

**WEITERENTWICKLUNG EINES TEST-SYSTEMS ZUR  
PHYSIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON FAKULTATIV  
ANAEROBEN (FERMENTATIVEN) AKTINOMYZETEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

FLORIAN STÖCKIGT  
aus Hachenburg

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Peter Schaal
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Schorle

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2007

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Peter Schaal

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>9</b>
2.1. <i>Klassifizierung der fakultativ anaeroben Aktinomyzeten.....</i>	<i>9</i>
2.1.1. Geschichte .....	9
2.1.2. Moderne Methoden der Klassifizierung.....	11
2.2. <i>Identifizierung .....</i>	<i>14</i>
2.2.1. Morphologie.....	15
2.2.2. Chemotaxonomische Merkmale und Stoffwechsellendprodukte.....	20
2.2.3. Physiologische Merkmale .....	22
2.2.4. Serologische Techniken .....	24
2.3. <i>Natürliches Vorkommen.....</i>	<i>25</i>
2.3.1. Vorkommen beim Menschen .....	25
2.3.2. Vorkommen bei Tieren .....	26
2.3.3. Vorkommen in der freien Natur.....	27
2.4. <i>Bedeutung als Krankheitserreger .....</i>	<i>27</i>
2.4.1. Aktinomykosen .....	27
2.4.2. Entzündungen der Tränenkanälchen – Canaliculitis lacrimalis.....	34
2.4.3. Karies und Parodontitis .....	34
2.4.4. Weitere Erkrankungen durch fermentative Aktinomyzeten .....	35
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.1. <i>Stammauswahl .....</i>	<i>36</i>
3.2. <i>Kulturelle Technik.....</i>	<i>36</i>
3.3. <i>Das Testsystem – Bestimmung physiologischer Merkmale.....</i>	<i>40</i>
3.3.1. Herstellung der Medien für die physiologischen Tests.....	40
3.3.2. Fertigstellung der Testplatten.....	42

3.3.3.	Herstellung des Basalmediums für die Bakteriensuspension.....	43
3.3.4.	Testablauf.....	43
3.4.	<i>Bestimmung morphologischer Merkmale</i> .....	45
3.5.	<i>Statistische Auswertung</i> .....	46
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
4.1.	<i>Vorversuche</i> .....	48
4.2.	<i>Statistische Ergebnisse</i> .....	49
4.2.1.	Clusteranalyse unter Verwendung des $S_{SM}$ -Koeffizienten.....	49
4.2.2.	Clusteranalyse unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten.....	56
4.3.	<i>Näherungsmatrix</i> .....	61
4.4.	<i>Validitätsprüfung</i> .....	64
4.5.	<i>Reliabilitätsprüfung</i> .....	76
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>85</b>
5.1.	<i>Miniaturisierte Testsysteme im Vergleich</i> .....	85
5.2.	<i>Probleme dieses Testsystems</i> .....	87
5.3.	<i>Testausfälle</i> .....	89
5.4.	<i>Bedeutung der Ergebnisse</i> .....	89
5.4.1.	Die Koeffizienten der Clusteranalyse .....	90
5.4.2.	Bedeutung der morphologischen Merkmale .....	91
5.4.3.	Auswertung der Dendrogramme .....	92
5.4.4.	Reliabilität und Validität .....	93
5.4.5.	Diagnostische Tabelle .....	94
5.4.6.	Ausblicke .....	95
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenanhang</b> .....	<b>98</b>

7.1.	<i>Dendrogramm Nr.1a Simple-Matching-Koeffizient</i> .....	99
7.2.	<i>Dendrogramm Nr.1b Simple-Matching-Koeffizient</i> .....	101
7.3.	<i>Dendrogramm Nr.2a Simple-Matching-Koeffizient</i> .....	103
7.4.	<i>Dendrogramm Nr.2b Simple-Matching-Koeffizient</i> .....	105
7.5.	<i>Dendrogramm Nr.3 Jaccard-Koeffizient</i> .....	107
7.6.	<i>Dendrogramm Nr.4 Jaccard-Koeffizient</i> .....	109
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>128</b>

## 1. Einleitung und Fragestellung

Die Aktinomyzeten, einst als „Strahlenpilze“ bezeichnet, bilden eine sehr heterogene Gruppe in der Klasse der *Actinobacteria*. 84 Gattungen und mehrere hundert Arten konnten bis heute mit Hilfe der 16S rRNA-Gensequenzanalyse bestätigt oder neu abgegrenzt werden, und es besteht die Tendenz, weitere Aufgliederungen vorzunehmen.

Bei den Aktinomyzeten handelt es sich um grampositive, hauptsächlich diphtheroid geformte Stäbchenbakterien, welche dazu neigen, in verzweigten Geflechten zu wachsen. Dieses Wachstumsverhalten führte primär zu ihrer Namensgebung. Darüber hinaus besitzen einige Arten die Fähigkeit, sich wie Pilze über Dispersionssporen zu verbreiten und zu vermehren. DNA-Analysen und ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften - wie prokaryontischer Zellaufbau, Murein-Zellwand, Zellgröße, Bakteriophagen- und Antibiotikaempfindlichkeit - belegen aber eindeutig ihre Zugehörigkeit zur Domäne *Bacteria* der Prokaryonten.

Aufgrund physiologischer und ökologischer Merkmale lassen sich die Aktinomyzeten in zwei Gruppen einteilen. Die größere der beiden umfasst obligat aerobe Aktinomyzeten, welche in der freien Natur, im Erdboden, im Oberflächenwasser und auf Pflanzen vorkommen und an der Remineralisierung toter organischer Substanz beteiligt sind. Die kleinere Gruppe besitzt einen fermentativen Kohlenhydrat-Metabolismus und gehört zu den obligaten Kommensalen des Oropharynx und der inneren Körperoberflächen von Mensch und Tier. Sie umfasst vor allem die nicht sporenbildenden Bakterien der Familien *Actinomycetaceae*, *Propionibacteriaceae* und *Bifidobacteriaceae* aus den Ordnungen *Actinomycetales* und *Bifidobacteriales* (Stackebrandt et al., 1997).

Von medizinischer Bedeutung sind unter anderem die Verursacher zahlreicher Infektionskrankheiten (*Actinomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* oder *Dermatophilus*). Einige aerobe Aktinomyzeten, wie *Saccharomonospora* oder *Saccharopolyspora*, wirken als biologische Allergene und können zur Farmerlunge, einer extrinsischen allergischen Alveolitis, führen. Darüber hinaus vermögen manche Arten wichtige Antibiotika zu produzieren (zum Beispiel *Streptomyces* oder *Micromonospora*).

Zu den im Vordergrund stehenden Erkrankungen, an deren Genese verschiedene fermentative Aktinomyzeten beteiligt sind, zählen die Aktinomykosen, Entzündungen der Tränenkanälchen (*Canaliculitis lacrimalis*), Parodontitis und Karies. Auch können einige Arten Verursacher uncharakteristischer Haut- und Schleimhautentzündungen sein.

Bei der Aktinomykose handelt es sich um eine chronisch destruierende, granulomatös-eitrige Entzündung meist im Zervikofazialbereich, die unbehandelt tödlich verlaufen kann. Nach gesicherter Diagnose ist durch eine Kombination aus chirurgischer Sanierung und medikamentöser Behandlung die Krankheit aber kurierbar und die Prognose somit gut. Der rasche Erregernachweis spielt eine zentrale Rolle in der Behandlung, bereitet allerdings - bedingt durch hohe Anforderungen an die Nährmedien und Kulturbedingungen - etliche Probleme. Er ist zeitaufwendig, da die Aktinomyzeten auch unter optimalen Bedingungen nur langsam wachsen. Außerdem muss zwischen pathogenen Aktinomyzeten und harmlosen Schleimhautbewohnern unterschieden werden. Dies stellt hohe Ansprüche an den Untersucher und setzt viel Erfahrung voraus. Einfache morphologische Merkmale in Form von kulturellem und zellulärem Aussehen reichen für die zuverlässige Arterkennung bei weitem nicht aus.

Mehrere Verfahren sind entwickelt worden, um die Diagnose zu erleichtern und rasch mit der Therapie beginnen zu können. Dazu zählt die Analyse von taxonomisch relevanten Zellwandbestandteilen, direkte und indirekte Immunfluoreszenzverfahren, molekularbiologische Identifizierungsverfahren, die gaschromatographische Analyse von Endprodukten des fermentativen Stoffwechsels sowie die Prüfung zahlreicher, in ihrer Gesamtheit repräsentativer, physiologischer Leistungen. Zu letzterer zählt das von Schofield und Schaal getestete Miniték<sup>®</sup>-System (Schofield und Schaal, 1979b) und die von Dahlen getesteten Taxa Profile C<sup>®</sup>- und Taxa Profile E<sup>®</sup>-Systeme (Dahlen, 2004).

Das Miniték<sup>®</sup>-System erwies sich mit seinen 20 Nachweisreaktionen als zuverlässig, bedeutete einen nur geringen zeitlichen Aufwand (nach Erhalt der Reinkultur ca. neun Tage) und war einfach zu handhaben. Dieses System wird nicht mehr hergestellt, und auf der Suche nach Alternativen wurden die Taxa Profile C<sup>®</sup>- und Taxa Profile E<sup>®</sup>-Systeme getestet, die allerdings nicht als routinemäßig einsetzbar eingestuft wurden (Dahlen, 2004). Bedingt durch die hohe

Anzahl an Nachweisreaktionen (382) sind sie darüber hinaus auch mit einem höheren Arbeitsaufwand verbunden. Ferner besitzen sehr viele ihrer Einzelreaktionen keine Aussagekraft.

In Bezug auf diese Vorgeschichte sowie die Bedeutung der lange Zeit vernachlässigten durch fermentative Aktinomyzeten hervorgerufenen Erkrankungen und die Schwierigkeit ihrer Identifizierung und Klassifizierung ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen:

1. Es sollte in Eigenarbeit ein miniaturisiertes Testsystem entwickelt werden, das es ermöglicht, relativ schnell und zuverlässig fermentative Aktinomyzeten zu identifizieren und zu klassifizieren.
2. Die Ergebnisse sollten mit Hilfe einer Clusteranalyse ausgewertet werden. Es sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit diesem Testsystem bis auf Speziesebene innerhalb der Familie der *Actinomycetaceae* zu klassifizieren und zu identifizieren.
3. Das entwickelte Testsystem sollte darüber hinaus für den Routinebetrieb einsetzbar sein und ein zuverlässiges Nachfolgesystem zum bisher im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn benutzten Minitek®-System (BD, Microbiology Systems, Baltimore) bilden können, da dessen Produktion eingestellt wurde.
4. Die Ergebnisse sollten mit den bestehenden modernen Vorstellungen zur Taxonomie dieser Bakteriengruppe verglichen werden und Speziesdefinitionen ggf. ergänzt oder korrigiert werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. **Klassifizierung der fakultativ anaeroben Aktinomyzeten**

#### 2.1.1. Geschichte

Die Entdeckung des ersten Vertreters des Genus *Actinomyces* reicht zurück bis ins Jahr 1877, als der deutsche Veterinärmediziner Otto Bollinger bei einer chronisch-destruierenden Entzündung in Kiefer und Zunge eines Rindes kleine, harte Körnchen („Drusen“) feststellte, welche aus filamentösen, pilzartigen Strukturen bestanden (Bollinger, 1877). Der Botaniker C. O. Harz bestätigte 1877 die mikrobiologische Herkunft dieser Strukturen und benannte sie, auf Grund der radiär-strahlenartigen Anordnung der Strukturen, *Actinomyces* („Strahlenpilz“ von griech. aktis: Strahl; griech. mykes: Pilz) *bovis* (Harz, 1877). James Israel beschrieb 1878 eine ähnliche Erkrankung beim Menschen (Israel, 1878). Der kulturelle Nachweis misslang allerdings, bis 1889 Bujwid erste Erfolge bei der Anzucht des Organismus hatte (Bujwid, 1889). Zwei Jahre später veröffentlichten Wolff und Israel eine genauere Beschreibung des Erregers (Wolff und Israel, 1891). Seine Namengebung *Actinomyces israelii* geht auf Lachner-Sandoval zurück (Lachner-Sandoval, 1898).

Buchanan führte 1918 die Ordnung *Actinomycetales* ein, welche zum damaligen Zeitpunkt noch grampositive und gramnegative, fädige Bakterien enthielt (Buchanan, 1918). Die damals bekannten Aktinomyzeten wurden in der recht inhomogenen Familie der *Actinomycetaceae* mit den Gattungen *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces* und *Nocardia* zusammengefasst.

Nach und nach wurde diese Einteilung verfeinert. So wurden in der 6. Auflage des Standardwerkes Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Waksman und Henrici, 1948) alle gramnegativen Bakterien herausgenommen und in der 8. Auflage (Slack, 1974) für die Nocardien die eigene Familie der *Nocardiaceae* eingeführt. Danach umfasste die Familie der *Actinomycetaceae* grampositive, verzweigte und zur Fragmentation neigende Stäbchenbakterien, die weder Luftmyzel noch Sporen bilden, hohe Nährstoffansprüche stellen, nicht säurefest und unbeweglich sind, fakultativ bis obligat anaerob wachsen und einen fermentativen Kohlenhydrat-

Metabolismus aufweisen. Darunter fielen im einzelnen die Gattungen *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bifidobacterium*, *Bacterionema* und *Rothia* (Tabelle 1).

Tabelle 1

**Familie Actinomycetaceae Buchanan 1918**

(nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Auflage, 1974)

Genera	Spezies
I. <i>Actinomyces</i> (Buchanan, 1918)	<i>A. bovis</i> (Harz, 1877) <i>A. odontolyticus</i> (Batty, 1958) <i>A. israelii</i> (Lachner-Sandoval, 1898) <i>A. naeslundii</i> (Thompson und Lovestedt, 1951) <i>A. viscosus</i> (Georg et al., 1969)
II. <i>Arachnia</i> (Pine und Georg, 1969b)	<i>A. propionica</i> (Pine und Georg, 1969b)
III. <i>Bifidobacterium</i> (Orla-Jensen, 1924)	11 Spezies anerkannt
IV. <i>Bacterionema</i> (Gilmour et al., 1961)	<i>B. matruchotii</i> (Gilmour et al., 1961)
V. <i>Rothia</i> (Georg und Brown, 1967)	<i>R. dentocariosa</i> (Georg und Brown, 1967)

Bis in die Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts enthielt die Liste fermentativer Aktinomyzeten folgende Spezies (in chronologischer Reihenfolge): *Actinomyces bovis* (Harz, 1877), *A. israelii* (Lachner-Sandoval, 1898), *Rothia dentocariosa* (1949), *Actinomyces naeslundii* (Thompson und Lovestedt, 1951), *A. odontolyticus* (Batty, 1958), *Bacterionema matruchotii* (heute: *Corynebacterium matruchotii*) (Gilmour et al., 1961), *Arachnia propionica* (heute: *Propionibacterium propionicum*) (Charfreitag et al., 1988; Pine und Georg, 1969a), *Actinomyces viscosus* (1965), *A. eriksonii* (heute: *Bifidobacterium dentium*) (1965) und *Actinomyces humiferus* (heute: *Cellulomonas humilata*) (Collins und Pascual, 2000; Gledhill et al., 1969).

Ab 1984 folgten „explosionsartig“ viele weitere Beschreibungen: *Actinomyces denticolens*, 1984 (Dent und Williams, 1984a); *A. howellii*, 1984 (Dent und Williams, 1984b); *A. hordeovulneris*, 1984 (Buchanan et al., 1984); *A. slackii*, 1986 (Dent und Williams, 1986); *A. georgiae*, 1990

(Johnson et al., 1990); *A. gerencseriae*, 1990 (Johnson et al., 1990); *A. hyovaginalis*, 1993 (Collins et al., 1993); *A. neuui ssp. neuui et anitratus*, 1994 (Funke et al., 1994); *A. radingae*, 1995 (Wüst et al., 1995); *A. turicensis*, 1995 (Wüst et al., 1995); *A. bernardiae* (heute: *Arcanobacterium bernardiae*), 1995 (Funke et al., 1995); *Actinomyces graevenitzii*, 1997 (Pascual et al., 1997); *A. europaeus*, 1997 (Funke et al., 1997a); *A. bowdenii*, 1999 (Pascual et al., 1999); *A. urogenitalis*, 2000 (Nikolaitchouk et al., 2000); *A. radidentis*, 2000 (Collins et al., 2000); *A. canis*, 2000 (Hoyles et al., 2000); *A. catuli*, 2001 (Hoyles et al., 2001b); *A. suimastitidis*, 2001 (Hoyles et al., 2001a); *A. marimammalium*, 2001 (Hoyles et al., 2001c); *A. funkei*, 2001 (Lawson et al., 2001b); *A. coleocanis*, 2002 (Hoyles et al., 2002); *A. cardiffensis*, 2002 (Hall et al., 2002).

Ergänzend sollen noch einige Arten taxonomisch eng verwandter Spezies mit aufgeführt werden, wie z.B. *Arcanobacterium haemolyticum*, 1982 (Collins et al., 1982b); *Actinobaculum schaalii*, 1997 (Lawson et al., 1997); *Eubacterium suis* (heute *Actinobaculum suis*), 1992/1997 (Lawson et al., 1997; Ludwig et al., 1992); *Arcanobacterium phocae*, 1997 (Ramos et al., 1997); *Arcanobacterium pyogenes*, 1997 (Ramos et al., 1997) *Arcanobacterium pluranimalium*, 2001 (Lawson et al., 2001a);

### 2.1.2. Moderne Methoden der Klassifizierung

Das rein morphologische Klassifizierungsprinzip, welches lange Zeit die Grundlage zur Einteilung der Aktinomyzeten bildete, musste mit der Einführung modernerer Methoden zur Klassifizierung als unzureichend angesehen werden und verlassen werden. Nur unsicher konnten die Aktinomyzeten von coryneformen Bakterien unterschieden werden (Goodfellow und Minnikin, 1981). Die Eigenschaft bestimmter Stämme, verzweigte, myzeliale Fäden in frühen Wachstumsstadien zu bilden, wie es z.B. für *Actinomyces israelii* oder *Propionibacterium propionicum* beschrieben ist („spider-like“ colonies), ist noch nicht einmal ein konstantes oder generelles Merkmal, sondern ist oft nur auf die ersten Bebrütungsstunden oder –tage beschränkt oder wird nur rudimentär ausgebildet (Schaal, 1984; Schaal, 1986a; Schaal, 1986b; Schaal, 2001; Schaal und Pulverer, 1981; Slack und Gerencser, 1975).

Die 8. Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology brachte mit ihrem Klassifizierungsprinzip größere Klarheit in die Taxonomie der Aktinomyzeten (Tabelle 1), doch blieb auch sie noch weit entfernt von einer natürlichen und phylogenetischen Systematik.

Seit Mitte der 60er Jahre begann man, moderne taxonomische Techniken in der Klassifizierung zu benutzen, wie z.B. die zu den chemotaxonomischen Verfahren zählende Zellwandanalyse (Amdur et al., 1978; Collins et al., 1982a; Johnson und Cummins, 1972; Kroppenstedt und Kutzner, 1978; Pandhi und Hammound, 1978; Pine, 1970; Pine und Boone, 1967; Schleifer und Seidl, 1985). Molekulargenetische Methoden, zu denen die Bestimmung des Guanin-Cytosin Gehaltes, die DNA-DNA-Hybridisierung, die DNA-rRNA-Hybridisierung und die 16S rRNA-Sequenzierung gehören, gewannen immer mehr an Bedeutung (Charfreitag und Stackebrandt, 1989; Coykendall und Munzenmaier, 1979; Hall et al., 2001; Pott et al., 1994; Stackebrandt und Charfreitag, 1990; Stackebrandt und Goebel, 1994; Sutter und Finegold, 1972; Tang et al., 2003). Des weiteren zeigten numerisch-phenetische Studien (Fillery et al., 1978; Holmberg und Hallander, 1973; Holmberg und Nord, 1975; Schaal und Gatzler, 1985; Schaal und Schofield, 1981a; Schaal und Schofield, 1981b; Schofield und Schaal, 1981), Elektronenmikroskopie (Boyd und Williams, 1971; Garant et al., 1979), serologische (Bowden et al., 1976), biochemische und chemische Methoden eine Aussagekraft, die weit über die bisherige rein morphologische Klassifizierung hinausreichten.

