenzkulturen *A. (T.) pyogenes* DSM 20594 und *A. (T.) pyogenes* DSM 20630 eine positive Reaktion auf.

Ein Nachweis von *A. (T.) pyogenes* aus Untersuchungsproben von Reptilien erfolgte erstmals in den vorliegenden Untersuchungen. Dabei konnte *A. (T.) pyogenes* nach pathologischen Untersuchungen beider Tiere aus Untersuchungsproben von Lunge und Niere der Bartagame und aus Untersuchungsproben von Darm, Leber, Lunge und Niere des Geckos isoliert werden. Die beiden in der vorliegenden Arbeit phänotypisch und genotypisch charakterisierten *A. (T.) pyogenes* waren aus der Lunge der Bartagame bzw. aus dem Darm des Geckos isoliert worden. Die bei beiden Tieren in großer Zahl nachweisbaren *A. (T.) pyogenes* deuteten in beiden Fällen auf ein septisches Krankheitsbild, ausgelöst durch eine *A. (T.) pyogenes*-Infektionen hin. Neben *A. (T.) pyogenes* waren allerdings aus den Untersuchungsproben der Bartagame noch  $\gamma$ -hämolisierende Streptokokken, *Pseudomonas* spp., coliforme Keime und aus den Untersuchungsproben des Geckos noch  $\alpha$ - und  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken, *Acinetobacter* spp. und Hefen isolierbar, sodass über die eigentliche Bedeutung von *A. (T.) pyogenes* für das Krankheitsgeschehen beider Tiere keine endgültige Aussage getroffen werden kann.

Die Bedeutung von *A. (T.) pyogenes* als Mastitiserreger wurde bereits beschrieben (2.2.8). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer

Bartagame und einem Gecko, und 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, phänotypisch und genotypisch charakterisiert. *A. (T.) pyogenes* konnte, wie bereits unter 2.2.8 aufgeführt, bei Erkrankungen verschiedener Tierarten, darunter Antilope, Büffel, Kamel, Huhn, Hirsch, Elefant, Gazelle, Pferd, Papagei, Rentier und Pute und auch bei Hund und Katze isoliert werden (Jost und Billigton, 2005), bislang aber nicht bei Reptilien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ermöglichten eine phänotypische Charakterisierung und durch Sequenzierungen sowie durch die Verwendung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern eine eindeutige genotypische Identifizierung von *A. (T.) pyogenes*. Dies könnte zukünftig die Diagnosestellung von *A. (T.) pyogenes* bei Infektionen von Tieren, möglicherweise auch des Menschen, erleichtern.

## **5.7 Genotypische Eigenschaften von *A. (T.) bernardiae* und *A. hippocoleae***

Die unter 3.6.7 beschriebene Amplifizierung und Sequenzierung der ISR und von Teilbereichen der 16S rDNA ermöglichte nach 3.6.11.3 und 3.6.11.8 die Erstellung von *A. (T.) bernardiae* und *A. hippocoleae*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Die Ansatzstelle des Oligonukleotidprimers Abe-ISR-16S rDNA-F und Ahi-ISR-16S rDNA-F waren dabei in der speziesspezifischen Region der *A. (T.) bernardiae* und *A. hippocoleae*-ISR bzw. 16S rDNA, die Ansatzstelle des Oligonukleotidprimers Abe-ISR-R und Ahi-ISR-R in der speziesspezifischen Region der *A. (T.) bernardiae*- und *A. hippocoleae*-ISR lokalisiert. Beide Oligonukleotidprimerpaare ermöglichten die PCR-vermittelte Identifizierung beider Spezies und könnten zukünftig die Diagnosestellung, der allerdings offenbar selten nachweisbaren Spezies *A. (T.) bernardiae* und *A. hippocoleae* erleichtern.

## **5.8 Schlussfolgerung**

Über Bakterien der Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, insbesondere über die in den letzten Jahren neu beschriebenen Spezies *A. phocae*, *A. pluranimalium*, *A. hippocoleae*, *A. (T.) abortisuis*, *A. (T.) bialowiezense* und *A. (T.) bonasi* existieren bislang, neben den jeweiligen Erstbeschreibungen, nur wenige weitere Berichte. Dies könnte zum einen auf das nur vereinzelte Auftreten einiger Spezies dieser Gattung in Untersuchungsmaterialien von Tier und Mensch zurückzuführen sein, zum anderen auch in einer unzureichenden Kenntnis von

Eigenschaften dieser Spezies, die in der Routinediagnostik eine Identifizierung ermöglichen würden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten nunmehr, neben klassischen mikrobiologischen Untersuchungstechniken, molekulare Untersuchungsverfahren vorgestellt werden, die mit Hilfe bislang für die Gattungen *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* noch nicht beschriebener Gen- bzw. Genomabschnitte, eine eindeutige Identifizierung aller neun bisher beschriebenen Spezies dieser Gattungen ermöglichte.

Sowohl die konventionellen Methoden als auch die vorgestellten PCR-vermittelten Nachweisverfahren könnten Eingang in die Routinediagnostik finden und dazu beitragen, die eigentliche Bedeutung von Bakterien der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* als Infektionserreger bei Tier und Mensch aufzuzeigen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten 11 Referenzkulturen von neun Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*, 43 *A. phocae*-Kulturen, isoliert von Seehunden und einer Kegelrobbe, sieben *A. haemolyticum*-Kulturen, isoliert von Pferden, eine *A. pluranimalium*-Kultur, isoliert von einem Hund, drei *A. (T.) bialowiezense*-Kulturen und sieben *A. (T.) bonasi*-Kulturen, isoliert vom Europäischen Bison, zwei *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und einem Gecko, und 26 *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, phänotypisch und genotypisch identifiziert und weitergehend charakterisiert werden.