Es zeigte sich, dass die Familie der *Actinomycetaceae* sehr verschiedenartige und zum Teil zu verschiedenen phylogenetischen Gruppen gehörende Mikroorganismen enthielt. Vor allem mit Hilfe der DNA-rRNA-Hybridisierung und der 16S rDNA-Sequenzierung konnten diese phylogenetischen Verwandtschaften nachgewiesen werden (Charfreitag und Stackebrandt, 1989; Fox et al., 1977; Hori und Osawa, 1976; Ramos et al., 1997; Stackebrandt et al., 1997; Stackebrandt und Charfreitag, 1990).

Die breit angelegte numerisch-taxonomische Analyse von Schofield und Schaal (1981) brachte viele wichtige Informationen zu Redefinitionen von Gattungen und Arten. Drei Jahre später stellte ein neues, auf genetischer, chemotaxonomischer und phenetischer Grundlage basierendes Klassifizierungsprinzip (Goodfellow und Cross, 1984) die bisherige Ordnung der

*Actinomycetales* in Frage. Hiernach werden zu den Aktinomyzeten grampositive Bakterien gerechnet, deren Guanin-Cytosin-Gehalt >55mol% liegt und die in Bezug auf die 16S rRNA-Sequenzierung und die DNA-DNA- bzw. DNA-rRNA-Hybridisierung phylogenetisch verwandt sind. Dies führte zur provisorischen Schaffung der supragenerischen Einheit der „Aktinobakterien“, welche die „typischen“ *Actinomycetaceae* mit den Gattungen *Agromyces*, *Brevibacterium*, *Cellomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* und *Renibacterium* vereinigte.

Zur Zeit liegt der Vorschlag für ein neues, umfassendes, hierarchisches Klassifizierungssystem vor (Stackebrandt et al., 1997), welches sich nur noch auf die molekularbiologischen Eigenschaften stützt. Dieses System fasst alle grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt ihrer DNA (>50mol%) in der Klasse *Actinobacteria* zusammen. Von den fünf vorhandenen Unterklassen besitzt nur die Unterklasse *Actinobacteridae* mit den Ordnungen *Actinomycetales* und *Bifidobacteriales* humanmedizinische Bedeutung (Tabelle 2). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2000, 2. Auflage, findet sich die Klasse der *Actinobacteria* im Phylum BXIV „*Actinobacteria*“ wieder. Einige Mitglieder der Klasse, wie z.B. *Corynebacteriaceae* oder *Mycobacteriaceae*, gehören im engeren Sinne nicht zu den Aktinomyzeten, da sie kaum Verzweigungen und nie myzeliale Geflechte ausbilden. Die Gattung *Thermoactinomyces*, die morphologisch typische Aktinomyzeten repräsentiert, wird demgegenüber auf Grund ihres niedrigen GC-Gehaltes ihrer DNA, ihrer Endosporenbildung und ihrer 16S rDNA-Sequenz zur Familie *Bacillaceae* gerechnet (Schaal, 2001).

Tabelle 2**Klasse *Actinobacteria* nach Stackebrandt et al., 1997:**

Familien mit humanmedizinischer Bedeutung, die der Sammelbezeichnung „Aktinomyzeten“ entsprechen (Auswahl nach Schaal, 2001)

<b>Unterklasse</b>	<b>Ordnung</b>	<b>Unterordnung</b>	<b>Familie</b>
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
		<i>Micrococcineae</i>	<i>Dermatophilaceae</i>
		<i>Corynebacterineae</i>	<i>Gordoniaceae</i>
			<i>Nocardiaceae</i>
			<i>Tsukamurellaceae</i>
		<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>
		<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
		<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomyetaceae</i>
		<i>Streptosporangineae</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>
			<i>Thermomonosporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Bifidobacteriaceae</i>

## **2.2. Identifizierung**

Die Aktinomyzeten, welche in die Gruppe der fakultativ bis obligat anaeroben, grampositiven, sporenlösen Stäbchenbakterien gehören, stellen den Untersucher klinischen Materials vor erhebliche nachweistechnische und differenzialdiagnostische Probleme. Sie lassen sich nicht nur sehr schwierig anzüchten, sondern bilden auch noch eine so heterogene Gruppe, dass die Unterscheidung klinisch bedeutender Isolate von Verunreinigungen oder apathogenen Kommensalen der physiologischen Standortflora des Menschen oder Tieres mitunter sehr schwierig ist.

Bei der Isolierung der Bakterien sollten für die Anreicherungs- und die primären Oberflächenkulturen hochwertige Universalmedien wie Thioglykolatbouillon, Brain-Heart-Infusion- (in Folgenden als BHI bezeichnet) oder Trypticase-Soja-Bouillon bzw. BHI-,

Trypticase-Soja- oder Schaedler-Agar verwendet werden. Die besten kulturellen Ergebnisse werden mit Tarozzi-Bouillon und CC-Medium nach Heinrich und Korth erzielt. Das optimale Wachstum erhält man unter erhöhter CO<sub>2</sub>-Spannung; die Sauerstofftoleranz variiert von Spezies zu Spezies (Schaal, 1992a). Universell zur Anzucht praktisch aller Aktinomyzeten-Arten geeignet ist das Fortner-Verfahren (Fortner, 1928). Hierbei wird die halbe Oberfläche einer flachen Petrischale aus Glas dicht mit *Serratia marcescens* beimpft. Der anzuzüchtende Stamm wird fraktioniert auf der verbleibenden Oberfläche ausgeimpft. Die Schale wird mit der Öffnung nach unten auf eine Glasscheibe gelegt und mit Plastilin rundherum abgedichtet. Bei der Bebrütung verbraucht *Serratia* den Sauerstoff und produziert CO<sub>2</sub>. Die beste Wachstumstemperatur liegt für die meisten humanmedizinisch bedeutsamen Aktinomyzeten Arten bei 35-37°C.

### 2.2.1. Morphologie

Es handelt sich bei den Mitgliedern der Gattung *Actinomyces* um grampositive, fakultativ bis obligat anaerobe Stäbchenbakterien. Sie zeigen deutliches, rudimentäres oder fehlendes Substratmyzel, welches, soweit vorhanden, mehr oder weniger rasch in stäbchenförmige oder gelegentlich kokkoide Fragmentationsformen zerfällt. Lufthyphen, Konidien oder andere typische Dispersionssporen werden in der Regel nicht gebildet (Schaal, 1986a; Schaal, 1992a).

Die Stäbchen variieren sehr in Länge und Form. Sie kommen als gerade oder leicht gebogene, unterschiedlich lange, 0,2-1,0µm dicke Stäbchen oder schlanke, leicht gewellte, bis 1,0µm dicke Fäden mit echten Verzweigungen vor (Abbildung 1). Sämtliche Arten sind nicht-säurefest und unbeweglich. Der Gram-Farbstoff wird häufig nur unregelmäßig aufgenommen bzw. festgehalten, so dass quergestreifte oder diplokokkenartige Bilder resultieren (Schaal, 1992a).

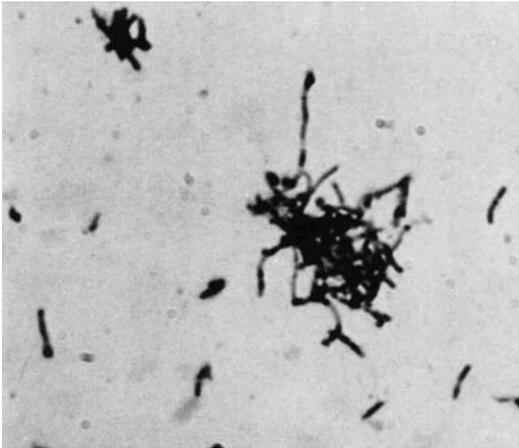


Abbildung 1:

***A. bovis, serovar 2.*** Nach Gram gefärbter Ausstrich einer 24h Kultur aus Tarozzi-Bouillon; Vergrößerung x1200. <sup>1</sup>

Das charakteristische spinnen- oder spinnwebartige Wachstumsverhalten ist bei einigen Spezies, vor allem *A. israelii* und *A. gerencseriae*, besonders stark ausgebildet (Abbildung 2). Sie besitzen die Fähigkeit, fädige Mikrokolonien („spider-like microcolonies“) zu bilden, die aber, meist nach einigen Tagen, selten nach einigen Stunden, ihr myzeliales Wachstum aufgeben, und dann einen unregelmäßigen, scharf begrenzten Rand aufweisen. Andere Arten, wie *A. pyogenes* oder *A. meyeri* wachsen praktisch nie fädig und weisen immer einen glatten Rand auf (Schaal, 1992a).

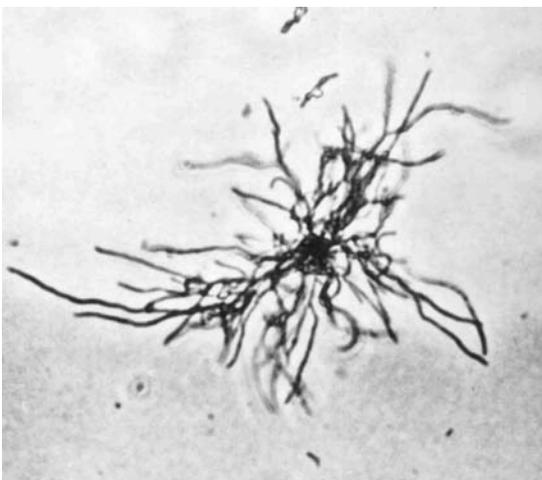


Abbildung 2 :

***A. israelii.*** Mikrokolonie auf BHIA (Objekträgerkultur, 48h bei 36°C); Phasenkontrastmikroskopie des in Lactophenol-Baumwollblau-Lösung eingebetteten Präparates (x 1200). <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abbildungen 1 und 2 aus: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986 (Schaal, 1986a)

Voll ausgebildete Kolonien (nach ca. sieben Tagen Bebrütung auf BHI-Böden) schwanken auch sehr in ihrer Größe und Aussehen. Der Maximaldurchmesser der Kolonien von *A. radidentis* reicht bis 5mm, während die sehr spärlich wachsenden Kolonien von *A. europaeus* nur 0,5mm im Durchmesser erreichen. Die Oberfläche kann weich und glatt wie beispielsweise bei *A. viscosus*, aber auch trocken, bröckelig und unregelmäßig geformt sein wie bei den *A.-israelii*-Kolonien (Abbildung 3). Gleiches gilt für den Rand, der kreisrund glattbegrenzt sein kann wie bei *A. naeslundii* (Abbildung 4), oder unregelmäßig geformt wie bei *A. gerencseriae*.

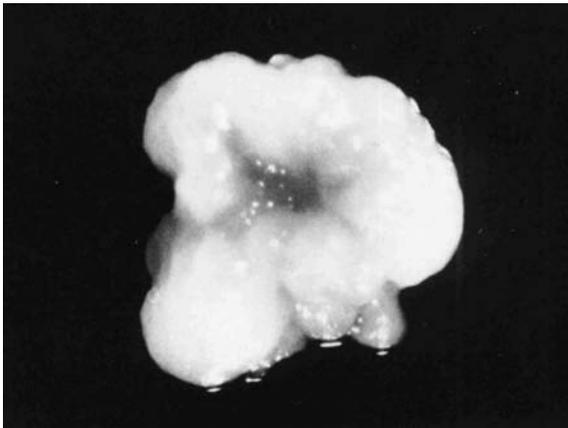


Abbildung 3:

***A. israelii***. Makrokolonie auf CC-Medium (14 Tage bei 36°C); Vergrößerung x30. <sup>1</sup>

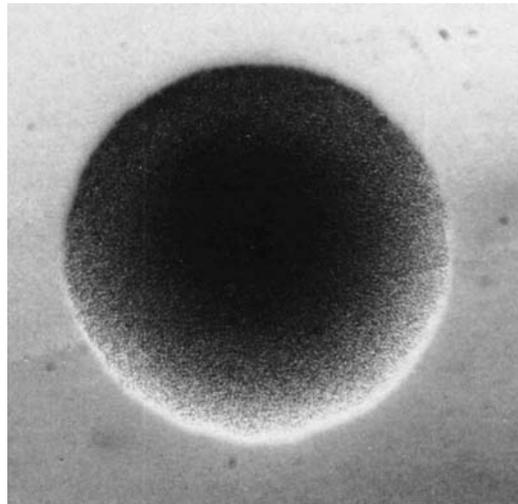


Abbildung 4:

***A. naeslundii***. Kleine Kolonie auf CC-Medium (10 Tage bei 36°C; Vergrößerung x120. <sup>1</sup>

Die Kolonien können strahlend weiß und im Lichtmikroskop undurchsichtig erscheinen wie z.B. *A. howellii*, sie können farblos und im Lichtmikroskop durchsichtig erscheinen, wie z.B. *A. turicensis* oder lichtmikroskopisch zentral granuliert erscheinen, wie es für Vertreter der Spezies *A. odontolyticus* (Abbildung 5) typisch ist (Schaal, 1992a).

<sup>1</sup> Abbildungen 3 und 4 aus: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986 (Schaal, 1986a)

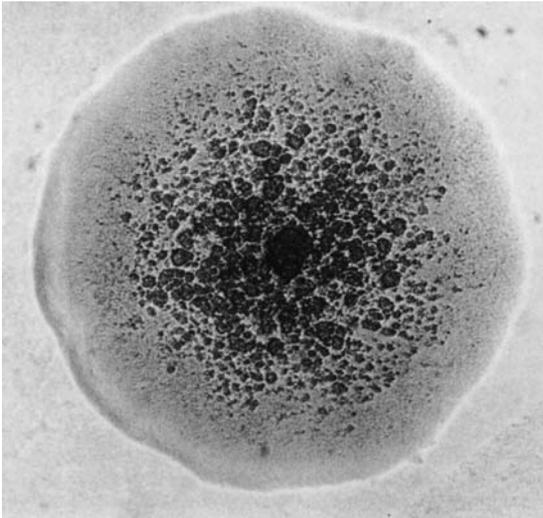


Abbildung 5 :

***A. odontolyticus***. Makrokolonie auf CC-Medium (14 Tage bei 36°C); Vergrößerung x120<sup>1</sup>

In flüssigen Kulturen wachsen *A. israelii*, *A. gerencseriae* und *Propionibacterium propionicum* im Gegensatz zu den meisten anderen Arten kaum submers, sondern bilden flockige, wattebauschartige Kolonien, die an der Gefäßwand oder den Organstücken haften oder einen körnigen Bodensatz bilden (Abbildung 6) (Schaal, 2001).

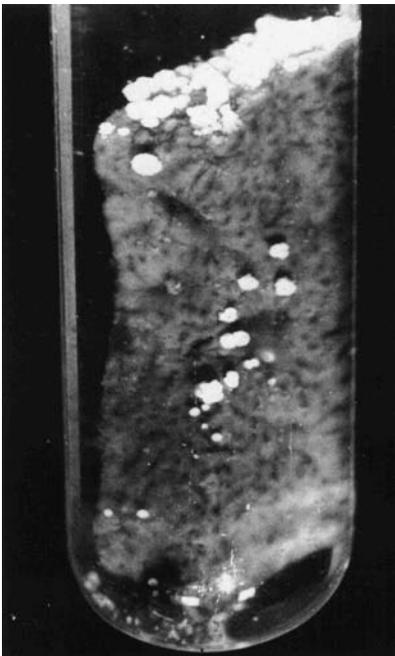


Abbildung 6:

***A. israelii***. Tarozzi-Bouillon; Reife Kolonien an der Leberoberfläche und als Bodensatz; Vergrößerung x2,5.

<sup>1</sup> Abbildungen 5 und 6 aus: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986 (Schaal, 1986a)

Einen Überblick über die verschiedenen Wachstumsformen einiger wichtiger Aktinomyzeten-Spezies gibt Tabelle 3.

Tabelle 3  
**Morphologische Merkmale einzelner *Actinomyces*-Spezies**

(Schaal, 1986a; Schaal, 1992a)

Spezies	Morphologie
<i>A. israelii</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Grampositive, längere, verzweigte, unregelmäßig gefärbte Stäbchen; häufig lange, gewellte und verzweigte Fäden in Gruppen oder Nestern. <u>Kultur:</u> Myzeliale Mikrokolonien, Makrokolonien weißlich, rau, unregelmäßig konturiert, myzelialer Saum, vom Nährboden im Ganzen schlecht abhebbar; Koloniegröße 0,5-2,0mm Ø.
<i>A. gerencseriae</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Grampositive, kürzere und längere, unregelmäßig gefärbte Stäbchen mit terminalen Auftreibungen; gelegentlich Verzweigungen. <u>Kultur:</u> Meist myzeliale Mikrokolonien, Makrokolonien opak und weißlich, leicht unregelmäßiger Randsaum, Koloniegröße 0,5-2,0mm Ø.
<i>A. naeslundii</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Überwiegend grampositive, zum Teil verzweigte, bis 5µm lange Stäbchen; kaum Fadenformen. <u>Kultur:</u> Mikrokolonien mit kurzem Randmyzel, Makrokolonien ohne Randmyzel, rund, weiß, Zentrum homogen granuliert, Oberfläche glatt; Koloniegröße 1,0-5,0mm Ø.
<i>A. odontolyticus</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Grampositive, kurze, diphtheroid gelagerte Stäbchen; gelegentlich kokkoide Formen; kaum Fäden. <u>Kultur:</u> Glattrandige Mikrokolonien, durchscheinend, nie filamentös; Makrokolonien durchscheinend, flach, glatte Oberfläche, unregelmäßig konturierte Innenzeichnung; Koloniegröße 1,0-2,0mm Ø.
<i>A. viscosus</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Ähnlich wie bei <i>A. naeslundii</i> . <u>Kultur:</u> Meist weniger myzelial als <i>A. naeslundii</i> und früher fragmentierend; Koloniegröße 1,0-5,0mm Ø.

Fortsetzung Tabelle 3

Spezies	Morphologie
<i>Arc. pyogenes</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Grampositive, kurze bis kokkoide Stäbchen; keine Fäden oder Verzweigungen. <u>Kultur:</u> Mikrokolonien glattrandig, durchscheinend, ohne Randmyzel; Makrokolonien opak, weiß, glattrandig; $\beta$ -Hämolyse auf Blutagar; Koloniegröße 0,5-3,0mm $\emptyset$ .
<i>A. meyeri</i>	<u>Gram-Präparat:</u> Grampositive, kürzere oder längere, diphtheroid gelagerte Stäbchen; angedeutete Verzweigungen. <u>Kultur:</u> Mikrokolonien glatt und nicht-fädig, Makrokolonien durchscheinend bis weiß, rund, glattrandig, gelegentlich $\alpha$ -Hämolyse; Koloniegröße bis 1,0mm $\emptyset$ .

### 2.2.2. Chemotaxonomische Merkmale und Stoffwechselendprodukte

Eine sehr wertvolle Methode zur Klassifizierung und Identifizierung von Aktinomyzeten stellt die Analyse von Zellwandbestandteilen dar (Cummins und Harris, 1956; Cummins und Harris, 1958). Da die Methode zwar sehr genau, aber auch sehr zeitaufwändig ist, wurden unter dem Aspekt, den Test routinemäßig einzusetzen, vereinfachte Verfahren entwickelt. Zu diesen zählen die von Schaal beschriebenen Methoden zum Nachweis von Zuckern und Aminosäuren in Ganzzellhydrolysaten (Schaal, 1984), die Analyse von Mykolsäuren in Ganzzellhydrolysaten (Minnikin et al., 1975; Schaal, 1985) und der gaschromatographische Nachweis von Stoffwechselendprodukten (Holdeman et al., 1977).

Der Test zum Nachweis der 2,6-Diaminopimelinsäure (2,6-DAP) in Ganzzellhydrolysaten (Schaal, 1985) hilft nicht in der Unterscheidung zwischen verschiedenen *Actinomyces*-Spezies, kann aber hilfreich sein zur Differenzierung zwischen *Actinomyces israelii* und *Propionibacterium propionicum*, zwischen *Corynebacterium matruchotii* und *Rothia dentocariosa* und zwischen *Rothia dentocariosa* und *Nocardia*-Spezies. DAP fehlt bei den Gattungen *Actinomyces*, *Oerskovia*, *Rothia*, *Arcanobacterium*, *Actinobaculum* und *Bifidobacterium*. Das LL-Isomer von DAP ist bei *Streptomyces*-Arten vorhanden und bei den

meisten Vertretern der Gattung *Propionibacterium*. *Nocardia*, *Mycobacterium* und *Corynebacterium* enthalten das *meso*-Isomer der DAP. Die zu untersuchenden Bakterien werden mit Salzsäure hydrolysiert und dann gewaschen. Der Extrakt wird dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Aminosäureflecken werden durch Besprühen mit Ninhydrin in Aceton-Lösung, Lufttrocknung und anschließender Erhitzung auf 100-110°C über zwei Minuten sichtbar gemacht. Die Diaminopimelinsäure ist anhand ihrer oliv-grünen bis gelben Farbe erkennbar. Der  $R_f$ -Wert lässt weiterhin eine Unterscheidung in die beiden Isomere LL-DAP und *meso*-DAP zu (Schaal, 1992b).

Das Zucker-Muster, welches man durch Dünnschichtchromatographie gewinnen kann, ist schwieriger auszuwerten, da einzelne Zucker entweder aus der Zellwand, aus wandassoziierten Strukturen, dem Zytoplasma oder aus dem Kulturmedium stammen können (Schaal, 1992b). Richtig angewandt ist es aber ein nützlicher Test, um zwischen verschiedenen *Actinomyces*-Spezies zu unterscheiden. Typischerweise fehlen bei den fermentativen Aktinomyzeten die Zucker Arabinose, Xylose und Madurose im Ganzzellhydrolysat, während sie bei aeroben Aktinomyzeten in Abhängigkeit von der Gattungszugehörigkeit vorhanden sind. *Actinomyces viscosus* oder *Actinomyces naeslundii* zeichnen sich z.B. durch einen positiven Nachweis von 6-Deoxytalose, Galaktose, Glukose, Mannose und Rhamnose bei Abwesenheit von Fukose aus. Keine anderen Vertreter der Gattungen *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Rothia* oder *Lactobacillus* weisen diese Konstellation auf. Es wird Schwefelsäure zur Hydrolyse verwendet, der Extrakt in Pyridin aufgenommen, konzentriert und zur Dünnschichtchromatographie benutzt. Anilin-Phthalat stellt die Zucker auf der Dünnschichtplatte dar und erlaubt, anhand ihrer Farbe und ihres  $R_f$ -Wertes zu identifizieren. Die  $R_f$ -Werte steigen in der Reihenfolge folgender Zucker: Galaktose, Glukose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fukose, Ribose, Rhamnose und 6-Deoxytalose.

Die Mykolsäureanalyse, welche sehr nützlich ist, um zwischen aeroben Aktinomyzeten und Mykobakterien zu unterscheiden, trägt bei den fermentativen Aktinomyzeten nur zur Abgrenzung von *Corynebacterium matruchotii* bei (Schaal, 1992b). Zum Mykolsäurenachweis wird die Trockenzellmasse in Methanol-Toluol-Schwefelsäure aufgenommen, 16-18 Stunden bei 75°C inkubiert und dann die entstandenen Methylester mit Petroleumbenzin extrahiert. Auf Kieselgel-

Aluminiumfolien in Petroleumbenzin und Aceton werden die Mykolsäuren eindimensional aufsteigend aufgetrennt und durch Molybdatophosphorsäure sichtbar gemacht.

Durch die Analyse der langkettigen Fettsäuren der Bakterien kann ebenfalls auf ihre Herkunft geschlossen werden (Kroppenstedt, 1985). Die Methode kann von der Nährmediumzusammenstellung und den Wachstumsbedingungen beeinflusst werden, so dass die Interpretation nicht einfach ist. Die in der Bakterienwand enthaltenen Fettsäuren besitzen unterschiedliche Längen und Sättigungsgrade und variieren in ihrer Zusammensetzung von Spezies zu Spezies. Wichtige taxonomische Marker sind die C-Kettenlänge, die Lokalisation der Methyl-Gruppe und die Position der Doppelbindung (Hancock, 1994; von Graevenitz et al., 1994).

Einen weiteren nützlichen Hinweis bei der Identifikation von unbekanntem Organismen mit fermentativem Metabolismus erhält man durch den Nachweis von Stoffwechselendprodukten. Dieser kann gaschromatographisch (GLC) wie im VPI Anaerobe Laboratory Manual (Holdeman et al., 1977) oder als High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) erfolgen. Man verwendet für den Test den Kulturüberstand von in Pepton-Hefeextrakt-Glucose-Medium (Schaal, 1985) oder Hackfleisch-Kohlenhydrat (CMC)-Medium (Holdeman et al., 1977) gewachsenen Bakterien. Typischerweise produzieren Vertreter der Spezies *Actinomyces* im Vergleich zu Laktat und Azetat relativ viel Sukzinat. Die morphologisch schwer abzugrenzenden Stämme von *Propionibacterium propionicum* produzieren typischerweise große Mengen Propionsäure, die vom Genus *Actinomyces* nicht gebildet wird. Das hauptsächliche Endprodukt des fermentativen Kohlenhydratabbaus von *Rothia dentocariosa* ist Laktat und nur relativ wenig Sukzinat (Schaal, 1992b).

### **2.2.3. Physiologische Merkmale**

Physiologische Merkmale, wie das Wachstumsverhalten auf verschiedenen Nährböden (Ellen und Onose, 1978; Heinrich und Korth, 1967), Sauerstoff-Toleranz, CO<sub>2</sub>-Bedürfnisse, fermentativer Kohlenstoff-Metabolismus (Schofield und Schaal, 1981), Katalase-Aktivität oder Nitrat- und

Nitritreduktion, werden seit vielen Jahren verwendet, um *Actinomyces*-, *Arcanobacterium*- und *Rothia*-Spezies zu identifizieren (Funke et al., 1997b; Kilian, 1978; Schaal, 1992b).

Es hat sich allerdings in vielen Fällen als sinnvoll erwiesen (Bowden und Hardie, 1973; Schaal, 1986b; Slack und Gerencser, 1975), chemotaxonomische Techniken und Stoffwechsel-Endprodukt-Analyse zusammen mit physiologischen Merkmalen einzusetzen, um zuverlässig bis auf Spezies-Ebene zu identifizieren. Die Aussage physiologischer Tests wird umso genauer, je größer die Anzahl an getesteten Leistungen ist (Schaal, 1986a; Schaal und Schofield, 1984; Schofield und Schaal, 1980; Schofield und Schaal, 1981)

Ein auf Slack und Gerencser (1975) zurückgehender Vorschlag zur Herstellung der Testmedien zum Fermentations-Test zeigte unbefriedigende Ergebnisse, die zurückzuführen waren auf ein ungünstiges Verhältnis von Inoculum-Größe, Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus und Nachweissubstrat (Holmberg und Nord, 1975). Durch eine Modifikation im Sinne eines miniaturisierten Systems (Buchanan et al., 1984; Schofield und Schaal, 1979a; Schofield und Schaal, 1980; Schofield und Schaal, 1981) konnten sehr viel bessere Ergebnisse für die sehr langsam wachsenden Bakterien erzielt werden.

Das kommerziell erwerbliche Minitek®-System (BD) hat sich als sehr einfach in der Handhabung, schnell in der Durchführung und zuverlässig in der Diagnosefindung erwiesen (Schofield und Schaal, 1979b), die Produktion wurde aber eingestellt.

Andere kommerzielle Systeme, wie das API 20 Anaerobier-System oder das API 20 Strep-System wiesen eine sehr stark variierende Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit bei der Identifizierung von fermentativen Aktinomyzeten auf (Schaal, 1992b). Das ebenfalls von Schaal geprüfte BioLog®-System der Fa. Flow erwies sich ebenfalls als nicht zuverlässig. Die von der Fa. Merlin hergestellten Taxa Profile C® und Taxa Profile E® Systeme wurden als nur bedingt einsatzfähig für die klinische Routine eingestuft (Dahlen, 2004).

## 2.2.4. Serologische Techniken

Zu den rasch durchzuführenden und zuverlässigen Methoden, *Actinomyces*-Infektionen nachzuweisen, gehören die Immunfluoreszenz-Verfahren. Diese können direkt auf Bakterienkulturen oder auf klinisches Material wie z.B. Eiter, Zahnplaque oder Sekrete angewandt werden. Sowohl der direkte als auch der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörpertest konnten erfolgreich bei Aktinomyzeten eingesetzt werden (Collins et al., 1973; Schaal und Pulverer, 1973; Slack et al., 1969; Slack und Gerencser, 1975).

Von Schaal und Pulverer (1973) wurde die indirekte Immunfluoreszenzmethode eingeführt, die erstmals verwertbare Differenzierungsergebnisse bis auf Speziesebene ermöglichte, ohne dass eine größere Anzahl markierter Antiseren hergestellt werden musste. Diese Methode wurde auch in den beiden deutschen Referenzlaboren für pathogene Aktinomyzeten in Bonn und Köln in der Zeit von 1973 bis 1979 angewandt (Pulverer et al., 2003).

Am verbreitetsten aber wurde die direkte Immunfluoreszenstechnik von Slack und Gerencser (1975). Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Notwendigkeit der Eigenherstellung der fluoreszenzmarkierten, spezifischen Antiseren, da nur sehr wenige *Actinomyces*-Antiseren bei der Biological Reagent Section, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga., U.S.A., erhältlich sind. Klinisches Material oder Kulturausstriche werden auf einen Objektträger gebracht, luftgetrocknet und hitze- oder methanolfixiert. Nach Aufbringung eines Tropfens Fluoreszenz-Isothiozyanat-konjugiertem, spezifischen Antiserums wird der Objektträger für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Konjugat wird dann abgeschüttet und der Objektträger zweimal für jeweils fünf Minuten mit pH 7,2 Puffer (FTA Haemagglutinationspuffer, BD) gewaschen. Die Gegenfärbung wird mit Evans-Blue durchgeführt; anschließend zweimal mit pH 9,0 Puffer für je eine Minute gewaschen. Nach Lufttrocknung und Überschichtung mit einer gepufferten Glycerol-Lösung können die Ausstriche nun mit einem geeigneten Auflichtmikroskop mit Blauanregung bei 400facher Vergrößerung betrachtet werden (Gerencser, 1979).

Komplementbindungsreaktionen, Zellwandagglutination (Bowden und Fillery, 1978; Cummins, 1970; Fillery et al., 1978), ELISA, Immundiffusionsverfahren (Schaal und Gatzert, 1985),

Immunelektrophorese (Bowden et al., 1976), Immunoblot sowie die Immunelektronenmikroskopie sind weitere Verfahren, die speziellen Fragestellungen vorbehalten sind und sich in der Routinediagnostik nicht durchsetzen konnten.

Der zur Serodiagnostik zählende Antikörpernachweis bei Aktinomykoseverdacht mittels der Immunfluoreszenztechnik erbrachte Ergebnisse, die nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht mehr befriedigend sind. Bei vielen Aktinomykosen sind Antikörper gegen Oberflächenantigene nicht nachweisbar, während andererseits auch bei Gesunden niedrige Titer gefunden werden können (Schaal, 1992a).

## **2.3. Natürliches Vorkommen**

### **2.3.1. Vorkommen beim Menschen**

Der primäre Lebensraum der humanpathogenen, fermentativen Aktinomyzeten befindet sich vor allem in der Mundhöhle des gesunden, erwachsenen Menschen. Auch im Verdauungs-, Atem- und Genitaltrakt lassen sie sich, wenn auch in geringerer Populationsdichte, nachweisen (Schaal, 1992a; Schaal, 2001).

Die Gesamtmenge an fermentativen Aktinomyzeten im menschlichen Zahnbelag wird auf  $1,9 \cdot 10^7$  Zellen/g Feuchtgewicht geschätzt (Collins et al., 1973). Die Spezies *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus* und *A. odontolyticus* gehören zu den am häufigsten nachgewiesenen Vertretern. Vor der Dentition und nach Zahnverlust ist die Anzahl an Anaerobiern und damit auch der Aktinomyzeten niedrig, da vor allem die Zahn-Plaques ihren Hauptaufenthaltort darstellt. Stark beeinflusst wird ihre Anzahl durch Ernährungsgewohnheiten, Mundwässer oder Zahnputzmittel (Colombo et al., 2005). Auch in den Tonsillen-Krypten konnten *A. israelii* und *A. naeslundii* nachgewiesen werden (Garcia Ramos et al., 1984).

Neben der Besiedelung der Mundhöhle kommen Aktinomyzeten auch auf den Schleimhautoberflächen des Darms von Menschen vor. So konnte *A. israelii* im Stuhl isoliert

werden (Sutter und Finegold, 1972) und im Anschluss an chirurgische Darmoperationen oder Appendixperforationen kann es zu abdominellen Aktinomykosen kommen.

Bei gesunden Frauen, die keine vaginalen oder intrauterinen Fremdkörper tragen, ist es sehr schwer, überhaupt Aktinomyzeten im Genitaltrakt nachzuweisen (Johnes et al., 1983). Trägerinnen von Vaginalpessaren oder Spiralen haben dagegen eine sehr viel höhere Anzahl an Aktinomyzeten im Vaginalsekret bzw. Zervikalsekret als Frauen, die keine derartigen Hilfsmittel benutzen (Schaal und Beaman, 1984). Auch von den Oberflächen von Pessaren und Spiralen lassen sich Aktinomyzeten oft in großen Mengen isolieren.

### 2.3.2. Vorkommen bei Tieren

Analog zur Besiedelung des Menschen stellt die tierische Maulhöhle den primären Lebensraum der Aktinomyzeten dar. Die Datenlage und die Fallbeschreibungen sind allerdings geringer als beim Menschen, und die Nachweismöglichkeiten nicht weniger schwierig. Dent und Williams (1984b) gelang es in einer Studie über den Zahnbelag gesunder Rinder nicht, den typischen Erreger der Aktinomykose des Rindes, *Actinomyces bovis*, nachzuweisen. Trotzdem kann man davon ausgehen, dass den Aktinomykosen beim Tier ebenfalls ein endogener Infektionsmodus zu Grunde liegt (Sneath, 1989).

*A. naeslundii* und *A. viscosus* konnten im Mund neugeborenen, säugenden Affennachwuchses nachgewiesen werden (Beighton, 1985). Ebenso konnten im Rinder-Zahnbelag *A. denticolens*, *A. howellii* und *A. slackii* gefunden werden (Dent und Williams, 1984a, 1984b, 1986).

Vertreter der Gattung *Arcanobacterium* führen bevorzugt zu exogenen Infektionen beim Tier und finden teilweise epidemische Verbreitung (Schaal, 2001). Von praktischer Bedeutung in der Tierheilkunde sind außerdem Infektionen mit *Dermatophilus congolensis*, *Nocardia farcinica* und *Mycobacterium farcinogenes*. Hierbei handelt es sich meist um chronische exsudativ-inflammatorische Infektionen, die bis auf *D.-congolensis*-Infektionen tödlich enden können.

### 2.3.3. Vorkommen in der freien Natur

Das einzige Bakterium, das früher der Gattung *Actinomyces* zugeordnet wurde und nicht die Schleimhäute warmblütiger Wirtsorganismen bewohnt, ist *A. humiferus*. Er hält sich bevorzugt in Erdböden auf, welche reich an organischem Material sind und einen pH-Wert zwischen 6,4 und 7,9 aufweisen (Schaal, 1992b). Dies ist einer der Gründe, warum *A. humiferus* inzwischen als *Cellulomonas humilata* reklassifiziert wurde (Collins und Pascual, 2000).

## 2.4. Bedeutung als Krankheitserreger

Typische Erkrankungen, an deren Genese fermentative Aktinomyzeten beteiligt sind oder sein können, sind die Aktinomykosen, Entzündungen der Tränenkanälchen, Parodontitis und Karies.

### 2.4.1. Aktinomykosen

Es handelt sich bei den Aktinomykosen um subakute bis chronische, granulomatös-eitrige, invasive Infektionskrankheiten, die durch verschiedene fermentative Aktinomyzeten und eine variable Bergleitflora hervorgerufen werden und zu multipler Abszedierung und Fistelbildung neigen (Lentze, 1969; Pulverer und Schaal, 1978; Schaal, 1992b; Schaal, 1997; Schaal und Beaman, 1984; Slack und Gerencser, 1975). Da es sich um ein *polyätiologisches Infektionssyndrom* handelt (Schaal, 2001), spricht man auch von den Aktinomykosen im Plural.

#### 2.4.1.1. Ätiologie

Die häufigsten Erreger menschlicher Aktinomykosen sind *A. israelii* (>50% der Fälle) und *A. gerencseriae* (>25% der Fälle). Seltener sind Infektionen mit *Propionibacterium propionicum*, *Bifidobacterium dentium* und in abnehmender Häufigkeit *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A.*

*viscosus* und *A. meyeri*. Die Aktinomykosen stellen fast immer Mischinfektionen dar, bei denen die Aktinomyzeten den Primärerreger oder Leitkeim bilden. In unterschiedlicher Häufigkeit kommen sie mit aeroben oder anaeroben Begleitkeimen vor (Tabelle 4).

Die von Fall zu Fall variierende Begleitflora übernimmt unter anderem die Aufgabe, durch Freisetzung aggressiver Enzyme und Toxine und durch Herabsetzung der Sauerstoffspannung die relativ geringe Invasionskraft der Aktinomyzeten zu stärken (Holdeman et al., 1977; Holm, 1951a; Holm, 1951b; Lentze, 1969; Pulverer und Schaal, 1978; Schaal, 1979; Schaal, 1992b). Zu Beginn können die Begleitkeime das Erscheinungsbild der Erkrankung zu einem nicht geringen Teil mitbestimmen. Oft stellen die Begleitkeime ebenfalls, wie die Aktinomyzeten, normale Bewohner der menschlichen Schleimhäute dar. Bei den zervicofazialen Aktinomykosen lassen sich in mehr als 20% aller Fälle *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, koagulasenegative Staphylokokken, schwarz pigmentierte *Bacteroidaceae*, *Fusobacterium* spp., mikroaerophile Streptokokken oder *Propionibacterium* spp. nachweisen (Schaal, 2001).