Die Identifizierung der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen war aufgrund von kulturellen Eigenschaften, durch Nachweis der Hämolyse bzw. synergistischer oder antagonistischer Hämolysereaktionen und durch Nachweis biochemischer Eigenschaften möglich. Eine molekulare Charakterisierung der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen erfolgte durch 16S rDNA-Analysen und, als bislang für diese Gattungen noch nicht beschriebene Gen- bzw. Genomabschnitte, durch Sequenzierung der 16S-23S rDNA intergenic spacer-Region (ISR), der 23S rDNA, des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* und durch Sequenzierung des die Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase-kodierenden Gens *rpoB*. Die Ergebnisse der ISR- bzw. der 16S rDNA und 23S rDNA-Sequenzierungen führten zur Erstellung von spezifischen Oligonukleotidprimern für drei ISR-Genospezies von *A. phocae* (ISR-Gruppe I bis III) und für sechs weitere Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella*. Dies ermöglichte eine PCR-vermittelte Identifizierung der jeweiligen ISR-Genospezies bzw. Spezies. *A. phocae*-ISR-Gruppe I konnte im weiteren durch ein *A. phocae-sodA*-spezifisches Oligonukleotidprimerpaar und durch das Phocaelysin-kodierende Gen *phl*, die *A. haemolyticum*-Kulturen durch das Phospholipase D-kodierende Gen *pld* und die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen durch das Pyolysin-kodierende Gen *plo* weitergehend charakterisiert werden. Das Phocaelysin-kodierende-Gen *phl* von *A. phocae* stellt, vergleichbar mit dem Pyolysin-kodierenden-Gen *plo* von *A. (T.) pyogenes*, das Gen eines bisher noch nicht beschriebenen porenbildenden Toxins von *A. phocae* dar.

Die Charakterisierung von drei ISR-Genospezies von *A. phocae* korrelierte mit dem Nachweis des Phocaelysin-kodierenden Gens *phl* (ISR-Gruppe-I) und mit einigen kulturellen und biochemischen Merkmalen der Kulturen. Die Bedeutung dieser Unterschiede für die taxonomische Einordnung von *A. phocae* ist bislang allerdings noch unklar.

Die phänotypische und genotypische Identifizierung der bisher nur als humanpathogen bekannten Spezies *A. haemolyticum*, isoliert von Pferden, einer *A. pluranimalium*-Kultur, isoliert von einem Hund, und auch der *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von einer Bartagame und einem Gecko, gelang erstmalig bei den jeweiligen Tierarten. Die Isolierung der unterschiedlichen Spezies der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* der vorliegenden Untersuchungen erfolgte in der Regel mit zahlreichen weiteren Mikroorganismen unterschiedlicher Spezies, sodass, mit Ausnahme für die *A. (T.) pyogenes*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, über die Bedeutung der *Arcanobacterium*- bzw. *Trueperella*-Kulturen für das jeweilige Krankheitsbild keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

Die in den vorliegenden Untersuchungen aufgeführten konventionellen und molekularen Verfahren könnten die diagnostische Erkennung von Bakterien der Genera *Arcanobacterium* bzw. *Trueperella* in klinischem Untersuchungsmaterial verbessern helfen und darüber hinaus, zur Klärung der Bedeutung dieser Bakterien bei Infektionen von Tier und Mensch beitragen.

In the present study 11 reference cultures of nine species of genera *Arcanobacterium* or *Trueperella*, 43 *A. phocae* cultures, isolated from harbour seals and one grey seal, seven *A. haemolyticum*-cultures, isolated from horses, one *A. pluranimalium* culture, isolated from a dog, three *A. (T.) bialowiezense* and seven *A. (T.) bonasi* cultures, isolated from the European bison, two *A. (T.) pyogenes* cultures, isolated from a bearded dragon and a gecko, and 26 *A. (T.) pyogenes* cultures, isolated from mastitic cows, could be phenotypically and genotypically identified and further characterized.

All *Arcanobacterium* or *Trueperella* cultures of the present study could be identified by cultural properties, their hemolysis, by detection of synergistic and antagonistic hemolytic reactions and by determination of biochemical properties. A molecular characterization of the *Arcanobacterium* or *Trueperella* cultures was realized by 16S rDNA-analyses and, with gene or genome parts which had not been investigated for these genera, by sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region (ISR), the 23S rDNA, the superoxide dismutase A encoding gene *sodA* and the beta subunit of RNA polymerase encoding gene *rpoB*. The results of ISR, 16S rDNA and 23S rDNA sequencing allowed the design of specific oligonucleotide primers for three ISR-genospecies of *A. phocae* (ISR group I to III) and for six additional species of genera *Arcanobacterium* or *Trueperella*. This allowed a PCR-mediated identification of the respective ISR-genospecies or species. The *A. phocae* ISR group I could be further characterized by using an *A. phocae sodA* specific oligonucleotide primerpair and by amplification of the phocaelysin encoding gene *phl*, the *A. haemolyticum* cultures by amplification of phospholipase D encoding gene *pld* and the *A. (T.) pyogenes* cultures by amplification of pyolysin encoding gene *plo*. The phocaelysin encoding gene *phl* of *A. phocae* represents, comparable to the pyolysin encoding gene *plo* of *A. (T.) pyogenes*, a gene of a pore forming toxin of *A. phocae* which has not yet been described.

The occurrence of three genospecies of *A. phocae* correlated with the detection of phocaelysin encoding gene *phl* (ISR group I) and some cultural and biochemical characteristics of the cultures, although their significance for the taxonomic position of *A. phocae* remains unclear.

The phenotypic and genotypic identification of the species *A. haemolyticum* from horses, a species which has been regarded so far as a human pathogen, the *A. pluranimalium* culture, isolated from a dog, and the *A. (T.) pyogenes* species, isolated from a bearded dragon and a gecko, could for the first time be approved for the respective animal species. The isolation of

the different species of genera *Arcanobacterium* or *Trueperella* of the present study usually occurred with a number of various other microorganisms of different bacterial species. Consequently, with the exception of the *A. (T.) pyogenes* cultures, isolated from bovine mastitis, no final statement about the importance of the *Arcanobacterium* or *Trueperella* cultures for the respective disease could be made.

However, the conventional and molecular techniques which are described in the present study could contribute to improve the diagnostic detection of bacteria of genera *Arcanobacterium* or *Trueperella* and to clarify the significance of these bacteria in animal and human infections.

- Adderson, E. E., Croft, A., Leonard, R., Carroll, K.,** 1998. Septic arthritis due to *Arcanobacterium bernardiae* in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* 27, 211-212.
- Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D.,** 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends. Microbiol.* 17, 37-45.
- Adékambi, T., Berger, P., Raoult, D., Drancourt, M.,** 2006. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 133-143.
- Adékambi, T., Drancourt, M.,** 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2095-2105.
- Afseth, G., Mo, Y. Y., Mallavia, L. P.,** 1995. Characterization of the 23S and 5S rRNA genes of *Coxiella burnetii* and identification of an intervening sequence within the 23S rRNA gene. *J. Bacteriol.* 177, 2946-2949.
- Almuzara, M., de Mier, C., Barberis, C. M., Mattera, J., Famiglietti, A., Vay, C.,** 2002. *Arcanobacterium haemolyticum*: identification and susceptibility to nine antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 828-829.
- Altmann, G., Bogokovsky, B.,** 1973. Brain abscess due to *Corynebacterium haemolyticum*. *Lancet* 1, 378-379.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H.,** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.