Tabelle 4

**Zusammensetzung der aktinomykotischen Erregerflora bei Patienten mit bestätigten zervikofazialen Aktinomykosen (n=1997)**

Fermentative Aktinomyzeten kulturell isoliert	Anzahl (%) an Patienten
Alleine	90 (4,5)
Mit aeroben Begleitkeimen	819 (41,0)
Mit anaeroben Begleitkeimen	138 (6,9)
Mit aeroben und anaeroben Begleitkeimen	950 (47,6)

(Pulverer et al., 2003)

#### 2.4.1.2. Epidemiologie

Da die natürlichen Standorte der Erregerflora die Schleimhautoberflächen von Mundhöhle, Dickdarm und weiblichem Genitaltrakt sind, handelt es sich bei allen Aktinomykosen – mit Ausnahme der durch Faustschlag oder Menschenbiss entstandenen kutanen Form – um endogene Infektionskrankheiten (Russel und Melville, 1978; Schaal, 1986b; Schaal, 1997). Sie sind deshalb

nicht übertragbar und treten sporadisch weltweit auf. Die Morbidität wurde in den alten Bundesländern mit 1:40000/Jahr angegeben (Pulverer und Schaal, 1984; Schaal und Pulverer, 1984), und es besteht eine Geschlechtsdisposition von 2,5:1 (Männern : Frauen). Der Altersgipfel liegt bei Frauen zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahrzehnt, bei Männern zwischen dem dritten und vierten Lebensjahrzehnt.

### 2.4.1.3. Pathogenese und Pathologie

Die alleinige Anwesenheit der meisten Aktinomyzeten reicht, wie oben besprochen, nicht aus, um eine Infektionskrankheit hervorzurufen. Einige Arten fermentativer Aktinomyzeten besitzen zwar Adhäsionsmechanismen, doch reichen ihre Fähigkeiten nicht aus, das Wirtsgewebe aktiv aufzuschließen. Sie sind auf Veränderungen der Abwehrmechanismen an der Eintrittsstelle in Form eines negativen Redoxpotentials angewiesen, um sich im Gewebe etablieren zu können. Diese lokale Herabsetzung der Sauerstoffspannung kann *intra vitam* durch eine mangelhafte Blutversorgung bei Kreislauf- und Gefäßkrankheiten, bei Verletzungen mit Gewebsquetschungen und -zertrümmerungen und an Fremdkörpern oder durch die reduzierende und nekrotisierende Wirkung weiterer Mikroben, der Begleitflora, zustande kommen (Schaal, 2001).

In dem entzündlichen Granulationsgewebe, welches entweder im Sinne einer akuten Abszedierung eitrig einschmilzt, Fisteln bildet oder durch Bindegewebsproliferationen gekennzeichnet ist, bilden sich die pathognomonischen Drusen aus (Abbildung 7). Dabei handelt es sich um stecknadelkopfgroße, derbe, gelblich bis rötlich-bräunlich tingierte Körnchen, die bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop ein unregelmäßig konturiertes, blumenkohlartiges Aussehen zeigen. Sie bestehen aus einem Konglomerat kleiner, *in vivo* gebildeter, myzelialer Aktinomyzetenkolonien, die von einem Leukozytenwall umgeben sind und im Quetschpräparat bei schwacher bis mittlerer Vergrößerung sichtbar werden (Lentze, 1969; Schaal, 1986a; Schaal und Beaman, 1984).

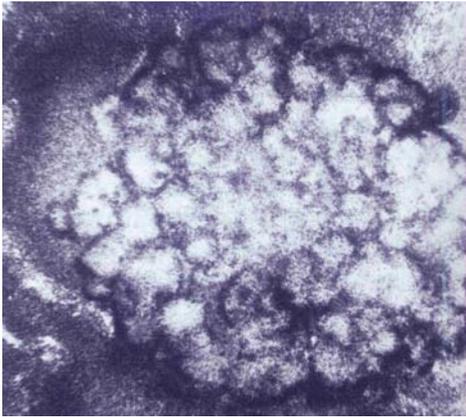


Abbildung 7:

**Actinomyces-Druse:** Nativpräparat in 1%iger Methylenblau-Lösung, Vergrößerung x120.  
 Aus: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.  
 Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, 2001 (Schaal, 2001)

Die stacheligen Myzelfäden, die radiär aus den Kolonien herausragen, sind besonders im Gewebe, weniger im Eiter, an den Enden durch Anlagerung eines hyalinen Materials kolbig verdickt. Das myzeliale Wachstum macht nicht nur die Ausbildung dieser Drusen möglich, sondern behindert auch die körpereigene zelluläre und humorale Abwehr. Darüber hinaus behindert die Drusenbildung die Anflutung der zur Therapie eingesetzten Antibiotika (Schaal, 2001).

#### 2.4.1.4. Klinik, Verlauf und Prognose

Nach ihrem Entstehungsort werden die Aktinomykosen klassischerweise eingeteilt in die am häufigsten anzutreffende *zervikofaziale Aktinomykose*, und die selteneren *thorakalen* und *abdominalen Aktinomykosen*. Des weiteren lassen sie sich noch in die *Aktinomykosen der Haut*, des *weiblichen Genitales* und die *systemischen Aktinomykosen* einteilen (Schaal und Lee, 1992). Die Inkubationszeit schwankt, wie bei anderen endogenen Infektionen auch, und soll im Mittel vier Wochen betragen.

*Zervikofaziale Aktinomykosen* haben ihren Ursprung im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. Als auslösende Ursache gelten Zahnextraktionen, Kieferbrüche, periodontale Abszesse, in die Schleimhaut eingedrungene Fremdkörper (Knochensplinter, Fischgräten, etc.) oder vereiterte Tonsillenkrypten. Die Infektion beginnt entweder akut als Abszess oder Mundbodenphlegmone

oder primär chronisch als derbe, unempfindliche, rötlich-livide verfärbte Schwellung. Die Frühabszesse können, wenn sie chirurgisch ausgeräumt werden, noch abortiv heilen. Diese Chance wird aber meist versäumt, so dass der Verlauf subakut bis chronisch wird und sich immer mehr der primär chronischen Form angleicht. Diese weist klassischerweise Symptome auf wie Rückbildung und Vernarbung zentraler Eiterherde, Fortschreiten peripherer harter Infiltrate mit multiplen Einschmelzungen, Aufbrechen von Fisteln, Bildung eines vielkammerigen Höhlensystems mit schlechter Heilungstendenz und Rezidivneigung nach vorübergehendem Rückgang der Entzündungszeichen (Schaal, 2001). Unbehandelt breiten sich die Aktinomykosen über Organgrenzen hinweg immer weiter aus und werden beim Einbruch ins Schädelinnere oder in die Blutbahn (*systemische* oder *generalisierte Aktinomykose*) lebensbedrohlich (Kuijper et al., 1992).

*Thorakale Aktinomykosen* werden sehr viel seltener angetroffen als die zervikofazialen. Sie entstehen durch Aspiration erregerhaltigen Materials aus der Mundhöhle, durch fortschreitende Senkungsabszesse aus dem Halsbereich oder hämatogen. Der Lungenbefall führt zu bronchopneumonischen Infiltraten, die radiologisch tuberkuloseartig oder als tumorverdächtige Lungenrundherde imponieren können (Kuijper et al., 1992). Unbehandelt schreitet auch hier die Infektion fort und kann zum Pleuraempyem führen, auf Herz oder Brustwand übergreifen oder als paravertebraler Senkungsabszess bis in die Leistenbeuge vordringen (Schaal, 2001).

*Abdominale Aktinomykosen* sind ebenfalls selten und finden sich vor allem nach Verletzungen der Darmwand (z.B. durch Fischgräten oder Knochensplitter) oder perforierende Entzündungen (z.B. Appendizitis) der Darmschleimhaut. Die *Aktinomykose des weiblichen Genitales* ist positiv korreliert mit dem Tragen intrauteriner oder vaginaler Pessare. Diese Frauen haben eine stärkere Aktinomyzetenbesiedelung des Genitaltraktes und ein signifikant erhöhtes Risiko, einen aktinomykotischen Infektionsprozess zu entwickeln (Kayikcioglu et al., 2005; Schaal und Beaman, 1984). Typischerweise bestehen bei diesen Frauen unspezifische Symptome wie vermehrter Fluor oder Menstruationsbeschwerden. Ausgehend von der Kolonisation kann es zur invasiven Infektion des parametranen Bindegewebes, der Uterusmuskulatur, der Adenexe, der Harnblasenwand sowie des Rektums kommen. Diese Erkrankungen imponieren als größer werdende Raumforderungen, die tumorösen Prozessen dieser Region, wie dem Rektum- oder dem Zervixkarzinom sehr ähneln können (Baird, 2005; Guinier et al., 2005). Punktionen und

mikrobiologische Aufarbeitung des Punkttates sowie möglicher entstandener metastatischer Leberabszesse sind Wegweiser zur Diagnosestellung.

Aktinomykosen der Haut sind Raritäten, welche durch Bisswunden (Kontamination mit erregerehaltiger Zahnplaque) oder Faustschlag übertragen werden können. Sie gleichen in ihrem Erscheinungsbild den zervikofazialen Aktinomykosen.

Die Prognose der zervikofazialen und der kutanen Aktinomykose ist, sofern sie denn erkannt wird, als gut anzusehen. Da die thorakalen und abdominellen Formen längere Zeit unerkannt bleiben können und auch nicht so leicht chirurgisch zugänglich sind, ist ihre Prognose schlechter und mit einem höheren Risiko für Gesundheit und Leben des Patienten behaftet. Ebenso schlecht sieht es für unbehandelte Kieferaktinomykosen und die systemischen Aktinomykosen aus.

#### 2.4.1.5. Diagnose

Im Vordergrund der Diagnose steht der Erregernachweis im mikrobiologischen Laboratorium. Dies ist nicht nur auf Grund des vieldeutigen Erscheinungsbildes (unter anderem auch durch das primär vorherrschende Erscheinungsbild der Infektion der Begleitkeime), sondern auch wegen fehlender histologischer Abgrenzbarkeit gegenüber anderen Infektionen zu fordern. Hinweise zur Veranlassung einer gezielten bakteriologischen Untersuchung geben ein auffallend körniger Eiter, chronischer Eiterprozess und Fistelbildung mit Rezidivneigung.

Als Untersuchungsmaterial eignen sich Eiter, Fistelsekret, Bronchialsekret und Granulationsgewebe. Das Untersuchungsmaterial darf nicht mit Schleimhautsekret (Kontamination mit ortsansässigen Aktinomyzeten) in Kontakt kommen und sollte durch gezielte Außenpunktion oder –inzision, transtracheale Sekretaspiration, transthorakale Lungenpunktion oder perkutane Nadelbiopsie gewonnen werden. Die Probe muss schnellstens oder unter Verwendung reduzierender Transportmedien ins mikrobiologische Labor gebracht werden.

Eine erste Verdachtsdiagnose kann bei Vorhandensein von Drusen und Nachweis von grampositiven, verzweigten Stäbchen in den Drusen im Quetschpräparat gestellt werden. Nach 2-14 Tagen kann die diagnostische Kultur mit mikroskopischem Nachweis myzelialen Wachstums erwartet werden. Weitere ein bis zwei Wochen dauert die Identifizierung der Reinkulturen und die Abgrenzung zu kontaminierenden, apathogenen Arten.

Zur Identifizierung mit Artbestimmung sind der direkte oder indirekte Immunfluoreszenztest geeignet, mit dem zumindest die Hauptkrankheitserreger anhand ihrer speziesspezifischen Oberflächenantigene nachgewiesen werden können. Um auch neuere Arten identifizieren zu können, muss man chemotaxonomische Verfahren, wie die Zellwandanalyse, gaschromatographische Bestimmung der Stoffwechselendprodukte und vor allem die Prüfung physiologischer Leistungen durchführen. Molekularbiologische Verfahren wie DNA-Sonden können auch verwendet werden, weisen aber nicht zwangsläufig eine höhere Genauigkeit auf und sind in der Durchführung sehr viel teurer als herkömmliche Verfahren .

#### 2.4.1.6. Therapie

Zur Therapie sollte eine Kombination aus chirurgischer Sanierung und chemotherapeutischen Maßnahmen zur Anwendung kommen. Die Auswahl der Chemotherapeutika hat sich sowohl an den Aktinomyzeten als Leitkeim als auch an der Begleitflora zu orientieren. Mittel der Wahl bei zervikofazialen Aktinomykosen sind Aminopenicilline in Kombination mit Clavulansäure oder Sulbactam in hoher Dosierung für minimal zwei, maximal drei Wochen. Bei Penicillinallergie können alternativ Clindamycin plus Tetracycline, Tetracycline plus Metronidazol oder auch Cefoxitin versucht werden. Bei schweren thorakalen oder abdominellen Infektionen sollte auf Kombinationen von Amoxicillin plus Clavulansäure plus Clindamycin oder Metronidazol, von Acylureidopenicillinen mit Clindamycin oder Metronidazol sowie gegebenenfalls Imipenem zurückgegriffen werden (Schaal, 1997).

### 2.4.2. Entzündungen der Tränenkanälchen – *Canaliculitis lacrimalis*

Als chronische, nicht-invasive und meist mild verlaufende Infektion der Tränenkanälchen gilt die *Canaliculitis lacrimalis*. Sie entsteht nicht selten im Gefolge einer Konjunktivitis und imponiert klinisch durch intermittierende Eiterabsonderungen im Augenwinkel. Es finden sich typischerweise gelbliche bis bräunliche Konkreme innerhalb des Tränenkanals. Meist lässt sich hierbei bei Abstrichen *Propionibacterium propionicum* oder *Actinomyces israelii* anzüchten. Seltener sind *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. gerencseriae* oder *A. odontolyticus* nachweisbar. Ähnlich wie bei den Aktinomykosen ist in vielen Fällen eine Begleitflora vorhanden, welcher häufiger *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae* angehören. Durch Entfernung der Konkreme und lokale antibiotische Behandlung lassen sich diese Infektionen meist gut zur Ausheilung führen (Csukas et al., 1993; Pine und Hardin, 1959; Schaal, 2001; Schaal und Beaman, 1984; Varma et al., 2005).

### 2.4.3. Karies und Parodontitis

Fermentative Aktinomyzeten spielen neben vielen anderen Faktoren auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Karies und Parodontitis. Vor allem *Actinomyces viscosus* und *Actinomyces naeslundii* verfügen über Haftmechanismen, mit denen sie sich an der glatten Zahnschmelzoberfläche festsetzen und zur Bildung von Plaque beitragen. *A. viscosus* senkt den pH-Wert im Plaque-Bereich und trägt damit zur Demineralisation des Zahnschmelzes bei. Die anschließende Zerstörung des Dentins wird durch *A. odontolyticus* gefördert. Über die Bildung von Stoffwechselprodukten, welche das Schleimhautepithel irritieren und so eine Entzündungsreaktion hervorrufen können, wird auch die Entstehung einer Gingivitis oder Parodontitis gefördert.

Als Prophylaxe kann die allgemeine Zahnhygiene gelten, zu der die Zahnreinigung, aber auch der lokale Gebrauch fluoridhaltiger Präparate und desinfizierender Mundwässer zählen (Brandt et al., 2004; Sreenivasan et al., 2005). Therapeutisch steht die Plaque- bzw. Kariesentfernung im Vordergrund. Bei der schwerwiegenderen Parodontitis wird durch Scalen (ein Abschaben des

Zahnsteines mit einem gebogenen, scharfen Messer) und Wurzelglättung der Nährboden für die Mikroorganismen entfernt (scaling and root planing). Gegebenenfalls kann die Therapie durch orale Metronidazolgabe ergänzt werden kann (Carvalho et al., 2005).

#### **2.4.4. Weitere Erkrankungen durch fermentative Aktinomyzeten**

Als Erreger eitriger Infektionsprozesse bei Kühen und Schweinen ist *Arcanobacterium pyogenes* bekannt. Typisch hierbei ist die Mastitis, Peritonitis und Pleuritis. Beim Menschen kann es zu einer Pharyngitis, Urethritis oder kutanen und subkutanen Eiterungsprozessen durch diesen Erreger kommen. Ebenfalls kann *Arcanobacterium haemolyticum* beim Menschen eine Pharyngitis und kutane Eiterungsprozesse hervorrufen.

Infektionen mit *Rothia dentocariosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Actinomyces europaeus*, *A. graevenitzii*, *A. neuii*, *A. radingae*, *A. turicensis*, *Arcanobacterium bernardiae* und *Actinobaculum schaalii* können vereinzelt opportunistischen Infektionen hervorrufen, zu ausgedehnten Abszessen und akuten bis subakuten Endokarditiden oder Septikämien führen .

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. *Stammauswahl*

Die Teststämme und klinischen Isolate (siehe Tabelle 5) stammen aus der Stammsammlung des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn und lagen zumeist in lyophilisierter Form vor. Einige neuere Stämme wurden aus BHI-Agar-Kulturen akquiriert. Die Auswahl wurde getroffen, um zum einen eine möglichst breitgefächerte und repräsentative Zusammenstellung der am häufigsten nachgewiesenen klinischen Isolate zu haben. Zum anderen wurden viele Stämme ausgewählt, die auch schon in einer vorangehenden Arbeit über das Taxa Profile C® und Taxa Profile E® System zum Einsatz kamen (Dahlen, 2004), um einen direkten Vergleich zu diesem Testsystem liefern zu können.

#### 3.2. *Kulturelle Technik*

Die lyophilisierten Bakterien wurden jeweils mit ca. 0,5ml steriler NaCl-Lösung vermischt und dann fraktioniert auf sechs BHI-, CC- und Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen. Der Rest wurde zur Beimpfung einer Tarozzi-Leber-Bouillon verwendet, welche mit Paraffin luftdicht verschlossen wurde. Eine BHI- und eine CC-Platte wurden jeweils im Fortner-Verfahren angelegt, bei dem auf der einen Hälfte des Nährbodens *Serratia marcescens* als Sauerstoffzehrler wächst und auf der anderen Hälfte der Teststamm. Die Platten wurden auf eine Glasscheibe gestellt, luftdicht mit Plastilin verschlossen und fünf Tage bei 36° +/- 1°C bebrütet. Zwei weitere BHI-Platten und zwei Blutagar-Platten wurden beimpft und in GasPak Töpfen mit dem GasPak-Anaerobier-System der Fa. Becton Dickinson für fünf Tage bei 36° +/- 1°C bebrütet. Durch mikroskopische Kontrolle und der Anfertigung eines nach Gram gefärbten Präparates wurde die Möglichkeit einer Verunreinigung überprüft und ausgeschlossen. Um mögliche Nachtestungen durchführen zu können, wurden von jedem Stamm BHI-Fortner-Platten während der gesamten Testzeit bereitgehalten.