**Azuma, R., Murakami, S., Ogawa, A., Okada, Y., Miyazaki, S., Makino T.,** 2009. *Arcanobacterium abortisuis* sp. nov., isolated from a placenta of a sow following an abortion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1469-1473.

**Bacot, C. M., Reeves, R. H.,** 1991. Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. *J. Bacteriol.* 173, 4234-4236.

**Barkley, K. B., Gregory, E. M.,** 1990. Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic *Actinomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 192-200.

**Barksdale, W. L., Li, K., Cummins, C. S., Harris, H.,** 1957. The mutation of *Corynebacterium pyogenes* to *Corynebacterium haemolyticum*. *J. Gen. Microbiol.* 16, 749-758.

**Barksdale, W. L.,** 1970. *Corynebacterium diphtheria* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* 34, 378-422.

**Barnham, M., Bradwell, R. A.,** 1992. Acute peritonsillar abscess caused by *Arcanobacterium haemolyticum*. *J. Laryngol. Otol.* 106, 1000-1001.

**Barry, T., Collieran, G., Glennon, M., Dunican, L. K., Gannon, F.,** 1991. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1, 51-56.

**Bemer, P., Eveillard, M., Touchais, S., Redon, H., Corvec, S.,** 2009. A case of osteitis due to *Staphylococcus aureus* and *Arcanobacterium bernardiae* coinfection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 327-329.

**Bemis, D. A., Bryant, M. J., Kania, S. A., Newman, S. J.,** 2008. Isolation of *Arcanobacterium hippocoleae* from a case of placentitis and stillbirth in a mare. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 688-691.

**Bernheimer, A. W., Linder, R., Avigad, L. S.,** 1979. Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. *Infect. Immun.* 23, 838-844.

**Billington, S. J., Jost, B. H., Cuevas, W. A., Bright, K. R., Songer, J. G.,** 1997. The *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiolactivated cytolysin family. *J. Bacteriol.* 179, 6100-6106.

**Billington, S. J., Jost, B. H., Songer, J. G.,** 2000. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 197-205.

**Billington, S. J., Post, K. W., Jost, B. H.,** 2002a. Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 159-162.

**Billington, S. J., Songer, J. G., Jost, B. H.,** 2002b. The variant undecapeptide sequence of the *Arcanobacterium pyogenes* haemolysin, pyolysin, is required for full cytolytic activity. *Microbiol.* 148, 3947-3954.

**Bisping, W., Amstberg, G.,** 1988. Grampositive, sporenlose Stäbchen. In: Bisping, W., Amstberg, G., (Hrsg.): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 45-48.

**Bousfield, I. J.,** 1972. A taxonomic study of some coryneforme bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 71, 441-455.

**Brückler, J., Schwarz, S., Untermann, F.,** 1994. Staphylokokken-Infektionen und Enterotoxine. Band II/1. In: Blobel, H., Schließer, T., (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

**Cai, H., Archambault, M., Prescott, J. F.,** 2003. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 465-469.

**Carlson, P., Lounatmaa, K. und Kontiainen, S.** 1994. Biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum*. J. Clin. Microbiol. 32, 1654-1657.

**Carlson, P., Kontiainen, S.,** 1994. Alpha-mannosidase: a rapid test for identification of *Arcanobacterium haemolyticum*. J. Clin. Microbiol. 32, 854-855.

**Chanter, N., Collin, N., Holmes, N., Binns, M., Mumford, J.,** 1997. Characterization of the Lancefield group C streptococcus 16S-23S RNA gene intergenic spacer and its potential for identification and sub-specific typing. Syst. Appl. Microbiol. 26, 97-103.

**Cheilley, R. J.,** 1977. Foot ulceration and vertebral osteomyelitis with *Corynebacterium haemolyticum*. Arch. Dermatol. 133, 646-647.

**Chiaruttini, C., Milet, M.,** 1993. Gene organization, primary structure and RNA processing analysis of a ribosomal RNA operon in *Lactococcus lactis*. J. Mol. Biol. 230, 57-76.

**Christie, R., Atkins, N. E., Munch-Petersen, E.,** 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 22, 197-200.

**Cisar, J. O., Vatter, A. E.,** 1979. Surface fibrils (fimbriae) of *Actinomyces viscosus* T14V. Infect. Immun. 24, 523-531.

**Clements, M. O., Watson, S. P., Foster, S. J.,** 1999. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. J. Bacteriol. 181, 3898-3903.

**Collins, M. D., Jones, D.,** 1982. Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the Genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb. nov. J. Gen. Microbiol. 128, 901-903.

**Collins, M. D., Jones, D., Kroppenstedt, R. M., Schleifer, K. H.,** 1982a. Chemical studies as a guide to the classification of *Corynebacterium pyogenes* and *Corynebacterium haemolyticum*. J. Gen. Microbiol. 128, 335-341.

**Collins, M. D., Jones, D., Schofield, G. M.,** 1982b. Reclassification of *Corynebacterium haemolyticum* (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov. J. Gen. Microbiol. 128, 1279-1281.

**Condon, C., Squires, C., Squires, C. L.,** 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 59, 623-645.

**Cuevas, W. A., Songer, J. G.,** 1993. *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase. D. Infect. Immun. 10, 4310-4316.

**Cummins, C. S., Harris, H.,** 1956. The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. J. Gen. Microbiol. 14, 583-600.

**Cummings, L. A., Wu, W. K., Larson, A. M., Gavin, S. E., Fine, J. S., Coyle, M. B.,** 1993. Effects of media, atmosphere, and incubation time on colonial morphology of *Arcanobacterium haemolyticum*. J. Clin. Microbiol. 31, 3223-3226.

**Ding, H., Lämmler, C.,** 1992. Evaluation of the API Coryne test system for identification of *Actinomyces pyogenes*. Zentralbl. Bakteriol. 39, 273-276.

**Ding, H., Lämmler, C.,** 1996. Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*. J. Vet. Med. B 43, 179-188.

**Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D.,** 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. 38, 3623-3630.