Tabelle 5  
**Versuchsstämme**

Stamm-Nr.	Stamm	Herkunft
IMMIB AL-234 (I/97)	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-336 (kl./97)	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-304 (97)	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Abstrich Enzenauer (ZS)
ATCC-23860	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Parotisabszess
IMMIB AL-749 II'6(97)	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Abstrich Enzenauer (ZS)
IMMIB AL-837 (97)	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Zahnfleischtaschenabstrich
IMMIB D-1470	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Befund nicht auffindbar
IMMIB AL-507 v. CX/97	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Abstrich Enzenauer (ZS)
IMMIB AL-174 '3 (3/94)	<i>Actinomyces israelii</i>	Eiter / MKG
IMMIB D-1564	<i>Actinomyces israelii</i>	Submandibulärer Abszess
IMMIB D-1231	<i>Actinomyces israelii</i>	Submandibulärer Abstrich
IMMIB AL-315 II/97	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB D-1501	<i>Actinomyces israelii</i>	Hirnabszess
IMMIB D-909	<i>Actinomyces israelii</i>	Wundsekret
IMMIB AL-460 v. DST/97	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-357/00	<i>Actinomyces israelii</i>	Zahnfleischtaschenabstrich
IMMIB AL-105 /99	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-181'1 /97	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-464 (5/97)	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-640 (97)	<i>Actinomyces israelii</i>	Papierspitzen (ZS)
IMMIB AL-824 I (1/97)	<i>Actinomyces israelii</i>	Eiter / Zahnfleisch
IMMIB AL-157 /93	atypischer <i>Actinomyces naeslundii</i>	IUD
IMMIB AL-131 (97)	atypischer <i>A. naeslundii</i> / <i>viscosus</i>	Zahnfleischtaschenabszess
IMMIB AL-1324 '4 (92)	atypischer <i>A. naeslundii</i> / <i>viscosus</i>	IME
IMMIB AL-535 v. CC/96	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Abstrich
IMMIB AL-679 (96)	<i>Actinomyces naeslundii</i>	MKG-Abstrich
IMMIB D-1531	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Hirnabszess (Isolat)
IMMIB D-1197	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Blutkultur
ATCC-12104	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Fistelgang
IMMIB D-1320	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Abstrich /bullöse Paronychie
WVU 398 (A-62)	<i>Actinomyces naeslundii</i>	menschl. Zahnabstrich
IMMIB D-1980	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Isolat aus Leberabszess
ATCC-15987	<i>Actinomyces viscosus</i>	Parodontitis beim Hamster
IMMIB AL-1267 (99)	<i>Actinomyces viscosus</i>	TW-Stenose
LHMC Be 32 (A-82)	<i>Actinomyces viscosus</i>	menschl. Kariesabstrich
IMMIB AL-485'3 (3/95)	<i>Actinomyces viscosus</i>	Eiter
IMMIB AL-804'1 (1/97)	<i>Actinomyces viscosus</i>	Papierspitzen
DSMZ-10695	<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	Vaginalabstrich (Schwein)
ATCC-51367	<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	Vaginalabstrich (Schwein)
IMMIB D-1263	<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	Uterus und Harnblase (Schwein)
ATCC-19411	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Schwein
DSMZ-8576	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>neuii</i>	Infiziertes Mammahämatom
IMMIB D-1572	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>neuii</i>	Wundabstrich /Mamma
IMMIB D-1311	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>neuii</i>	Blutkultur /Isolat
IMMIB AL-1132 II/94	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>neuii</i>	Abstrich Enzenauer (ZS)
IMMIB D-1616	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>neuii</i>	Tränengangskonglomerat

<b>Versuchsstämme</b>		
<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Stamm-Nr.</b>
IMMIB AL-1119 (98)	<i>Actinomyces neuui</i> ssp. <i>anitratus</i>	Papierspitze (ZS)
NCTC-11923	<i>Actinomyces slackii</i>	Plaque (Rind)
IMMIB D-1385	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Lymphknoten /Ohr
IMMIB AL-673(96)	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Rachenabstrich
IMMIB D-1735	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Tränenwegskanal Abstrich
IMMIB AL-117 (00)	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Bindehautabstrich
IMMIB D-1976	<i>Propionibacterium propionicum</i>	Abstrich
IMMIB D-1251	<i>Actinomyces meyeri</i>	Befund nicht auffindbar
IMMIB D-1035	<i>Actinomyces meyeri</i>	Befund nicht auffindbar
IMMIB D-1568	<i>Actinomyces meyeri</i>	Leberpunktat
IMMIB D-1547	<i>Actinomyces meyeri</i>	Einsendeschein ohne Angabe
IMMIB D-1436	<i>Actinomyces meyeri</i>	Herkunft unbekannt
IMMIB D-1886	<i>Actinomyces europaeus</i>	Infiziertes Atherom
ATCC-17929	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Karies
IMMIB AL-305 /04	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Herkunft unbekannt
IMMIB D-1244	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Femur-Lager (Gewebe)
IMMIB AL-557(00)	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Augenabstrich
IMMIB AL-355'1 (96)	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	IME
IMMIB D-1678	<i>Actinomyces turicensis</i>	Isolat aus Pleuraabstrich
DSMZ 9168	<i>Actinomyces turicensis</i>	Herkunft nicht bekannt
ATCC-13683	<i>Actinomyces bovis</i>	Kieferaktinomykose (Rind)
ATCC-35275	<i>Actinomyces hordeovulneris</i>	Aszites eines Hundes
CCUG-27294	<i>Actinomyces graevenitzii</i>	Bronchiallavage (Mensch)
NCTC-11636	<i>Actinomyces howellii</i>	Plaque (Rind)
DSMZ-9152	<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	Blutkultur
DSMZ-15433	<i>Actinomyces radidentis</i>	Herkunft nicht bekannt
CCUG-38276T	<i>Actinomyces suimastitidis</i>	Herkunft nicht bekannt
IMMIB AL-1394 I/95	<i>Actinomyces georgiae</i>	Abstrich Enzenauer
DSMZ-15434	<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Herkunft nicht bekannt
CCUG-42773	<i>Actinomyces funkei</i>	Herkunft nicht bekannt
DSMZ-15383	<i>Actinomyces marimammalium</i>	Herkunft nicht bekannt
CCUG-27420	<i>Actinobaculum schaalii</i>	Herkunft nicht bekannt
CCUG-46093	<i>Actinobaculum urinale</i>	Herkunft nicht bekannt
ATCC-33144	<i>Actinobaculum suis</i>	Cystitis /Schwein

<b>Versuchsstämme</b>		
<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Stamm-Nr.</b>	<b>Stamm-Nr.</b>
DSMZ-20639	Actinobaculum suis	Cystitis /Schwein
CIP - 107404	Actinobaculum massiliae	Herkunft nicht bekannt
CCUG-42575	Arcanobacterium pluranimalium	Herkunft nicht bekannt
DSMZ-10004	Arcanobacterium phocae	Herkunft nicht bekannt
DSMZ-20595	Arcanobacterium haemolyticum	Herkunft nicht bekannt

Legende zu Tabelle 5:

IME: Implantatelement, IUD: Intra-uterine-device=Spirale, MKG: Klinik für Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie, TW-Stenose: Tränenwegsstenose, ZS: Zahnsulcus

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.; CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Schweden.; DSMZ: Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland.; IMMIB: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Universität Bonn, Deutschland.; LHMC: MRC Dental Epidemiologie Unit, London Hospital Medical College, England.; NCTC: National Collection of Type Cultures, Colindale Ave., London.; WVU: West Virginia University, Morgantown, West Virginia USA.; CIP: Collection of the Institut Pasteur, Paris 15, Frankreich;

Es zeigte sich, dass alle ausgewählten Teststämme gut auf BHI-Platten wuchsen. Aus diesem Grund wurden, um Testgleichheit zu gewährleisten und Testfehlern durch unterschiedliche Nährmedien vorzubeugen, zur Gewinnung von Zellmasse für den Test nur BHI-Platten verwendet. Die Platten wurden vor der Benutzung einen Tag bei 36° +/- 1°C bebrütet und eine Woche gelagert, da man so a priori verunreinigte Platten identifizieren und vom Testgeschehen ausschließen konnte.

### 3.3. Das Testsystem – Bestimmung physiologischer Merkmale

#### 3.3.1. Herstellung der Medien für die physiologischen Tests

Es wurden 45 Testsubstanzen, hauptsächlich basierend auf der Arbeit „A Numerical Taxonomic Study of Members of the *Actinomycetaceae* and Related Taxa“ (Schofield und Schaal, 1981), ausgewählt (siehe Tabelle 6). Dazu zählten 40 Kohlenhydrate, Na-Nitrat, Na-Nitrit, Harnstoff, Arginin und Äskulin. Alle Testsubstanzen wurden in der doppelten der gewünschten Endkonzentration angemischt, da sich die Konzentration nach der späteren Zugabe der Bakteriensuspension wieder halbierte.

*Basalmedium 1* zur Herstellung der Kohlenhydratlösungen (nach Schaal, 1992b):

Als Basalmedium diente eine flüssige Thioglycolat-Lösung (BD) ohne Glucose- oder Indikatorzusatz. Angereichert wurde diese mit 0,2% Hefeextrakt, 0,02% Tween 80 und 0,04% Vit.K<sub>1</sub>. Die Kohlenhydrate wurden jeweils 2%ig zum Basalmedium dazugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

*Basalmedium 2* zum Nachweis von Nitrat- und Nitritreduktion, Harnstoff und Arginin-Dihydrolase-Aktivität – (nach Schaal, 1992b)

Basalmedium:

Bacto peptone (Difco)	5,0g
Hefeextrakt	3,0g
Glukose	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0g
Agar	0,5g

Destilliertes Wasser 1L

Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt und die Flüssigkeit durch Autoklavieren sterilisiert. Die Testsubstanzen wurden dem Basalmedium in folgenden Konzentrationen zugefügt:

Na-Nitrat	0,2%
Na-Nitrit	0,01%
Harnstoff	1,0%
Arginin	1,0%

Zum Nachweis von Äskulinspaltung wurde eine 0,2%ige Äskulin-Bouillon verwendet:

Pepton-Bouillon	200ml
Äskulin	0,4g

Alle Testsubstanzen wurden in der Sicherheitswerkbank durch bakteriendichte Filter (0,45 µm, Celluloseacetat) in 50ml große Glasflaschen gefüllt und mit einem Deckel mit Gummimembran verschlossen. Die Flaschen wurden bei +8°C gelagert.

Tabelle 6

**Verwendete Testsubstanzen und Bestandteile des Basalmediums**

Substanz	Firma /Bestellnummer	Substanz	Firma /Bestellnummer
L-Arabinose	Merck –K21353388	Rhamnose	Merck- V821661 648
Adonitol	Calbiochem – Lot B45731	Ribose	Merck- K30937205
Amygdalin	Merck- A08036028	Sorbitol	Merck- L971059
Cellobiose	Merck- 0041396	Saccharose	Merck- K19765287
Dulcitol	Merck- 4071321	Trehalose	Merck- K23143316
Dextrin	Merck- 9658797	Xylose	Merck- L328889 723
<i>iso</i> -Erythritol	Sigma- E7500	α-methyl-D-Glukosid	Sigma- G8519
<i>meso</i> -Erythritol	Merck- L310160 644	α-methyl-D-Mannosid	Sigma- M8897
Fruktose	Merck- K4998923	Laktat	Merck- K18706866
Galaktose	Merck- K19001858	Arginin	Sigma- A4881
Glukose	Merck- K19714474	Harnstoff	Merck- 3036906
Glycerol	Merck- K22898107	Äskulin	Merck- 3141451
<i>meso</i> -Inositol	Merck-9632885	Na-Nitrat	Merck- 70202985
Laktose	Merck- K18444160	Na-Nitrit	Sigma- S2252
Mannitol	Merck- M497987	BD-Thioglycolat	BectonD.- 1000C2DKFN
Mannose	Merck- K13267284	Bacto Peptone	Difco- 143017XA
Maltose	Merck- K22403812	Hefe Extrakt	Oxoid- 813136
Melibiose	Merck- 1194970	Tween 80	Merck- 8.22187.1000
Melezitose	Fluka- 281161 190	Vit. K <sub>1</sub>	Merck- EF403990 231
Raffinose	Merck- K17877619	Agar Agar	Merck-K18819615
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma- P5504

### 3.3.2. Fertigstellung der Testplatten

Bei den Testplatten handelte es sich um sterile Mikrotiterplatten der Firma GreinerBio-one (Cellstar®, No. 655180, LOT 02410135) mit Deckel. Die Platte verfügte über 12X8 (=96) Kavitäten, von denen jede ein maximales Fassungsvermögen von 400µl aufwies.

Da jedes Öffnen des Deckels zum Bestücken der Platte mit den Testsubstanzen mit einer potentiellen bakteriellen Verunreinigung einherging, sollte Zahl und Dauer der Öffnungen so gering wie möglich gehalten werden. Es wurden deshalb mehrere Aluminiumständer entwickelt, die Bohrlöcher für 8 Lyophilisatglasröhrchen enthielten, im Abstand passend zu einer 8-Fach-Multipipette. Die mit Glasröhrchen bestückten Ständer wurden, in Aluminiumfolie verpackt, vor Gebrauch sterilisiert. In keimarmen Luftatmosphäre wurden die Glasröhrchen dann mit Hilfe steriler Kanülen aus den 50ml Vorratsflaschen mit jeweils ca. 0,8ml Testsubstanz gefüllt. Durch kurzes Deckelöffnen konnten nun hintereinander mit der 8-Fach-Multipipette fünf Mikrotiterplatten in einer kompletten Spalte mit jeweils 125µl Testsubstanz bestückt werden.

Da es insgesamt 45 Testsubstanzen waren, wurden die Platten zweigeteilt, und in der unteren Hälfte der gleiche Testsubstanzenatz eingebracht wie in der oberen, so dass die Platten für jeweils zwei Testungen zur Verfügung standen. Drei Vertiefungen auf der Platte blieben für jeden Teststamm frei; eine davon wurde für den Indolnachweis benutzt.

Nachdem eine Platte fertig mit Testsubstanzen bestückt war, wurde sie sofort tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Um Gefrierbrand zu vermeiden, wurden die tiefgefrorenen Platten spätestens nach vier Wochen benutzt.

### 3.3.3. Herstellung des Basalmediums für die Bakteriensuspension

Für jeden zu testenden Bakterienstamm wurden zwei verschiedene Suspensionslösungen hergestellt. Eine für die Bakteriensuspension zum Nachweis der Kohlenhydratverstoffwechslung (Zusammensetzung entsprach dem *Basalmedium 1*, wie unter 3.3.1. beschrieben), die andere für den Test zum Nachweis von Nitrat- und Nitritreduktion, Harnstoff und Arginin-Dihydrolase-Aktivität und Äskulinspaltung (Zusammensetzung entsprach dem *Basalmedium 2*, wie unter 3.3.1. beschrieben).

Zwei Milliliter dieser Lösungen wurden jeweils in 5ml fassende Glasfläschchen gefüllt, mit einem Aluminiumdeckel versehen und durch Autoklavieren sterilisiert.

### 3.3.4. Testablauf

Die zu testenden Bakterienstämme wurden auf BHI-Nährböden im GasPak-Topf bei  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  für sieben Tage inkubiert. Je nach Wachstumsverhalten des einzelnen Stammes war es nötig, zwischen zwei und sechs BHI-Platten im GasPak-Topf für den Test anzulegen. Die Kolonien von *A. naeslundii* z.B. wuchsen so gut, dass ca. acht Einzelkolonien ausreichten, um zwei Impfösen zu füllen; bei *A. turicensis* wurden, durch sein dünnes Wachstum bedingt, die Kolonien von sechs BHI-Platten benötigt, um die gleiche Menge an Bakterien zu erhalten.

Die benötigte Anzahl an Testplatten wurde kurze Zeit vor dem Gebrauch aufgetaut. Gearbeitet wurde in einer Sicherheitswerkbank. Von jedem Teststamm wurde mit einer sterilen Impföse (Kunststoff, 10  $\mu\text{l}$ ) die gleiche Bakterienmenge (etwa eine Impföse voll) jeweils in eins der beiden 5ml fassenden Suspensionsgläschen (siehe 3.3.3.) überführt. Mit der Öse wurde so lange gerührt, bis sich eine homogene Trübung einstellte und keine makroskopisch sichtbaren Bakterienkonglomerate mehr vorhanden waren. Mit einer sterilen Pipette wurden jeweils zwei Tropfen der Bakteriensuspension in die entsprechenden Vertiefungen der Testplatte (siehe 3.3.2.) getropft. In eine freie Vertiefung der Testplatte, die keine Testsubstanz enthielt, wurde ebenfalls Bakteriensuspension getropft, um später die Indolreaktion durchzuführen. Als

Verunreinigungskontrolle wurde ein weiterer Tropfen Bakteriensuspension auf eine BHI-Platte gebracht und ausgestrichen. Um materialsparend zu arbeiten, wurden auf jeder Testplatte zwei Bakterienstämme aufgetragen und getestet.

Die Testplatten und die BHI-Kontrollplatten wurden im GasPak-Topf bei  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  für 48h bebrütet. Danach wurde die Kontrollplatte makroskopisch und mikroskopisch auf Verunreinigungen überprüft, und falls diese vorlagen, das Ergebnis nicht gewertet.

Auswertung der Testplatten (Verwendete Nachweisreagenzien siehe Tabelle 7):

Um die sauren Endprodukte des fermentativen Metabolismus der Aktinomyzeten nachzuweisen, wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, in denen sich die Kohlenhydrate mit der Bakteriensuspension befanden, jeweils ein Tropfen einer 0,2%igen Bromthymolblau-Indikatorlösung gegeben. Der pH-Farbumschlagsbereich dieses Indikators liegt bei 6,0-7,6 und zeigt im sauren Milieu eine gelbe Farbe, im alkalischen eine grüne. Eindeutig positive Ergebnisse wurden mit „+“ notiert, grenzwertig positive mit „(+““. Eindeutig negative Ergebnisse wurden mit „-“ notiert, grenzwertig negative mit „(-““.

Nitrat- und Nitritreduktion wurde durch Zugabe von Griss' Reagenz nachgewiesen, und das Ergebnis mit „+“ oder „-“ notiert.

Ureaseaktivität und Argininspaltung wurden durch Zugabe von je einem Tropfen Nessler's Reagenz nachgewiesen. Als positives Ergebnis wurde ein sofortiger, starker, dunkel-gelb bis ockerfarbener Niederschlag gewertet.

Äskulinspaltung wurde durch Zugabe eines Tropfens Ferrizitrat (Merck 106404) nachgewiesen. Ein positives Ergebnis war an einem dunkelbraun-schwarzen Farbumschlag erkennbar.

Der Indolnachweis wurde in der Kavität der Mikrotiterplatte durchgeführt, in der Bakteriensuspension und Basalmedium, aber keine Testsubstanz war. Nach Zugabe von Indol-Nachweisreagenz zeigte ein rötlicher Oberflächenfilm eine mögliche Verunreinigung, etwa durch kutane Propionibakterien, an, da Aktinomyzeten kein Indol produzieren. Der Test wurde in einem solchen Fall wiederholt.

Von der Kontrollplatte wurde eine Kolonie zum Katalasenachweis abgeimpft und auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach Auftropfen einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde die An- oder Abwesenheit des Enzyms Katalase an der Bildung oder dem Fehlen von Gasbläschen (O<sub>2</sub>) erkennbar.

Tabelle 7  
**Verwendete Nachweisreagenzien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bromthymolblau	0,2%ige Bromthymolblau-Lösung
Indol-Reagenz	Handelsübliche Kovács-Reagenz
Nessler's Reagenz	Merck-OC332265
Ferrizitrat	Merck 106404
Katalase-Nachweisreagenz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Nitrit-Nachweisreagenz	Griess' Reagenz (A: Sulfanilsäure in Essigsäure; B: α-Naphthylamin in Essigsäure)

### **3.4. Bestimmung morphologischer Merkmale**

Zeitgleich zum Testdurchlauf wurde von jedem Stamm eine BHI-Nährbodenplatte im Fortner-Verfahren angelegt. Diese wurde sowohl nach 48 Stunden als auch nach fünf Tagen makroskopisch und mikroskopisch auf folgende morphologische Merkmale untersucht:

Mikroskopisch nach 48 Stunden: Kolonie -fädig/myzelial  
 -granuliert  
 -durchsichtig  
 -undurchsichtig

Makroskopisch nach fünf Tagen: Kolonie -Größe:  $\geq 2\text{mm}$  oder  $< 2\text{mm}$   
 -Farbe: weiß, beige, gelb-orange oder ungefärbt  
 -Oberfläche: rau oder glatt

Nach fünf Tagen wurde des weiteren ein Objektträgerpräparat angefertigt, nach Gram gefärbt und mikroskopiert. Geachtet wurde auf Zellform (koccoid oder nichtverzweigte Stäbchen) und verzweigte Stäbchen oder Fäden.