**Ebersson, F.,** 1918. A bacteriologic study of the diphtheroid organisms with special reference to Hodgkin's disease. J. Infect. Dis. 23, 1-42.

**Efferth, T.,** 2006. Molekulare Toxikologie. In: Efferth, T., (Hrsg.): Molekulare Pharmakologie und Toxikologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 158-161.

**Eisen, J. A.,** 1998. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res.* 8, 163-167.

**Ertas, H. B., Kilic, A., Özbey, G., Muz, A.,** 2005. Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from abscessed cattle kidney and identification by PCR. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 455-459.

**Esmay, P. A., Billington, S. J., Link, M. A., Songer, J. G., Jost, B. H.,** 2003. The *Arcanobacterium pyogenes* collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells. *Infect. Immun.* 71, 4368-4374.

**Eyers, M., Chapelle, S., Van Camp, G., Goossens, H., De Wachter, R.,** 1993. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3340-3343.

**Fraser, G.,** 1964. The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 88, 43-53.

**Freney, J., Duperron, M. T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J. M., Monget, D., Fleurette, J.,** 1991. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 29, 38-41.

**Forsman, P., Tilsala-Timisjärvi, A., Alatossava, T.,** 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.* 143, 3491-3500.

**Funke, G., Ramos, C. P., Fernández-Garayzábal, J. F., Weiss, N., Collins, M. D.,** 1995. Description of human-derived centers for disease control Coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 57-60.

**Gahrn-Hansen, B., Frederiksen, W.,** 1992. Human infections with *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 349-354.

**Gavin, S. E., Leonard, R. B., Briselden, A. M., Coyle, M. B.,** 1992. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1692-1695.

**Gentry, D. R., Burgess, R. R.,** 1993. Cross-linking of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. *Biochemistry.* 32, 11224-11227.

**Glage, F.,** 1903. Über den *Bacillus pyogenes suis* Grips, den *Bacillus pyogenes bovis* Künnemann und den bakteriologischen Befund bei den chronischen, abszedierenden Euterentzündungen der Milchkühe. *Z. Fleisch-Milchhyg.* 13, 166-175.

**Goodfellow, M., Collins, M. D., Minnikin, D. E.,** 1976. Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolysates of coryneform and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 96, 351-358.

**Gottschalk A., Bhargava, A. S.,** 1971. Neuraminidase. In: Boyer, P. D., (Eds.): *The Enzymes, V Hydrolysis: Sulfate esters, Carboxyl esters, Glycosides und Hydration.* 3<sup>th</sup> ed. Academic Press, Inc., New York, London. 321-341.

**Goyal, R., Singh, N. P., Mathur, M.,** 2005. Septic arthritis due to *Arcanobacterium haemolyticum*. *Indian. J. Med. Microbiol.* 23, 63-65.

**von Graevenitz, A., Funke, G.,** 1996. An identification scheme for rapidly and aerobically growing gram-positive rods. *Zentralbl. Bakteriol.* 284, 246-254.

**Guérin-Faublée, V., Flandrois, J. P., Richard, Y. G.,** 1993. Antimicrobial susceptibility testing of *Actinomyces pyogenes*: comparison of disk diffusion test and Api ATB Strep system with the agar dilution method. *Zentralbl. Bakteriol.* 279, 377-386.

**Gürtler, V., Barrie, H. D.,** 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiol.* 141, 1255-1265.

**Gürtler, V., Stanisich, V. A.,** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142, 3-16.

**Harland, N. M., Leigh, J. A., Collins, M. D.,** 1993. Development of gene probes for the specific identification of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* based upon large subunit rRNA gene sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 526-531.

**Hartwig, H., Marcus, I.,** 1962. Gelatinaseaktivität und proteolytische Eigenschaft der typischen und atypischen Corynebakterien des *Corynebacterium (C.) pyogenes*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd., Infektionskr., Hyg., Reihe I Orig: A*, 186, 544-549.

**Hassan, A. A., Khan, I. U., Abdulmawjood, A., Lämmler, C.,** 2001. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1618-1621.

**Hassan, A. A., Khan, I. U., Abdulmawjood, A., Lämmler, C.,** 2003. Inter- and intra-species variations of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of various streptococcal species. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 97-103.

**Hattel, A. L., Shaw, D. P., Fisher, J. S., Brooks, J. W., Love, B. C., Drake, T. R., Wagner, D. C.,** 2007. Mortality in Pennsylvania captive elk (*Cervus elaphus*): 1998-2006. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 334-337.

**Hebert, G. A., Hancock, G. A.,** 1985. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 22, 409-415.

**Hesselink, J. W., van den Tweel, J. G.,** 1990. Hypertrophic osteopathy in a dog with a chronic lung abscess. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 760-762.

**Hirsh, D. C., Biberstein, E. L.,** 2004. *Arcanobacterium*. In: Hirsh, D. C., MacLachlan, N. J., Walker, R. L., (Eds.): *Veterinary Microbiology*, 2<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford, 168-170.

**Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T.,** 1994. Irregular, nonsporing Grampositive rods. In: Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T., (Eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 573.

**Hoosen, A. A., Rasool, M. N., Roux, L.,** 1990. Posttraumatic ankle joint infection with *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report. *J. Infect. Dis.* 162, 780-781.

**Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., Rawn, J. D.,** 2008. Transkription und RNA-Prozessierung. In: Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., Rawn, J. D., (Hrsg.): *Biochemie*, 4. Auflage, Pearson Studium, München, 862-863.

**Hoyles, L., Falsen, E., Foster, G., Rogerson, F., Collins, M. D.,** 2002. *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 617-619.

**Hünken, M.,** 2004. Wechselwirkungen zwischen der antarktischen Eisdiatomee *Amphiprora kufferathii* MANGUIN und epiphytischen Bakterien unter besonderer Berücksichtigung des Oxidationsschutzes. Dissertation, Naturwissenschaften, Botany Marine University of Bremen.

**Ieven, M., Verhoeven, J., Gentens, P., Goosens, H.,** 1996. Severe infection due to *Actinomyces bernardiae*: case report. *Clin. Infect. Dis.* 22, 157-158.

**Jeffries, C. D., Holtman, D. F., Guse, D. G.,** 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.* 73, 590-591

**Jensen, M. A., Webster, J. A., Straus, N.,** 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *App. Environ. Microbiol.* 59, 945-952.

**Jobanputra, R. S., Swain, C. P.,** 1975. Septicaemia due to *Corynebacterium haemolyticum*. J. Clin. Pathol. 28, 798-800.

**Johnson, S. P., Jang, S., Gulland, F. M., Miller, M. A., Casper, D. R., Lawrence, J., Herrera, J.,** 2003. Characterization and clinical manifestations of *Arcanobacterium phocae* infections in marine mammals stranded along the central California coast. J. Wildl. Dis. 39, 136-144.

**Jones, D.,** 1975. A numerical study of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 87, 52-96.

**Jost, B. H., Billington, S. J.,** 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek. 88, 87-102.

**Jost, B. H., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 1999. An *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. Infect. Immun. 67, 1723-1728.

**Jost, B. H., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 2001. Cloning, expression and characterization of a neuraminidase gene from *Arcanobacterium pyogenes*. Infect. Immun. 69, 4430-4437.

**Jost, B. H., Post, K. W., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 2002a. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. Vet. Res. Commun. 26, 419-425

**Jost, B. H., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 2002b. Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase, and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. Infect. Immun. 70, 1106-1112.

**Jost, B. H., Trinh, H. T., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 2004a. A second tylosin resistance determinant, Erm B, in *Arcanobacterium pyogenes*. Antimicrob. Agents. Chemother. 48, 721-727.

**Jost B. H., Trinh, H. T., Songer, J. G., Billington, S. J.,** 2004b. Ribosomal mutations in *Arcanobacterium pyogenes* confer a unique spectrum of macrolide resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48, 1021-1023.

**Khamis, A., Colson, P., Raoult, D., La Scola, B.,** 2003. Usefulness of *rpoB* gene sequencing for identification of *Afipia* and *Bosea* species, including a strategy for the choice of discriminative partial sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6740-6749.

**Khamis, A., Raoult, D., La Scola, B.,** 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3925-3931.

**Khan, I. U., Hassan, A. A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M.,** 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J. Vet. Sci.* 4, 213-224.

**Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., Kook, Y. H.,** 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* 37, 1714-1720.

**Kirk, R. K., Svensmark, B., Ellegaard, L. P., Jensen, H. E.,** 2005. Locomotive disorders associated with sow mortality in Danish pig herds. *J. Vet. Med. A.* 52, 423-428.

**Kita, J., Dziaba, K., Piusinski, W., Kowalski, B., Lenartowicz, Z., Kingston, N., Drozd, J., Rutkowska, M., Krasinski, Z., Krupa, J., Lesniewski, S.,** 1994. Preliminary studies on the diagnosis of a disease of the genital organs of male European bison in the Bialowieza Forest of Poland. *IUCN Species Survival commission. Vet. Spec. Gr. Newslett.* 8, 8-9.

**Knippers, R., Philippsen, P., Schäfer, K. P., Fanning, E.,** 1990. Transkription, Translation und der genetische Code. In: Knippers, R., Philippsen, P., Schäfer, K. P., Fanning, E., (Hrsg.): *Molekulare Genetik*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 68-69.

**Ko, K. S., Lee, H. K., Park, M. Y., Lee, K. H., Yun, Y. J., Woo, S. Y., Miyamoto, H., Kook, Y. H.,** 2002. Application of RNA polymerase betasubunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2653-2658.

**Kolbert, C. P., Persing, D. H.,** 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 299-305.

**Konkel, M. E., Marconi, R. T., Mead, D. J., Cieplak, W. Jr.,** 1994. Identification and characterization of an intervening sequence within the 23S ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 14, 235-241.

**Kostman, J. R., Edlind, T. D., LiPuma, J. J., Stull, T. L.,** 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2084-2087.

**Kostman, J. R., Alden, M. B., Mair, M., Edlind, T. D., LiPuma, J. J., Stull, T. L.,** 1995. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Infect. Dis.* 171, 204-208.

**Kuhnert, P., Capaul, S. E., Nicolet, J., Frey, J.,** 1996. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1174-1176.

**Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. J., Pace, N. R.,** 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6955-6959.

**Lawson, P. A., Falsen, E., Foster, G., Eriksson, E., Weiss, N., Collins, M. D.,** 2001. *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 55-59.

**Lämmle, C.,** 1990. Untersuchungen zu möglichen Pathogenitätsfaktoren von *Actinomyces pyogenes*. Übersichtsreferat. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 103, 121-125.

**Lämmler, C.**, 1994. Studies on biochemical and serological characteristics and binding properties of *Arcanobacterium haemolyticum* for human plasma proteins. *Med. Microbiol. Lett.* 3, 66-71.

**Lämmler, C., Blobel, H.**, 1987. Synergistische und antagonistische haemolytische Reaktionen bakterieller Proteine. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 100, 95-99.

**Lämmler, C., Blobel, H.**, 1988. Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*. *Med. Microbiol. Immunol.* 177, 109-114.

**Lämmler, C., Hartwig, H.**, 1995. *Actinomyces pyogenes* und *Arcanobacterium haemolyticum*. In: Blobel, H., Schließer, T., (Hrsg.): *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, Band II/3. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 196-240.

**Lehnen, A., Busse, H. J., Frölich, K., Krasinska, M., Kämpfer, P., Speck, S.**, 2006. *Arcanobacterium bialowiezense* sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov., isolated from the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis, and emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1983. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 861-866.

**Lepargneur, J. P., Heller, R., Souliè, R., Riegel, P.**, 1998. Urinary tract infection due to *Arcanobacterium bernardiae* in a patient with a urinary tract diversion. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 399-401.

**Levy, C. E., Pedro, R. J., Nowakonski, A. V., Holanda, L. M., Brocchi, M., Ramos, M. C.**, 2009. *Arcanobacterium pyogenes* sepsis in farmer, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1131-1132.

**Lewin, B.**, 1988. Kontrolle der Initiation durch Wechselwirkungen zwischen RNA-Polymerase und Promotor In: Lewin, B., (Hrsg.): *Gene-Lehrbuch der molekularen Genetik*. 3<sup>th</sup> ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 175-178.

**Lewin, B.**, 1998. Proteinsynthese. In: Lewin, B., (Hrsg.): Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 145-146.

**Lewis, G. S.**, 1997. Uterine health and disorders. J. Dairy. Sci. 80, 984-994.

**Linder, R.**, 1984. Alteration of mammalian membranes by the cooperative and antagonistic actions of bacterial proteins. Biochim. Biophys. Acta. 779, 423-425.