### **3.5. Statistische Auswertung**

Grundlage für die statistische Auswertung bildeten die 85 verschiedenen getesteten Stämme mit Einzelwiederholungen und die Testwiederholungen von zehn zufällig ausgewählten Stämmen zur Bestimmung des Testfehlers.

Von den insgesamt 47 Nachweisreaktionen sollten diejenigen aus der statistischen Wertung ausgeschlossen werden, die bei den insgesamt 150 gültigen Testdurchläufen speziesübergreifend (fast) durchweg negative oder positive Ergebnisse lieferten. Dazu gehörten Dulcitol (2 positiv/150), D-Fukose (0 positiv/150),  $\alpha$ -methyl-D-Mannosid (1 positiv/150), Sorbose (1 positiv/150), D-Tagatose (1 positiv/150) und Na-Nitrit (3 positiv/150).

Des weiteren flossen 14 morphologische Merkmale (siehe 3.3.4.) eines jeden Teststammes mit in die Wertung ein. Von den Eigenschaften „Koloniegröße  $< 2\text{mm}$  /  $\geq 2\text{mm}$ “ und „Kolonieoberfläche rau / glatt“ bedingte jeweils der eine Wert den anderen und somit floss immer nur je ein Wert in die Wertung ein. Insgesamt wurden somit 56 biochemische und morphologische Merkmale von 85 Teststämmen in 150 Testdurchläufen mit 8700 Einzelreaktionen getestet.

Die gewonnenen Daten wurden ins binäre System umgewandelt, wobei den biochemischen positiven Ergebnissen [+ oder (+)] die „1“ zugeordnet wurde, den negativen Ergebnissen [- oder (-)] die „0“. Bei den morphologischen Merkmalen wurde dem Merkmal „Vorhanden“ die „1“ zugeordnet, „Nicht vorhanden“ die „0“.

Analysiert wurden die Ergebnisse mit dem Computerprogramm SPSS 11.5.. Verwendet wurden numerisch-taxonomische Techniken (Felsenstein, 1982; Fitch und Margoliash, 1967; Rogers et al., 1978) unter Zuhilfenahme des Average Linkage Clustering Verfahrens. In allen Analysen wurde die ‚pair group average linkage method‘ (Sokal und Michener, 1958) angewandt. Als Koeffizienten kamen der Single-Matching-Koeffizient ( $S_{SM}$ )/Einfache Übereinstimmung (Sokal und Michener, 1958), der positive und negative Ergebnisse berücksichtigt, und der Jaccard-Koeffizient (Sneath, 1957), der nur positive Ergebnisse beachtet, zum Einsatz.

Um die Wichtigkeit der morphologischen Merkmale zu demonstrieren, wurde zu jeder Analyse eines bestimmten Koeffizienten eine Auswertung mit und eine ohne morphologische Merkmale angefertigt.

Der Testfehler  $p$  als Ausdruck für die Reliabilität wurde anhand von zehn zufällig ausgewählten Stämmen bestimmt, welche mehrmals hintereinander getestet wurden.  $P$  wurde aus der Varianz  $s^2$  nach Sneath und Johnson (1972) errechnet.

Die Validität wurde durch Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit bereits bestehenden, gültigen Referenztabellen exemplarisch errechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorversuche

Da das Testsystem in der hier vorliegenden Form zum ersten Mal zum Einsatz kam, war es notwendig, in mehreren Vorversuchen die bestmöglichen Testbedingungen herauszufinden. Dazu wurden Vertreter der Spezies *A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. viscosus* und *A. naeslundii* benutzt, da von ihnen auch umfangreiche Referenzwerttabellen vorlagen, mit denen die gewonnenen Ergebnisse auf Plausibilität überprüft werden konnten.

Als erste Schwierigkeit erwies sich die unterschiedliche Kolonietextur der einzelnen Spezies. Während sich Kolonien von *A. viscosus* oder *A. naeslundii* ohne Probleme mit einer Impföse von dem Nährboden lösen ließen, musste bei den Kolonien von *A. israelii*, die oft fest auf dem Nährboden aufsaßen, genauestens darauf geachtet werden, auch nur die entsprechende Kolonie abzuernten ohne Nährboden mitzunehmen.

Als Voraussetzung dafür, eine annähernd identische Bakterienmenge in jede der Testkavitäten zu füllen, musste eine gleichmäßige Verteilung der Bakterienmasse im Suspensionsmedium erreicht werden. Bei den „weich“ wachsenden Spezies wie *A. viscosus* oder *A. naeslundii* war dies kein Problem. Durch vorsichtiges Umrühren mit einer sterilen Impföse ließ sich schnell eine gleichmäßige Trübung herstellen. Die harten Kolonien von *A. israelii* und *A. gerencseriae* benötigten etwas mehr Zeit und Übung. Doch durch geschicktes Zerkleinern und Verquirlen mit einer sterilen Impföse ließ sich auch hier eine gleichmäßige Trübung erzielen.

Es zeigte sich, dass zu dünn beimpfte Suspensionsmedien mit einer zu schwachen Trübung auch zu schwächer ausgeprägten Indikatorfarbumschlägen führten, was die Ablesung erschwerte. Die Kohlenhydrate sollten in 1%iger Endkonzentration vorliegen. Die Testsubstanzen, die 2%ig in den Kavitäten vorlagen, mussten deshalb noch einmal durch die gleiche Menge an Bakteriensuspension, nämlich ca. 125µl, ergänzt werden. Die richtige Masse an Bakterien, die von Nöten war, um nachweislich fermentativ tätig zu werden, musste also über eine ausreichende

Trübung des Suspensionsmediums erreicht werden. Diese lag vor, wenn das Medium mindestens so stark getrübt war, dass man gerade nicht mehr durchschauen konnte.

Nachdem bei den vier oben genannten Testspezies gezeigt werden konnte, dass die gewonnenen Ergebnisse mit Referenzwerttabellen übereinstimmten, konnte mit der eigentlichen Arbeit begonnen werden.

## **4.2. Statistische Ergebnisse**

Die Ergebnisse der aus den 85 Teststämmen gewonnenen Daten wurden der hierarchischen Clusteranalyse unterzogen und anhand von Dendrogrammen (siehe Tabellenanhang ab Seite 99) ausgewertet.

### **4.2.1. Clusteranalyse unter Verwendung des $S_{SM}$ -Koeffizienten**

Es wurde der  $S_{SM}$ -Koeffizient unter Anwendung des Average Linkage Verfahrens benutzt. Die Analyse wurde sowohl mit den Ergebnissen der „biochemischen“ Tests alleine (Dendrogramme Nr.1a und Nr.1b), als auch zusammen mit den morphologischen Ergebnissen (Dendrogramme Nr.2a und Nr.2b) durchgeführt.

#### **4.2.1.1. Dendrogramm Nr.1a**

Beim Dendrogramm Nr.1a wurde der  $S_{SM}$ -Koeffizienten auf die Ergebnisse der physiologischen Austestung angewendet. Die Cluster-Trennlinie wurde zunächst bei 11,5 Rescaled Distance Cluster Combine (im Folgenden als RDCC bezeichnet) - das bei der Cluseranalyse verwendete Entfernungsmaß - gezogen. Dabei ergaben sich 26 Cluster, die 31 verschiedene Spezies widerspiegeln.

Cluster 1 mit Subcluster A und B enthält in 1A einen *A.-odontolyticus*- und zwei *A.-meyeri*-Stämme. In Subcluster 1B bei RDCC 11,0 den *Actinobaculum-schaalii*-Typstamm CCUG 27420.

Der Typstamm von *Arcanobacterium pyogenes* (ATCC-19411) und ein *A.-turicensis*-Isolat bilden Cluster 2.

Cluster 3 enthält homogen die restlichen vier *A.-odontolyticus*-Stämme.

Beide *A.-suis*-Typstämme finden sich in Cluster 4 auf hohem Ähnlichkeitsniveau wieder.

Cluster 5, 6 und 9 bilden Single Member Cluster der Spezies *Arcanobacterium bernardiae*, *Actinobaculum urinale* und *Actinobaculum massiliae*.

Cluster 7 ist mit fünf Mitgliedern aus fünf verschiedenen Spezies sehr inhomogen, lässt sich allerdings bei RDCC 11,0 noch in die Subcluster A und B einteilen. Man erhält dann Cluster 7A mit einem *A. meyeri* und einem *Arcanobacterium haemolyticum* und Cluster 7B mit den einzigen Vertretern der Spezies *Arcanobacterium pluranimalium*, *Arcanobacterium phocae* und *A. europaeus*.

Mit Cluster 8 verhält es sich ähnlich, denn hier befinden sich in Cluster 8A die einzigen Stämme von *A. graevenitzi* und *A. funkei* und in Cluster 8B, bei RDCC 11,0 abzweigend, der *A.-marimammalium*-Typstamm.

Cluster 10 enthält drei weitere klinische Isolate von *A. meyeri* und den *A.-turicensis*-Typstamm DSMZ-9168.

Alle drei getesteten *A.-hyovaginalis*-Stämme sind in Cluster 11 enthalten.

Cluster 12, vier Teststämme aus vier verschiedenen Spezies enthaltend, zeigt einen *A. neuui ssp. neuui*, einen *A. hordeovulneris*, einen *A. neuui ssp. anitratus* und einen *A. slackii*.

Cluster 13 und 14 zeigen die drei restlichen *A.-neuui-ssp.-neuui*-Teststämme.

Vier von fünf *Propionibacterium-propionicum*-Stämmen sind in Cluster 15 enthalten, der fünfte folgt in Cluster 16 zusammen mit dem *A.-georgiae*-Stamm AL-1394 I/95.

Zwei weitere Single Member Cluster sind die Cluster 17 und 20 mit den einzigen Vertretern der Spezies *A. bovis* und *A. radicidentis*.

Die Cluster 18 und 19 enthalten sämtliche getesteten *A.-naeslundii*- und *A.-viscosus*-Stämme und vereinen sich bei RDCC 13,0. In Cluster 18 befinden sich zwei *A.-viscosus*-Isolate inklusive des Typstammes ATCC-15987, die restlichen folgen in Cluster 19B. Cluster 19A enthält sieben *A.-naeslundii*-Stämme. Cluster 19B setzt sich aus einem *A. naeslundii*, zwei als atypisch eingestuften klinischen *A.-naeslundii*-Isolaten, einem *A.-neuii-spp.-neuii*-Stamm und den letzten drei *A.-viscosus*-Stämmen zusammen.

Die Cluster 21 bis 24 spiegeln die Gesamtheit aller getesteten *A.-israelii*- und *A.-gerencseriae*-Stämme wider. Cluster 21, das sich in die Subcluster A und B unterteilen lässt, enthält drei klinische *A.-israelii*-Isolate und den *A.-gerencseriae*-Stamm D-1470, der allerdings eindeutige biochemische und morphologische Charakteristika der Zugehörigkeit zu der Spezies *Actinomcyces israelii* aufweist und auch schon in einer vorangehenden Arbeit (Dahlen, 2004) als eine vermutliche Fehlbestimmung beschrieben wurde. Cluster 22 stellt ein Single Member Cluster eines *A.-israelii*-Stammes dar. Zwei *A.-gerencseriae*-Stämme und der Typstamm ATCC-23860 befinden sich im Cluster 23. Vier weitere *A.-gerencseriae*-Stämme und neun *A.-israelii*-Stämme finden im Cluster 24 zusammen.

Die beiden letzten Cluster 25 und 26 stellen wieder Single Member Cluster der Spezies *A. urogenitalis* und *A. howellii* dar.

#### 4.2.1.2. Dendrogramm Nr.1b

Die unter 4.2.1.1. beschriebene Clusterbildung bei einer RDCC von 11,5 erlaubt keine eindeutige Trennung einer Reihe von *Actinomyces*- und *Actinobaculum*-Spezies und unterteilt gleichzeitig die *A.-naeslundii/viscosus*- und *A.-israelii/gerencseriae*-Komplexe weiter als die bisherigen Speziesdefinitionen nahe legen. Verschiebt man die Trennlinie der Cluster relativ geringfügig nach RDCC 9,9, werden mehr Spezies eigenen Clustern zugeordnet. Dies wird allerdings dadurch erkauft, dass die beiden genannten Komplexe noch stärker untergliedert werden.

Ergänzend zu der Auswertung von Dendrogramm Nr.1a kann jetzt *Arcanobacterium schaalii* einem eigenen Cluster 2 zugeordnet werden.

*Arcanobacterium haemolyticum*, *Arcanobacterium pluranimalium* und *Arcanobacterium phocae* finden sich in den Single Member Clustern 9, 10 und 11 wieder.

Die in der vorherigen Auswertung in einem gemeinsamen Cluster untergebrachten *Actinomyces graevenitzii*, *A. funkei* und *A. marimammalium* werden auf die Cluster 13, 14 und 15 aufgeteilt.

*A. neuui ssp. anitratus* und *A. slackii* können in den Clustern 20 und 21 von den restlichen *A. neuui ssp. neuui* abgetrennt werden.

In die zwei eigenen Cluster 25 und 26 werden jetzt auch ein *A.-georgiae*- und ein *P.-propionicum*-Stamm geteilt.

Der im Dendrogramm Nr.1a auf zwei Cluster aufgeteilte *A.-naeslundii/viscosus*-Komplex wird hier auf fünf Cluster aufgeteilt. Zwei *A.-viscosus*-Isolate sind in Cluster 28, zwei weitere zusammen mit einem abweichenden *A. neuui* in Cluster 31. Vier *A.-naeslundii*-Stämme befinden sich in Cluster 29, drei in Cluster 30 und drei zusammen mit einem *A. viscosus* in Cluster 32.

Auch der *A.-israelii/gerencseriae*-Komplex wird von vorher vier auf nunmehr sieben Cluster unterteilt. Dies vor allem deshalb, da drei *A.-israelii*-Stämmen den Single Member Clustern 35-37 zugeordnet werden.

#### 4.2.1.3. Dendrogramm Nr.2a

Beim Dendrogramm Nr.2a wurde der  $S_{SM}$ -Koeffizient auf die Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Charakterisierung angewendet. Die Cluster-Trennlinie wurde hier zunächst ebenfalls bei der Rescaled Distance Cluster Combine von 11,5 gezogen. Insgesamt ergaben sich wieder 26 Cluster, die eine noch bessere Einteilung der 31 verschiedenen Spezies wiedergeben als die Dendrogramme Nr.1a und Nr.1b.

In Cluster 1 befinden sich alle getesteten *A.-meyeri*-Stämme, die bei einer RDCC von 9,0 zusammengefasst werden.

Cluster 2 enthält beide getesteten *A.-suis*-Typstämme.

Cluster 3 enthält die Typstämme von *Actinobaculum schaalii* und *Actinobaculum urinale*, welche sich aber bei einer RDCC von 11,0 von einander trennen lassen, und somit in die Subcluster A und B fallen.

Ähnlich verhält es sich mit Cluster 4, welches drei verschiedene Stämme dreier verschiedener Spezies enthält. *Arcanobacterium haemolyticum* lässt sich hier bei einer RDCC von 11,0 im Subcluster B von *Arcanobacterium pluranimalium* und *Actinomyces europaeus* abtrennen.

Im Cluster 5 trennt sich bei RDCC 11,0 der Typstamm von *Actinomyces funkei* im Subcluster 5B von den Typstämmen von *Actinomyces marimammalium* und *Arcanobacterium phocae*.

Die Cluster 6 bis 9 sind Single Member Cluster der einzig getesteten Vertreter der Spezies *Actinobaculum massiliae*, *Arcanobacterium bernardiae*, *Actinomyces georgiae* und *A. bovis*.

In dem in zwei Subcluster aufgetrennten Cluster 10 befindet sich der *A. turicensis*-Typstamm DSMZ-9168 auf einem Ähnlichkeitsniveau von RDCC 10,0 bei dem Hauptcluster der *A.-hyovaginalis*-Vertreter. Bei RDCC 11,0 lässt sich das Subcluster 10B mit einem klinischen Isolat von *A. odontolyticus* abgrenzen.

Cluster 11 enthält die einzigen Speziesvertreter von *Arcanobacterium pyogenes* und *A. turicensis*, die sich bei RDCC 11,0 in die Subcluster A und B aufteilen lassen.

In den Clustern 12 und 13, bei RDCC 12,0 zusammenführend, sind vier *A.-odontolyticus*-Teststämme enthalten.

Die Cluster 14 und 15 enthalten vier der fünf *A.-neuui-spp.-neuui*-Teststämme und den Vertreter der Subspezies *anitratius*.

Die Cluster 16, 17, 19, 22, 25 und 26 sind allesamt Single Member Cluster der einzigen Vertreter der Spezies *A. hordeovulneris*, *A. slackii*, *A. graevenitzii*, *A. radidentis*, *A. howellii* und *A. urogenitalis*.

Das homogene Cluster 18, welches alle *Propionibacterium-propionicum*-Teststämme enthält, zeigt eine Auftrennung bei einer RDCC von 9,0.

Das ausschließlich alle zehn getesteten *A.-naeslundii*-Stämme enthaltende Cluster 20 zeigt ebenfalls nur eine Auftrennung bei RDCC 9,0.

Cluster 21 beherbergt alle *A.-viscosus*-Stämme und einen aberranten *A.-neuui-spp.-neuui*-Stamm, der auch in allen anderen Auswertungen immer in dieser Position zu finden ist.

Die Cluster 23 und 24 repräsentieren die Gesamtheit aller *A.-israelii*- und *A.-gerencseriae*-Teststämme. Cluster 23 enthält vier klinische *A.-israelii*-Isolate und den *A.-gerencseriae*-Teststamm D-1470, bei dem es sich vermutlich um eine Fehlbezeichnung handelt (siehe 4.2.1.1.). Cluster 24 zeigt im Subcluster 24A (bei RDCC 11,0 abzweigend) drei *A.-gerencseriae*-Stämme, inklusive dem Typstamm ATCC-23860. Subcluster 24B enthält 13 Teststämme, von denen sich die neun *A.-israelii*-Vertreter bei RDCC 9,0 von den restlichen vier *A.-gerencseriae*-Teststämmen abtrennen lassen.

#### 4.2.1.4. Dendrogramm Nr.2b

Um auch hier, ergänzend zu Dendrogramm Nr.2a (siehe 4.2.1.3.), eine genauere Unterteilung zu erreichen, wurde die Trennlinie geringfügig nach RDCC 10,5 verschoben. Die bessere Speziesclustering wurde hier ebenfalls unter Inkaufnahme einer stärkeren Untergliederung der *A.-israelii/gerencseriae*- und *A.-naeslundii/viscosus*-Komplexe durchgeführt. Insgesamt ergaben sich 35 Cluster.

*Actinobaculum schaalii*, *Actinobaculum urinale* und *Arcanobacterium haemolyticum* können jetzt den einzelnen Clustern 3, 4 und 6 zugeordnet werden.

Der *A.-funkei*-Typstamm bekommt das Single Member Cluster 8 zugeteilt.

Auch *Arcanobacterium pyogenes* und *Actinomyces turicensis* werden den einzelnen Clustern 15 und 16 zugewiesen.

Vom *A.-neuui-ssp.-neuui*-Hauptcluster wird ein einzelner *A.-neuui*-Stamm einem neuen eigenen Cluster 20 zugeteilt.

Die zuletzt in einem Hauptcluster untergebrachten *A.-viscosus*-Stämme werden nun in zwei Cluster unterteilt, wobei das eine, Cluster 28, noch den aberranten *A.-neuui*-Stamm enthält.