**Linder, R.**, 1997. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: two "Coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. Emerg. Infect. Dis. 3, 145-153.

**Loiez, C., Tavani, F., Wallet, F., Flahaut, B., Senneville, E., Girard, J., Courcol, R. J.**, 2009. An unusual case of prosthetic joint infection due to *Arcanobacterium bernardiae*. J. Med. Microbiol. 58, 842-843.

**Loughney, K., Lund, E., Dahlberg, J. E.**, 1982. tRNA genes are found between 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 10, 1607-1624.

**Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Glavina del Rio, T., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Kyrpides, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Teshima, H., Brettin, T., Detter, J. C., Tapia, R., Han, C., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Markowitz, V., Cheng, J.-F., Hugenholtz, P., Woyke, T., Wu, D., Pukall, R., Gehrlich-Schroeter, G., Schneider, S., Klenk, H.-P., Eisen, J. A.**, 2010. *Arcanobacterium haemolyticum* DSM 20595 chromosome, complete genome. NCBI (GenBank-Zugangsnummer CP002045).

**Lucet, A.**, 1893. Recherches bacteriologiques sur la supuration chez les animaux de l'espèce bovine. Ann. Inst. Pasteur. 7, 325-331.

**Lynch, M., O'Leary, J., Murnaghan, D., Cryan, B.**, 1998. *Actinomyces pyogenes* septic arthritis in a diabetic farmer. J. Infect. 37, 71-73.

**MacLean, P. D., Liebow, A. A., Rosenberg, A. A.,** 1946. A haemolytic *Corynebacterium* resembling *Corynebacterium ovis* and *Corynebacterium pyogenes* in man. J. Infect. Dis. 19, 69-90.

**Maddocks, J. L., Greenan, M. J.,** 1975. A rapid method for identifying bacterial enzymes. J. Clin. Pathol. 28, 686-687.

**McCartney, C. A., Arbuthnott, J. P.,** 1978. Mode of action of membrane damaging toxins produced by staphylococci. In: Wadström, T., Jeljaszewicz, J., (Eds.): Bacterial toxins and cell membranes. Academic Press Inc., New York, London, 89-127.

**McCord, J. M., Fridovich, I.,** 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.

**McNamara, P. J., Cuevas, W. A., Songer, J. G.,** 1995. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. Gene, 156, 113-118.

**Mifflin, J. K., Blackall, P. J.,** 2001. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Lett. Appl. Microbiol. 33, 216-221.

**Miller, R. A., Brancato, F.,** 1984. Peritonsillar abscess associated with *Corynebacterium haemolyticum*. West. J. Med. 140, 449-451.

**Minárik, T., Sufliarsky, J., Trupl, J., Krcméry, V. Jr.,** 1997. *Arcanobacterium haemolyticum* invasive infections, including meningitis in cancer patients. J. Infect. 34, 91.

**Minniken D. E., Goodfellow, M., Collins, M. D.,** 1978. Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In: Bonsfield, I. J., Callely, A. G., (Eds.): Coryneform Bacteria. Academic Press, New York, London, 85-160.

**Mitscherlich, E., Marth, E. H.,** 1984. Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health. In: Mitscherlich, E., Marth, E. H., (Hrsg.): Microbial survival in the environment. Springer-Verlag, New York, Berlin. 802-854.

**Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D.,** 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol. Microbiol. 26, 1005-1011.

**Moore, R., Miyoshi, A., Pacheco, L. G. C., Seyffert, N., Azevedo, V.,** 2010. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*. In: Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., Thoen, C. O., (Eds.): Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford, 133-143.

**Morrison, J. R. A., Tillotson, G. S.,** 1988. Identification of *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* with the Api 20 Strep system. J. Clin. Microbiol. 26, 1865-1866.

**Naimi, A., Beck, G., Monique, M., Lefèbvre, G., Branlanti, C.,** 1999. Determination of the nucleotide sequence of the 23S ribosomal RNA and flanking spacers of an *Enterococcus faecium* strain, reveals insertion-deletion events in the ribosomal spacer 1 of enterococci. Syst. Appl. Microbiol. 22, 9-21.

**Narayanan, S., Nagaraja, T. G., Staats, J., Chengappa, M. M., Oberst, R. D.,** 1998. Biochemical and biological characterizations and ribotyping of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses in cattle. Vet. Microbiol. 61, 289-303.

**Nattermann, H., Horsch, F.,** 1977. Die *Corynebacterium-pyogenes*-Infektion des Rindes; 1. Mitteilung: Verbreitung des Erregers. Arch. Exp.Vet-Med. 31, 405-413.

**Na'was, T. E., Hollis, D. G., Moss, C. W., Weaver, R. E.,** 1987. Comparison of biochemical, morphologic, and chemical characteristics of Centers for Disease Control fermentative coryneform groups 1, 2, and A-4. J. Clin. Microbiol. 25, 1354-1358.

**Nour, M., Naimi, A., Beck, G., Branlant, C.,** 1995. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, primary and secondary structure. *Curr. Microbiol.* 31, 270-278.

**Pascual, C., Foster, G., Falsen, E., Bergström, K., Greko, C., Collins, M. D.,** 1999. *Actinomyces bowdenii* sp. nov., isolated from canine and feline clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4, 1873-1877.

**Parija, S. C., Kaliaperumal, V., Kumar, S. V., Sujatha, S., Babu, V., Balu, V.,** 2005. *Arcanobacterium haemolyticum* associated with pyothorax: case report. *BMC. Infect. Dis.* 5, 68-71.

**Plamondon, M., Martinez, G., Raynal, L., Touchette, M., Valiquette, L.,** 2007. A fatal case of *Arcanobacterium pyogenes* endocarditis in a man with no identified animal contact: case report and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 663-666.

**Pietrocola, G., Valtulina, V., Rindi, S., Jost, B. H., Speziale, P.,** 2007. Functional and structural properties of CbpA, a collagen-binding protein from *Arcanobacterium pyogenes*. *Microbiology*, 153, 3380-3389.

**Potel, J.,** 1982. Isolierung und Identifizierung von *Corynebacterium*, *Listeria* und *Erysipelothrix*. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Orig: A*, 253, 43-60.

**Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., Trieu-Cuot, P.,** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36, 41-47.

**Poyart, C., Quesnes, G., Trieu-Cuot, P.,** 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38, 415-418.

- Poyart, C., Quesnes, G., Boumaila, C., Trieu-Cuot, P.,** 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative Staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J. Clin. Microbiol. 39, 4296-4301.
- Preus, H. R., Sunday, G. J., Haraszthy, V. I., Zambon, J. J.,** 1992. Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* based on analysis of 23S ribosomal RNA. Oral Microbiol. Immunol. 7, 372-375.
- Prescott, J. F., Lastra, M., Barksdale, L.,** 1982. Equi factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. J. Clin. Microbiol. 16, 988-990.
- Ramos, C. P., Foster, G., Collins, M. D.,** 1997. 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.
- Reddy, C. A., Cornell, C. P., Fraga, A. M.,** 1982. Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 419-429.
- Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., Raoult, D.,** 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J. Clin. Microbiol. 39, 430-437.
- Richardson, A., Smith, P. J.,** 1968. Herd fertility and *Corynebacterium haemolyticum* in bovine semen. Vet. Rec. 83, 156-157.
- Roberts, D. C.,** 1967. The pathogenic synergy of *Fusiformis necrophorus* and *Corynebacterium pyogenes*: II. The response of *F. necrophorus* to a filterable product of *C. pyogenes*. J. Exp. Path., 48, 674-679.
- Roberts R. J.,** 1969. Isolation of *Corynebacterium haemolyticum* from a case of ovine pneumonia. Vet. Rec. 84, 490.

**Roeder, B. L., Chengappa, M. M., Lechtenberg, K. F., Nagaraja, T. G., Varga, G. A.,** 1989. *Fusobacterium necrophorum* and *Actinomyces pyogenes* associated facial and mandibular abscesses in Blue Duiker. J. Wildl. Dis. 25, 370-377.

**Rogosa, M., Cummins, C. S., Lelliott, R. A., Keddie, R. M.,** 1974. Coryneform group of bacteria. In: Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., (Eds.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 599-632.

**Rowland, G. C., Aboshkiwa, M., Coleman, G.,** 1993. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. Biochem. Soc. Trans. 21, 40S.

**Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., Mabilat, C.,** 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 669-674.

**Santos, T. M., Caixeta, L. S., Machado, V. S., Rauf, A. K., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C.,** 2010. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. Vet. Microbiol. 145, 84-89.

**Schaal, K. P.,** 1986. Genus *Actinomyces* Harz 1877. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G., (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1383-1418.

**Schaal, K. P., Schofield, G. M.,** 1981. Current ideas on the taxonomic status of the *Actinomycetaceae*. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I, 11, 67-78.

**Schaufuss, P., Sting, R., Lämmler, C.,** 1989. Isolation and characterization of an extracellular protease of *Actinomyces pyogenes*. Zentralbl. Bakteriol. 271, 452-459.

**Schofield, G. M., Schaal, K. P.,** 1981. A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. J. Gen. Microbiol. 127, 237-259.

**Schuster, A. R.,** 2008. Die Rolle der Superoxid-Dismutase in der Wasserstoffperoxid-abhängigen Apoptose. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau.

**Seimiya, Y. M., Takahashi, M., Tamura, T., Murakami, R., Haritani, M., Kimura, K. M.,** 2004. Fibrinonecrotic rhinitis caused by a concurrent infection of *Fusobacterium necrophorum* and *Arcanobacterium pyogenes* in a cow. J. Vet. Med. Sci. 66, 985-987.

**Silva, E., Gaivão, M., Leitão, S., Jost, B. H., Carneiro, C., Vilela, C. L., Lopes da Costa, L., Mateus, L.,** 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. Vet. Microbiol. 132, 111-118.

**Skalka, B., Smola, J., Pillich, J.,** 1979. A simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zentralbl. Bakteriol. Orig. A. 245, 283-286.

**Skurnik, M., Toivanen, P.,** 1991. Intervening sequences (IVSs) in the 23S ribosomal RNA genes of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. The IVSs in *Y. enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* have a common origin. Mol. Microbiol. 5, 585-593.

**Slack, J. M., Gerencser, M. A.,** 1975. Taxonomy and Nomenclature. In: Slack, J. M., Gerencser, M. A., (Eds.): *Actinomyces, Filamentous Bacteria. Biology and Pathogenicity.* Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, 7-13.

**Slifkin, M., Gil, G. M.,** 1983. Rapid biochemical tests for the identification of groups A, B, C, F, and G streptococci from throat cultures. J. Clin. Microbiol. 18, 29-32.

**Sneath, P. H. A., Cowan, S. T.,** 1958. An electro-taxonomic survey of bacteria. J. Gen. Microbiol. 19, 551-565.

**Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G.,** 1986. Irregular, nonsporing, Gram-positive rods. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G., (Eds.):

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, The Williams and Wilkins, Baltimore, 1383-1418.

**Souckova, A., Soucek, A.,** 1972. Inhibition of the hemolytic action of  $\alpha$  and  $\beta$  lysins of *Staphylococcus pyogenes* by *Corynebacterium haemolyticum*, *C. ovis* und *C. ulcerans*. Toxicon 10, 501-509.

**Straub, J. A., Hertel, C., Hammes, W. P.,** 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food. Prot. 62, 1150-1156.

**Stuart, M. R., Pease, P. E.,** 1972. A numerical study of the relationships of *Listeria* and *Erysipelothrix*. J. Gen. Microbiol. 73, 551-565.

**Stubbs, S., Collins, M.,** 1993. *A. haemolyticum* gene for 16S rRNA. NCBI (GenBank-Zugangsnummer X73952).

**Sultana, F., Kawamura, Y., Hou, X. G., Shu, S. E., Ezaki, T.,** 1998. 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.

**Tan, T. Y., Ng, S. Y., Thomas, H., Chan, B. K.,** 2006. *Arcanobacterium haemolyticum* bacteraemia and soft-tissue infections: case report and review of the literature. J. Infect. 53, 69-74.

**Thornton, S. M., Nolan, S., Gulland, F. M. D.,** 1998. Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995. J. Zoo Wildl. Med. 29, 171-176.