Der *A.-israelii/gerencseriae*-Komplex wird hier in vier Cluster unterteilt, wobei dies nicht mit einer genaueren Differenzierbarkeit zwischen den beiden Spezies einhergeht.

## 4.2.2. Clusteranalyse unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten

Außerdem wurde der Jaccard-Koeffizient unter Anwendung des Average Linkage Verfahrens benutzt. Die Analyse wurde auch hier einmal nur mit den Ergebnissen der physiologischen Auswertung (Dendrogramm Nr.3) und einmal zusammen mit den morphologischen Ergebnissen (Dendrogramm Nr.4) durchgeführt.

### 4.2.2.1. Dendrogramm Nr.3

Die Cluster-Trennlinie wurde im Dendrogramm Nr.3 bei 8,9 RDCC gesetzt. Hierbei erhielt man 40 Cluster, die eine gute Einteilung der 31 Spezies erlaubten und die großen *A.-israelii/gerencseriae*- und *A.-naeslundii/viscosus*-Komplexe auch nicht zu stark unterteilten.

Cluster 1 wird aus zwei *A.-meyeri*-Stämmen gebildet.

Die Cluster 2, 3 und 4 sind jeweils Single Member Cluster von einem *A.-odontolyticus*-Stamm, dem *Actinobaculum-schaalii*-Typstamm und einem weiteren *A.-meyeri*-Isolat, das erst bei RDCC 14,0 mit dem nächsten *A. meyeri* aus Cluster 1 zusammengeführt wird..

Die drei *A.-odontolyticus*-Stämme aus Cluster 5 bilden ein homogenes Cluster, das den Typstamm ATCC-17929 mit enthält. Bei einer RDCC von 10,0 treffen sie auf einen weiteren *A. odontolyticus* in Cluster 6.

Cluster 7 und 8 sind Single Member Cluster von *Arcanobacterium pyogenes* und einem *Actinomyces-turicensis*-Isolat, dessen Typstamm (DSMZ-9168) in Cluster 10 folgt.

Ein weiteres Single Member Cluster bildet Cluster 9, welches nur den *A.-bovis*-Typstamm (ATCC-13683) enthält.

Cluster 10 besteht aus drei *A.-meyeri*-Isolaten und dem Typstamm von *A. turicensis*, welcher der anderen Spezies auf einem Ähnlichkeitsmaß von 8,0 RCDD begegnet.

Das homogene und nur *A. hyovaginalis* enthaltende Cluster 11 zeigt auch die hohe Ähnlichkeit der beiden Typstämme DSMZ-10695 und ATCC-51367 auf.

Cluster 12 bis 16 stellen Single Member Cluster dar, die aus einem klinischen Isolat eines *A. israelii*, dem Typstamm von *A. graevenitzii* (CCUG-27294 T), dem Typstamm von *A. funkei* (CCUG-42773), einem *A.-georgie*-Stamm und einem *Propionibacterium-propionicum*-Stamm bestehen. Der vom großen Cluster 19 abweichende *A. israelii* zeigte in den Testergebnissen nur negative Abweichungen von den anderen *A. israelii*, so dass die Bildung eines einzelnen Clusters wahrscheinlich nur auf ein schlechtes Wachstumsverhalten zurückzuführen ist. Ähnlich verhält es sich mit dem *P. propionicum*-Stamm, dessen Hauptcluster 26 erst bei einer RDCC von 15 erreicht wird.

In Cluster 17 und 18 befinden sich drei Stämme von *A. neuui ssp. neuui* inklusive dem Typstamm DSMZ-8576.

Das große Cluster 19 enthält 13 *A.-israelii*- und *A.-gerencseriae*-Stämme, welche auf dem hohen Übereinstimmungsmaß von RDCC 6,0 zusammengeführt werden. Sieben getestete *A. israelii* lassen sich sogar homogen bei RDCC 4,0 zusammenführen. Bei RDCC 7,0 wird dem Cluster noch der *A.-urogenitalis*-Typstamm DSMZ 15434 angegliedert.

Drei *A.-gerencseriae*-Stämme, inklusive dem Typstamm ATCC 23860, befinden sich in Cluster 20.

Der *A.-howellii*-Typstamm bildet das Single Member Cluster 21.

Abgetrennt von ihrem Hauptcluster befinden sich ein klinisches Isolat eines *A. israelii* und der *A.-gerencseriae*-Stamm D-1470, bei dem es sich vermutlich um eine Fehlbezeichnung handelt (siehe 4.2.1.1.) in Cluster 22, und je ein *A.-israelii*-Isolat in Cluster 23 und 24.

Die vier *Propionibacterium-propionicum*-Stämme aus Cluster 25 vereinigen sich bei RDCC 8,0 miteinander und bilden eine homogene Gruppe.

Cluster 26 und 27 enthielten den *A.-naeslundii/viscosus*-Komplex und einem einzelnen *A.-neuuii-ssp.-neuuii*-Stamm. Das Cluster 25 enthält zwei *A.-viscosus*-Stämme, darunter den Typstamm ATCC-15987. Cluster 26 enthält sämtliche getesteten *A.-naeslundii*-Stämme, drei *A.-viscosus*-Isolate, und einen aberranten *A.-neuuii-ssp.-neuuii*-Stamm.

Das Single Member Cluster 28 enthält den als einzigen Vertreter dieser Gruppe getesteten Typstamm der Spezies *A. radidentis* DSMZ-15433.

Das inhomogene Cluster 29 mit zwei Mitgliedern aus zwei verschiedenen Spezies lässt die relativ weite Entfernung von RDCC 8,0 zwischen einem *A.-neuuii-ssp.-neuuii*-Isolat und dem *A.-hordeovulneris*-Typstamm NCTC-11636 erkennen.

Die Cluster 30 bis 34 bilden allesamt Single Member Cluster verschiedener Spezies, die jeweils auch nur als einzelne Vertreter dieser Spezies für den Test zur Verfügung standen. Dabei handelt es sich um den *A.-slackii*-Typstamm NCTC-11923, ein klinisches Isolat von *A. neuuii ssp. anitratus*, den Typstamm von *Arcanobacterium bernardiae* DSMZ-9152, den Typstamm von *Actinobaculum urinale* CCUG-4609 und den Typstamm von *Arcanobacterium pluranimalium* CCUG-42575.

Cluster 35 enthält die beiden Typstämme ATCC-33144 und DSMZ-20639 von *Actinobaculum suis*, die nach dem Testergebnis eine hohe Ähnlichkeit aufweisen.

Cluster 36 bis 40 bilden wieder Single Member Cluster verschiedener Spezies, die nur als einzelne Vertreter ihrer Spezies im Test vertreten waren. Im einzelnen handelt es sich um ein klinisches Isolat von *A. europaeus* (D-1886) und die Typstämme von *Arcanobacterium haemolyticum* (DSMZ-20595), *Actinomyces marimammalium* (DSMZ-15383), *Actinobaculum massiliae* (CIP-1079) und *Arcanobacterium phocae* (DSMZ-10004).

#### 4.2.2.2. Dendrogramm Nr.4

Beim Dendrogramm Nr.4 wurde mit Hilfe des Jaccard-Koeffizienten die Ergebnisse der „biochemischen“ und morphologischen Untersuchungen ausgewertet. Die Cluster-Trennlinie konnte hier bei der Rescaled Distance Cluster Combine von 12,5 gezogen werden, um ein sinnvolles Auftrennungsergebnis zu erzielen. Insgesamt ergaben sich 30 Cluster, die eine gute Unterteilung der 31 verschiedenen Spezies ermöglicht haben.

Cluster 1 beinhaltet sämtliche *A.-meyeri*-Isolate, die zwar bis zu einem RDCC von 12,0 voneinander abweichen, sich aber dennoch eindeutig von den anderen Taxa abgrenzen.

Die Single Member Cluster 2, 3, und 4 enthalten allein die einzigen Vertreter der Spezies *Actinobaculum schaalii* (CCUG-27420), *Actinomyces bovis* (ATCC-13683) und *Arcanobacterium pyogenes* (ATCC-19411).

Cluster 5 erscheint auf den ersten Blick sehr inhomogen, lässt sich allerdings in die Untergruppen A und B unterteilen. In 5A befinden sich nun alle Vertreter der Spezies *Actinomyces hyovaginalis* inklusive beider Typstämme ATCC-10695 und ATCC-51367 und der *A. turicensis*-Typstamm DSMZ-9168. Bei einer RDCC von 12,0 hängt noch ein klinisches Isolat von *A. odontolyticus* mit an diesem Cluster.

Cluster 6 enthält drei weitere Isolate der Spezies *A. odontolyticus*, Cluster 7A noch einen weiteren. Cluster 7B (bei einer RDCC von 12,0 abzweigend) einen *A.-turicensis*-Stamm, dessen Gesamtentfernung von dem anderen getesteten *A. turicensis* aus Cluster 5 eine RDCC von 15,0 aufweist.

Cluster 8 enthält die beiden Typstämme ATCC-33144 und DSMZ-20639 von *Actinobaculum suis*, die nach dem Testergebnis eine hohe Ähnlichkeit aufweisen.

Die Cluster 9 bis 15 sind Single Member Cluster von einzigen Vertretern der jeweiligen Spezies. Im einzelnen handelt es sich um *Actinomyces funkei* (ATCC-42773), *A. marimammalium* (DSMZ-15383), *Arcanobacterium bernardiae* (DSMZ-9152), *Actinobaculum urinale* (CCUG-

4609), *Actinomyces europaeus* (D-1886), *Arcanobacterium pluranimalium* (CCUG-42575) und *Arcanobacterium haemolyticum* (DSMZ-20595).

Fünf Vertreter der Spezies *Actinomyces neuui* finden sich in den Clustern 16 und 17. Im Cluster 16 befindet sich der Typstamm der Spezies *A. neuui ssp. neuui* (DSMZ-8576) und zwei weitere klinische Isolate. Der Vertreter der Subspezies *anitratus* (AL-1119'4/98) und ein weiterer Stamm der Subspezies *neuui* sind in Cluster 17 enthalten.

Cluster 18 und 19 sind zwei Single Member Cluster der Spezies *A. slackii* (NCTC-11923) und *A. hordeovulneris* (ATCC-35275).

Die 21 zu Cluster 20 gehörenden Teststämme beinhalten sämtliche Vertreter der Spezies *A. israelii* und *A. gerencseriae*. Untergliedert man sie in vier Subcluster A, B, C und D, so fallen neun klinische Isolate der Spezies *A. israelii* bei RDCC 4,0 in Subcluster A. Bei RDCC 6,5 spaltet sich das Subcluster B mit vier klinischen Isolaten der Spezies *A. gerencseriae* von der ersten Gruppe ab. Bei RDCC 10,0 trifft man auf das Subcluster C mit drei weiteren *A. gerencseriae*-Stämmen, inklusive des Typstammes ATCC-23860. Bei RDCC 12,0 folgt das Subcluster D mit vier *A. israelii*-Stämmen und einem unter Routinebedingungen als *A. gerencseriae* bestimmten Stamm (D-1470), der aber eindeutig Zugehörigkeit zur Spezies *A. israelii* aufweist (siehe 4.2.2.1.).

Cluster 21 und 22, sowie 25, 27, 28, 29 und 30 stellen Single Member Cluster der Spezies *A. howellii* (NCTC-11636), *A. urogenitalis* (DSMZ-15434), *A. radidentis* (DSMZ-15433), *A. graevenitzii* (CCUG-27294 T), *A. georgiae* (AL-1394 I/95), *Actinobaculum massiliae* (CIP-107404) und *Arcanobacterium phocae* (DSMZ-10004) dar.

Alle fünf getesteten *Actinomyces-viscosus*-Stämme finden sich in Cluster 23 wieder, zusätzlich ein Abweichler aus der Gruppe der *A. neuui ssp. neuui* (AL-1132 II/94)

Das sehr homogene Cluster 24 enthält alle zehn getesteten *A. naeslundii*-Stämme, die lediglich bis zu einem RDCC von 9,0 variieren.

Im Cluster 26 befinden sich alle fünf getesteten *Propionibacterium-propionicum*-Stämme, die bis zu einem RDCC von 9,0 voneinander abweichen.

### **4.3. Näherungsmatrix**

Basierend auf der Auswertung von Dendrogramm Nr.4 wurde unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten eine Näherungsmatrix erstellt (siehe Tabelle 8), aus der die prozentuale Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Clustern ersichtlich ist. Die Ordinate enthält außer der Clusternummer noch den Namen der überwiegend in diesem entsprechenden Cluster vorhandenen Spezies. Cluster 20 wurde, um eine Unterscheidung zwischen *A. israelii* und *A. gerencseriae* vornehmen zu können, in den Subclustern A, B/C und D dargestellt. Die Übereinstimmungen reichen, abgesehen von der 100%igen Übereinstimmung mit dem eigenen Cluster, von 7% zwischen Cluster 20D und Cluster 30 bis 91% zwischen Cluster 20A und Cluster 20B/C.

Die Näherung zwischen den einzelnen Clustern liegt in 99,47% der Fälle bei weniger als 70%. Hiermit konnte gezeigt werden, dass eine sichere Unterscheidung zwischen den einzelnen Clustern und damit Spezies möglich ist, und nur selten Unterscheidungsprobleme durch zu hohe Übereinstimmungen vorliegen.

Die höchste Übereinstimmung von 91% zwischen dem Cluster 20A, welches den Hauptanteil aller getesteten *A.-israelii*-Stämme enthält und dem Cluster 20B/C, welches sämtliche *A. gerencseriae* enthält, kommt durch das ähnliche Wachstums- und Verstoffwechslungsverhalten der beiden Spezies zustande. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Verstoffwechslung von L-Arabinose und dem eher fädigen Wachstum von *A. israelii* im Gegensatz zu dem eher in leicht verzweigten Ketten wachsenden *A. gerencseriae* (siehe 4.4. Tabelle 9).

Tabelle 8

## Näherungsmatrix

## Ähnlichkeitsmaß nach Jaccard

	1 - A. meyeri	2 - Act. schaalii	3 - A. bovis	4 - Arc. pyogenes	5 - A. hyovaginalis	6 - A. odontolyticus	7 - A. turicensis	8 - A. suis	9 - A. funkei	10 - A. marimammalium	11 - Arc. bernardiae	12 - Act. urinale	13 - A. europaeus	14 - Arc. plurimalium	15 - Arc. haemolyticum	16 - A. neuil ssp. neuil
Cluster 1	1,00	0,55	0,36	0,46	0,54	0,44	0,48	0,43	0,52	0,26	0,42	0,43	0,36	0,39	0,33	0,44
Cluster 2	0,55	1,00	0,26	0,41	0,39	0,40	0,40	0,45	0,41	0,32	0,38	0,53	0,44	0,56	0,40	0,35
Cluster 3	0,36	0,26	1,00	0,59	0,65	0,56	0,53	0,38	0,40	0,38	0,48	0,38	0,30	0,39	0,33	0,48
Cluster 4	0,46	0,41	0,59	1,00	0,48	0,57	0,54	0,43	0,45	0,30	0,48	0,43	0,35	0,53	0,38	0,43
Cluster 5	0,54	0,39	0,65	0,48	1,00	0,57	0,65	0,52	0,43	0,31	0,50	0,46	0,35	0,37	0,42	0,46
Cluster 6	0,44	0,40	0,56	0,57	0,57	1,00	0,62	0,42	0,44	0,30	0,36	0,42	0,35	0,38	0,32	0,38
Cluster 7	0,48	0,40	0,53	0,54	0,65	0,62	1,00	0,37	0,48	0,28	0,41	0,32	0,23	0,33	0,29	0,42
Cluster 8	0,43	0,45	0,38	0,43	0,52	0,42	0,37	1,00	0,36	0,33	0,39	0,33	0,39	0,42	0,35	0,37
Cluster 9	0,52	0,41	0,40	0,45	0,43	0,44	0,48	0,36	1,00	0,53	0,42	0,43	0,50	0,45	0,38	0,34
Cluster 10	0,26	0,32	0,38	0,30	0,31	0,30	0,28	0,33	0,53	1,00	0,33	0,41	0,40	0,35	0,35	0,23
Cluster 11	0,42	0,38	0,48	0,48	0,50	0,36	0,41	0,39	0,42	0,33	1,00	0,52	0,45	0,55	0,29	0,32
Cluster 12	0,43	0,53	0,38	0,43	0,46	0,42	0,32	0,33	0,43	0,41	0,52	1,00	0,39	0,50	0,35	0,37
Cluster 13	0,36	0,44	0,30	0,35	0,35	0,35	0,23	0,39	0,50	0,40	0,45	0,39	1,00	0,60	0,50	0,23
Cluster 14	0,39	0,56	0,39	0,53	0,37	0,38	0,33	0,42	0,45	0,35	0,55	0,50	0,60	1,00	0,44	0,38
Cluster 15	0,33	0,40	0,33	0,38	0,42	0,32	0,29	0,35	0,38	0,35	0,29	0,35	0,50	0,44	1,00	0,25
Cluster 16	0,44	0,35	0,48	0,43	0,46	0,38	0,42	0,37	0,34	0,23	0,32	0,37	0,23	0,38	0,25	1,00
Cluster 17	0,30	0,25	0,39	0,33	0,38	0,33	0,31	0,26	0,24	0,20	0,31	0,36	0,19	0,32	0,22	0,57
Cluster 18	0,28	0,19	0,32	0,27	0,31	0,31	0,29	0,20	0,15	0,14	0,33	0,29	0,22	0,30	0,17	0,40
Cluster 19	0,30	0,24	0,46	0,39	0,43	0,38	0,34	0,20	0,23	0,13	0,42	0,36	0,23	0,38	0,21	0,39
Cluster 20A	0,32	0,21	0,39	0,38	0,45	0,34	0,57	0,25	0,27	0,14	0,26	0,22	0,11	0,19	0,19	0,45
Cluster 20B/C	0,29	0,18	0,40	0,39	0,42	0,35	0,58	0,22	0,31	0,18	0,26	0,22	0,11	0,19	0,19	0,46
Cluster 20D	0,28	0,16	0,37	0,27	0,39	0,31	0,44	0,24	0,23	0,14	0,21	0,16	0,10	0,17	0,21	0,36
Cluster 21	0,36	0,25	0,40	0,44	0,42	0,39	0,50	0,26	0,28	0,14	0,30	0,26	0,14	0,26	0,26	0,43
Cluster 22	0,36	0,29	0,43	0,35	0,49	0,35	0,53	0,26	0,32	0,22	0,33	0,30	0,13	0,21	0,18	0,53
Cluster 23	0,41	0,28	0,67	0,50	0,61	0,53	0,56	0,33	0,40	0,24	0,42	0,29	0,28	0,39	0,26	0,56
Cluster 24	0,35	0,24	0,59	0,48	0,55	0,57	0,64	0,32	0,34	0,19	0,36	0,24	0,23	0,29	0,25	0,46
Cluster 25	0,25	0,15	0,43	0,34	0,45	0,42	0,41	0,25	0,24	0,17	0,29	0,22	0,14	0,22	0,16	0,49
Cluster 26	0,39	0,22	0,43	0,43	0,45	0,52	0,55	0,23	0,38	0,17	0,35	0,27	0,21	0,28	0,28	0,38
Cluster 27	0,26	0,15	0,42	0,48	0,30	0,46	0,40	0,21	0,35	0,19	0,27	0,21	0,24	0,27	0,27	0,27
Cluster 28	0,29	0,23	0,57	0,38	0,46	0,48	0,47	0,35	0,38	0,29	0,35	0,19	0,22	0,30	0,25	0,33
Cluster 29	0,22	0,33	0,27	0,25	0,22	0,26	0,24	0,21	0,25	0,19	0,29	0,35	0,25	0,38	0,22	0,29
Cluster 30	0,23	0,28	0,17	0,20	0,23	0,22	0,21	0,29	0,41	0,38	0,24	0,29	0,36	0,40	0,31	0,21