- Tilsala-Timisjärvi, A., Alatosava, T.,** 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 49-56.
- Ton-That, H., Marraffini, L. A., Schneewind, O.,** 2004. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* 53, 251-261.
- Travis, J., Potempa, J., Maeda, H.,** 1995. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* 3, 405-407.
- Trinh, H. T., Billington, S. J., Field, A. C., Songer, J. G., Jost, B. H.,** 2002. Susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* to tetracyclines, macrolides and lincosamides. *Vet. Microbiol.* 85, 353-359.
- Tyrrell, K. L., Citron, D. M., Jenkins, J. R., Goldstein, E. J.,** 2002. Periodontal bacteria in rabbit mandibular and maxillary abscesses. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1044-1047.
- Vargas J., Hernandez M., Silvestri C., Jiménez O., Guevara N., Carballo M., Rojas N., Riera J., Alayo E., Fernández M., Rodriguez-Morales A. J., Silva M.,** 2006. Brain abscess due to *Arcanobacterium haemolyticum* after dental extraction. *Clin. Infect. Dis.* 12, 1810-1811.
- Voges, O., Proskauer M.,** 1898. Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der Bakterien der hämorrhagischen Septicämie. *Zentralb. Hyg. Infekt.* 28, 20-32.
- Waller, K. S., Johnson, J., Wood, B. P.,** 1991. Radiological case of the month. Cavitary pneumonia due to *Arcanobacterium haemolyticum*. *Am. J. Dis. Child.* 145, 209-210.
- Whiley, R. A., Duke, B., Hardie, J. M., Hall, L. M.,** 1995. Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the 'Streptococcus milleri group'. *Microbiol.* 141, 1461-1467.

**Winkle, S.**, 1979. Mikrobiologische und Serologische Diagnostik. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, New York, Stuttgart.

**Worthington, M. G., Daly, B. D. T., Smith, F. E.**, 1985. *Corynebacterium haemolyticum* endocarditis on a native valve. South. Med. J. 78, 1261-1262.

**Woese, C. R.**, 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271.

**Wu, H., Fives-Taylor, P. M.**, 2001. Molecular strategies for fimbrial expression and assembly. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 12, 101-115.

**Yanagawa, R., Honda, E.**, 1976. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. Infect. Immun. 13, 1293-1295.

**Yassin, A. F., Hupfer, H., Siering, C., Schumann, P.**, 2010. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (In press)

**Yoshimura, H., Kojima, A., Ishimaru, M.**, 2000. Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. J. Vet. Med. B 47, 139-143.

**Younus, F., Chua, A., Tortora, G., Jimenez, V. E.**, 2002. Lemierre's disease caused by co-infection of *Arcanobacterium haemolyticum* and *Fusobacterium necrophorum*: a case report. J. Infect. 45, 114-117.

**Zolg, J. W., Philippi-Schulz, S.**, 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 2801-2812.

### **Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert:**

Hassan, A. A., **Mohyla, H.**, Kanbar, T., Alber, J., Lämmler, C., Abdulmawjood, A., Speck, S., Zschöck, M., Weiss, R., 2008. Molecular identification of *Arcanobacterium bialowiezense* and *Arcanobacterium bonasi* based on 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences. Vet. Microbiol. 130: 410-414.

Hassan, A. A., **Ülbegi-Mohyla, H.**, Kanbar, T., Alber, J., Lämmler, C., Abdulmawjood, A., Zschöck, M., Weiss, R., 2009. Phenotypic and genotypic characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* isolates from infections of horses. J. Clin. Microbiol. 47: 124-128.

**Ülbegi-Mohyla, H.**, Hassan, A. A., Kanbar, T., Alber, J., Lämmler, C., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., Siebert, U., Zschöck, M., 2009. Synergistic and antagonistic hemolytic activities of bacteria of genus *Arcanobacterium* and CAMP-like hemolysis of *Arcanobacterium phocae* and *Arcanobacterium haemolyticum* with *Psychrobacter phenylpyruvicus*. Res. Vet. Sci. 87: 186-188.

**Ülbegi-Mohyla, H.**, Hassan, A. A., Alber, J., Lämmler, C., Prenger-Berninghoff, E., Weiß, R., Zschöck, M., 2009. Identification of *Arcanobacterium pluranimalium* isolated from a dog by phenotypic properties and by PCR mediated characterization of various molecular targets. Vet. Microbiol. 142: 458-460.

**Ülbegi-Mohyla, H.**, Hijazin, M., Alber, J., Lämmler, C., Hassan, A. A., Prenger-Berninghoff, E., Weiß, R., Zschöck, M., 2009. Identification of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from a bearded dragon and from a gecko by phenotypic and genotypic properties. J. Vet. Sci. 11: 265-267.

### **Poster Presentation:**

**Mohyla, H.**, Hassan, A. A., Kanbar, T., Schlez, K., Alber, J., Lämmler, C., Petzinger, E., Zschöck, M., Weiss R., 2008. Molekulare Identifizierung von *Arcanobacterium pyogenes* durch PCR-vermittelten Nachweis speziesspezifischer Abschnitte des bakteriellen Genoms. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 29.09-02.10.2008.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. C. Lämmler danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine stets gewährte Unterstützung, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hilfen bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die sorgfältige und rasche Durchsicht des Manuskripts.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. R. Weiß für die überaus freundliche Hilfsbereitschaft und die konstruktiven Ideen. Bei den Mitarbeiterinnen der bakteriologischen Diagnostik, bei allen weiteren namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, möchte ich mich herzlich für die freundliche und kompetente Unterstützung bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. A. A. Hassan für die Einführung in molekularbiologische Techniken, für seine hilfreichen und förderlichen Vorschläge, seine Geduld und freundschaftliche Mitwirkung an meinen Studien.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. A. Abdulmawjood für und bei Herrn Dr. Ö. Akneden ihrer freundlichen Unterstützungen.

Herrn Dr. J. Alber danke ich für seine zeit- und ortsunabhängige Hilfe und auch sehr für die zusammen verbrachte Zeit und den Austausch, sowohl fachlich als auch fachfremd. Herrn Prof. Dr. E. Petzinger danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Herrn Dr. M. Zschöck vom LHL danke ich für die überaus freundliche Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Ursula Siebert für das zur Verfügung gestellte Probenmaterial aus dem Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Büsum.

Für die Zusammenarbeit im Bezug auf die statistischen Auswertungen gilt mein Dank Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. J. Brückler für die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts.

Meinen wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen Muaz Hijazin, Ebtisam Essid, Emre Karakus, Kurt Stumpf, Christoph Zimmermann und auch allen anderen Mitarbeitern, die nicht namentlich genannt wurden, aber an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben, danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Freundin Hüsne Aslan und Familie Akkas für die kontinuierliche Motivation und Unterstützung bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Ferit, insbesondere für Ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation sowie für Ihre Geduld.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5695-7



9 78 3 835 9 5695 7