## Fortsetzung Tabelle 8

## Näherungsmatrix

## Ähnlichkeitsmaß nach Jaccard

	17 - A. neuii ssp. anitratus	18 - A. slackii	19 - A. hordeovulneris	20A - A. israelii / 1	20B/C - A. gerencseriae	20D - A. israelii / 2	21 - A. howellii	22 - A. urogenitalis	23 - A. viscosus	24 - A. naeslundii	25 - A. radidentis	26 - Prop. propionicum	27 - A. graevenitzii	28 - A. georgiae	29 - Act. massiliae	30 - Arc. phocae
Cluster 1	0,30	0,28	0,30	0,32	0,29	0,28	0,36	0,36	0,41	0,35	0,25	0,39	0,26	0,29	0,22	0,23
Cluster 2	0,25	0,19	0,24	0,21	0,18	0,16	0,25	0,29	0,28	0,24	0,15	0,22	0,15	0,23	0,33	0,28
Cluster 3	0,39	0,32	0,46	0,39	0,40	0,37	0,40	0,43	0,67	0,59	0,43	0,43	0,42	0,57	0,27	0,17
Cluster 4	0,33	0,27	0,39	0,38	0,39	0,27	0,44	0,35	0,50	0,48	0,34	0,43	0,48	0,38	0,25	0,20
Cluster 5	0,38	0,31	0,43	0,45	0,42	0,39	0,42	0,49	0,61	0,55	0,45	0,45	0,30	0,46	0,22	0,23
Cluster 6	0,33	0,31	0,38	0,34	0,35	0,31	0,39	0,35	0,53	0,57	0,42	0,52	0,46	0,48	0,26	0,22
Cluster 7	0,31	0,29	0,34	0,57	0,58	0,44	0,50	0,53	0,56	0,64	0,41	0,55	0,40	0,47	0,24	0,21
Cluster 8	0,26	0,20	0,20	0,25	0,22	0,24	0,26	0,26	0,33	0,32	0,25	0,23	0,21	0,35	0,21	0,29
Cluster 9	0,24	0,15	0,23	0,27	0,31	0,23	0,28	0,32	0,40	0,34	0,24	0,38	0,35	0,38	0,25	0,41
Cluster 10	0,20	0,14	0,13	0,14	0,18	0,14	0,14	0,22	0,24	0,19	0,17	0,17	0,19	0,29	0,19	0,38
Cluster 11	0,31	0,33	0,42	0,26	0,26	0,21	0,30	0,33	0,42	0,36	0,29	0,35	0,27	0,35	0,29	0,24
Cluster 12	0,36	0,29	0,36	0,22	0,22	0,16	0,26	0,30	0,29	0,24	0,22	0,27	0,21	0,19	0,35	0,29
Cluster 13	0,19	0,22	0,23	0,11	0,11	0,10	0,14	0,13	0,28	0,23	0,14	0,21	0,24	0,22	0,25	0,36
Cluster 14	0,32	0,30	0,38	0,19	0,19	0,17	0,26	0,21	0,39	0,29	0,22	0,28	0,27	0,30	0,38	0,40
Cluster 15	0,22	0,17	0,21	0,19	0,19	0,21	0,26	0,18	0,26	0,25	0,16	0,28	0,27	0,25	0,22	0,31
Cluster 16	0,57	0,40	0,39	0,45	0,46	0,36	0,43	0,53	0,56	0,46	0,49	0,38	0,27	0,33	0,29	0,21
Cluster 17	1,00	0,62	0,57	0,31	0,32	0,31	0,28	0,35	0,48	0,38	0,46	0,33	0,21	0,32	0,26	0,27
Cluster 18	0,62	1,00	0,52	0,26	0,27	0,22	0,24	0,24	0,37	0,36	0,39	0,31	0,19	0,22	0,15	0,15
Cluster 19	0,57	0,52	1,00	0,27	0,28	0,27	0,35	0,28	0,45	0,43	0,38	0,38	0,29	0,32	0,25	0,20
Cluster 20A	0,31	0,26	0,27	1,00	0,91	0,71	0,65	0,63	0,46	0,57	0,51	0,57	0,39	0,37	0,14	0,08
Cluster 20B/C	0,32	0,27	0,28	0,91	1,00	0,63	0,62	0,64	0,47	0,58	0,53	0,59	0,41	0,38	0,15	0,12
Cluster 20D	0,31	0,22	0,27	0,71	0,63	1,00	0,53	0,40	0,41	0,53	0,47	0,48	0,37	0,44	0,15	0,07
Cluster 21	0,28	0,24	0,35	0,65	0,62	0,53	1,00	0,60	0,47	0,54	0,56	0,46	0,41	0,34	0,18	0,09
Cluster 22	0,35	0,24	0,28	0,63	0,64	0,40	0,60	1,00	0,46	0,45	0,55	0,35	0,26	0,38	0,16	0,14
Cluster 23	0,48	0,37	0,45	0,46	0,47	0,41	0,47	0,46	1,00	0,77	0,63	0,52	0,41	0,48	0,21	0,21
Cluster 24	0,38	0,36	0,43	0,57	0,58	0,53	0,54	0,45	0,77	1,00	0,66	0,59	0,50	0,42	0,16	0,13
Cluster 25	0,46	0,39	0,38	0,51	0,53	0,47	0,56	0,55	0,63	0,66	1,00	0,45	0,35	0,41	0,08	0,11
Cluster 26	0,33	0,31	0,38	0,57	0,59	0,48	0,46	0,35	0,52	0,59	0,45	1,00	0,56	0,41	0,14	0,10
Cluster 27	0,21	0,19	0,29	0,39	0,41	0,37	0,41	0,26	0,41	0,50	0,35	0,56	1,00	0,33	0,09	0,10
Cluster 28	0,32	0,22	0,32	0,37	0,38	0,44	0,34	0,38	0,48	0,42	0,41	0,41	0,33	1,00	0,24	0,14
Cluster 29	0,26	0,15	0,25	0,14	0,15	0,15	0,18	0,16	0,21	0,16	0,08	0,14	0,09	0,24	1,00	0,21
Cluster 30	0,27	0,15	0,20	0,08	0,12	0,07	0,09	0,14	0,21	0,13	0,11	0,10	0,10	0,14	0,21	1,00

Legende zu Tabelle 8:

Die Clusternummern am linken Seitenrand entsprechen den Clustern aus Dendrogramm Nr. 4; die Speziesangaben am oberen Seitenrand entsprechen den Hauptvertretern aus den entsprechenden Clustern.

#### **4.4. Validitätsprüfung**

Basierend auf der Auswertung von Dendrogramm Nr. 4 wurde unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten eine Wahrscheinlichkeitsmatrix entwickelt (siehe Tabelle 9). Sie bezieht sich auf den prozentual erwarteten positiven Testausgang eines Teststammes aus einem bestimmten Cluster. Die in der Ordinate angegebenen Speziesnamen geben die hauptsächlich in diesem Cluster vertretene Spezies wieder (analog zu 4.3. Tabelle 8). Bei Single Member Clustern ist die Aussagekraft in der Hinsicht eingeschränkt, dass ein einzelner positiver Testausgang schon gleichzusetzen war mit 100%.

Um eine Aussage über die Validität des Testsystems treffen zu können, wurden exemplarisch einige Werte in Tabelle 9 in Grautönen unterlegt, von denen verlässliche Literaturangaben vorlagen. Dunkel unterlegt sind die Felder, welche laut Referenzdaten zu einem negativen Reaktionsausgang führen sollten, hell unterlegt die, die erfahrungsgemäß einen positiven Reaktionsausgang erwarten ließen.







## Fortsetzung Tabelle 9

## Wahrscheinlichkeitsmatrix - Clusterzugehörigkeit nach Dendrogramm Nr. 4

	14 - Arc. plurimalium	15 - Arc. haemolyticum	16 - A. neuji ssp. neuji	17 - A. neuji ssp. anitratum	18 - A. slackii	19 - A. hordeovulneris	20A - A. israelii /1	20B/C - A. gerencseriae	20D - A. israelii /2	21 - A. howellii	22 - A. urogenitalis	23 - A. viscosus	24 - A. naeslundii
<b>Katalase</b>	100	0	100	100	100	100	0	0	0	100	0	100	0
<b>Na-Nitrat</b>	0	0	100	50	100	100	100	100	100	0	100	100	100
<b>Harnstoff</b>	0	0	66	50	100	100	0	0	0	0	0	33	50
<b>Arginin</b>	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Äskulin</b>	0	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100	83	100
<b>Objektträger-Präparat:</b>													
<b>Kokkoide</b>													
<b>Stäbchen</b>	0	0	100	100	100	100	0	0	0	100	100	33	0
<b>Nicht verzweigt</b>	100	100	0	0	100	100	0	0	0	100	0	50	100
<b>Verzweigt</b>	0	0	0	0	0	0	0	100	20	0	100	33	0
<b>Fäden</b>	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0
<b>Kolonie makroskopisch:</b>													
<b>≤2mm</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	83	100
<b>Weiß</b>	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Beige</b>	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	50	0
<b>Gelb-orange</b>	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Ungefärbt</b>	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0
<b>Rau</b>	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
<b>Kolonie mikroskopisch:</b>													
<b>Fädig-myzelial</b>	0	100	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	90
<b>Durchsichtig</b>	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0
<b>Undurchsichtig</b>	0	0	0	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100
<b>Granuliert</b>	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	100	100	50

Fortsetzung Tabelle 9

## Wahrscheinlichkeitsmatrix - Clusterzugehörigkeit nach Dendrogramm Nr. 4

	25 - A. radidentis	26 - P. propionicum	27 - A. graevenitzii	28 - A. georgiae	29 - Act. massiliae	30 - Arc. phocae
Adonitol	0	0	0	0	0	0
L-Arabinose	0	0	0	0	0	0
Amygdalin	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	60	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0
Cellobiose	100	0	0	0	0	0
Dextrin	100	100	100	100	0	0
meso-Erythritol	0	0	0	0	0	0
Fruktose	100	100	0	100	0	0
L-Fucose	100	80	0	0	0	0
Galaktose	100	60	100	0	0	0
Gentiobiose	100	0	0	0	0	0
Glukose	100	100	100	100	0	0
$\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	100	0	0	0	0	0
Glycerol	100	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0
Inulin	100	40	0	0	0	0
Laktat	0	100	100	0	100	0
Laktose	100	80	100	100	0	0
D-Lyxose	0	80	0	0	100	0
Mannitol	100	100	0	100	0	0
Mannose	100	80	0	100	0	0
Maltose	100	100	100	100	0	0
Melibiose	100	20	0	0	0	0
Melezitose	100	0	0	0	0	0
Raffinose	100	100	100	0	0	0
Rhamnose	0	0	0	100	0	0
Ribose	100	60	100	0	0	100
Salicin	100	0	0	0	0	0
Sorbitol	0	60	0	0	0	0
Sucrose	100	100	100	100	0	0
Trehalose	100	100	0	100	0	0
Xylose	0	0	0	0	0	0
Xylitol	0	0	0	0	0	0
Indol	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung Tabelle 9

**Wahrscheinlichkeitsmatrix - Clusterzugehörigkeit nach Dendrogramm Nr. 4**

	25 - A. radidentis	26 - P. propionicum	27 - A. graevenitzii	28 - A. georgiae	29 - Act. massiliae	30 - Arc. phocae
<b>Katalase</b>	100	0	0	0	0	100
<b>Na-Nitrat</b>	100	100	0	100	100	0
<b>Harnstoff</b>	100	20	0	0	0	0
<b>Arginin</b>	100	0	100	100	100	0
<b>Äskulin</b>	100	0	0	100	100	0
<b>Objektträger-Präparat:</b>						
<b>Kokkoide</b>						
<b>Stäbchen</b>	0	0	0	0	100	0
<b>Nicht verzweigt</b>	100	100	100	100	0	0
<b>Verzweigt</b>	0	0	0	0	0	100
<b>Fäden</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Kolonie makroskopisch:</b>						
<b>≤2mm</b>	0	100	0	0	100	100
<b>Weiß</b>	100	100	100	100	0	100
<b>Beige</b>	100	0	0	0	0	0
<b>Gelb-orange</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Ungefärbt</b>	0	0	0	100	100	100
<b>Rau</b>	0	100	100	0	0	0
<b>Kolonie mikroskopisch:</b>						
<b>Fädig-myzelial</b>	0	100	100	0	0	0
<b>Durchsichtig</b>	0	0	0	100	100	100
<b>Undurchsichtig</b>	100	100	100	0	0	0
<b>Granuliert</b>	100	0	0	0	0	100

Literaturdaten zusammengestellt aus:  
 (Collins et al., 1993; Collins et al., 2000; Funke et al., 1995; Hoyles et al., 2001c; Lawson et al., 1997; Lawson et al., 2001a; Nikolaitchouk et al., 2000; Schaal, 1992a; Schofield und Schaal, 1981)

Legende zu Tabelle 9:

Am linken Tabellenrand sind die verwendeten Testsubstanzen und die morphologischen Eigenschaften aufgetragen. Das **mikroskopische Objektträger-Präparat** wurde nach fünf Tagen Wachstum angefertigt: Verwendete Abkürzungen: „Nicht verzweigt“ (nicht verzweigte Stäbchen), „Verzweigt“ (leicht verzweigte oder in Ketten liegende Stäbchen) und „Fäden“ (stark verzweigte und fädig liegende Stäbchen); **Kolonie makroskopisch** wurde nach fünf Tagen Wachstum bewertet: „Weiß“, „Beige“, „Gelb-orange“ und „Ungefärbt“ beschreiben die Farbe, „Rau“ die Kolonieoberfläche (von „100“ abweichenden Werte beschreiben eine glatte Kolonieoberfläche); **Kolonie mikroskopisch** wurde nach 48h Inkubation bewertet.

Die grau unterlegten Felder entsprechen den Referenzdaten mit den Zuordnungen: hell=positiv, dunkel=negativ.

Bis auf wenige Ausnahmen lässt sich klar erkennen, dass die mit dem hier vorgestellten Testsystem gewonnenen Daten mit den Referenzwerten übereinstimmen.

Die Reaktionen, die negativ sein sollten, entsprachen mehrheitlich diesem Kriterium (weniger als 50% verliefen positiv) mit Ausnahme dreier positiver Reaktionsausgänge im *A.-meyerii*-Cluster (1x 67%, 2x 50%). Gemessen an 118 dokumentierten, laut Referenzdatenlage negativer Reaktionen, entspricht dies einer falsch-positiv Abweichung von 2,54%.

Bei den Reaktionen, die positiv verlaufen sollten, gab es insgesamt sieben abweichende Ergebnisse. Bei 100 vorhandenen positiven Referenzwerten entspricht dies einer falsch-negativen Abweichung von 7%.

Die Tabelle der Wahrscheinlichkeiten positiver Reaktionsausfälle (Tabelle 9) stellt gleichzeitig eine auf der Basis des hier entwickelten und geprüften Verfahrens aufgestellte diagnostische Tabelle dar, aus der leicht und zuverlässig Daten für ein praktikables Identifizierungssystem fermentativer Aktinomyzeten abgeleitet werden können.

Tabelle 9a zeigt beispielhaft, wie ein solcher Identifizierungsschlüssel (unter der Prämisse 90-100% positive Testergebnisse „+“, 0-10% positive Testergebnisse „-“ und 11-89% positive Testergebnisse „d“) aussehen könnte.

Tabelle 9a  
**Diagnostische Tabelle**

	A. meyeri	Act. schaalii	A. bovis	Arc. Pyogenes	A. hyovaginalis	A. odontolyticus	A. turicensis	Act. suis	A. funkei	A. marimammalium	Arc. bernardiae	Act. urinale	A. europaeus	Arc. pluranimalium	Arc. haemolyticum	A. neuuii ssp. neuui	A. neuuii ssp. anitratus	A. slackii	A. hordeovulneris
Adonitol	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	d	-	+	-
L-Arabinose	d	+	-	-	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabitol	d	-	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
meso-Erythritol	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-
Fruktose	d	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
L-Fucose	d	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktose	-	-	+	+	+	d	+	-	-	-	+	+	-	-	-	d	+	+	+
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	d	+	+	+
α-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Glycerol	-	-	+	-	d	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Inositol	d	-	+	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Inulin	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktat	d	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Laktose	d	-	+	+	d	d	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	+	+	-	+	-	-	d	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Mannose	d	-	-	-	d	-	d	-	+	-	+	-	-	-	-	d	+	+	+
Maltose	d	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	d	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-
Rhamnose	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	d	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	+	-
Sucrose	+	-	+	-	+	+	+	d	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Trehalose	-	-	+	-	d	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	+
Xylose	+	+	-	+	+	d	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Na-Nitrat	-	-	+	-	d	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	+	+
Harnstoff	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	d	d	+	+
Arginin	-	-	+	+	d	-	d	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Äskulin	-	-	+	+	d	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-



Fortsetzung Tabelle 9a  
**Diagnostische Tabelle**

	A. israelii	A. gerencseriae	A. howellii	A. urogenitalis	A. viscosus	A. naeslundii	A. radidentis	P. propionicum	A. graevenitzii	A. georgiae	Act. massiliae	Arc. phocae
Adonitol	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	+	d	-	+	-	-	-	d	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	-	d	+	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
meso-Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruktose	+	+	+	+	d	d	+	+	-	+	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	d	d	+	d	-	-	-	-
Galaktose	d	d	+	+	+	+	+	d	+	-	-	-
Gentiobiose	+	d	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Glukose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	d	+	+	d	-	+	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inositol	+	d	-	+	d	+	-	-	-	-	-	-
Inulin	d	d	-	-	d	+	+	d	-	-	-	-
Laktat	d	d	+	-	d	d	-	+	+	-	+	-
Laktose	+	d	+	+	d	d	+	d	+	+	-	-
D-Lyxose	+	d	+	+	d	d	-	d	-	-	+	-
Mannitol	+	d	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Mannose	d	+	+	+	d	d	+	d	-	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Melibiose	d	d	+	+	d	+	+	d	-	-	-	-
Melezitose	-	d	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Raffinose	d	d	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Rhamnose	-	d	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	-	+	d	+	+	d	+	-	-	+
Salicin	+	+	+	+	-	d	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Xylose	+	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalase	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Na-Nitrat	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Harnstoff	-	-	-	-	d	d	+	d	-	-	-	-
Arginin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Äskulin	+	+	+	+	d	+	+	-	-	+	+	-

Fortsetzung Tabelle 9a  
**Diagnostische Tabelle**

	A. israelii	A. gerencseriae	A. howellii	A. urogenitalis	A. viscosus	A. naeslundii	A. radidentis	P. propionicum	A. graevenitzii	A. georgiae	Act. massiliae	Arc. phocae
Objektträger-Präparat:												
Kokkoide	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	+	-
Stäbchen	-	-	+	-	d	+	+	+	+	+	-	-
Nicht verzweigt	-	+	-	+	d	-	-	-	-	-	-	+
Verzweigt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fäden	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kolonie makroskopisch:												
≤2mm	+	+	+	-	d	+	-	+	-	-	+	+
Weiß	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Beige	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-
Gelb-orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ungefärbt	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	+
Rau	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Kolonie mikroskopisch:												
Fädig-myzelial	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Durchsichtig	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Undurchsichtig	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Granuliert	-	-	-	+	+	d	+	-	-	-	-	+

#### 4.5. Reliabilitätsprüfung

Der Testfehler  $p$ , hier stellvertretend für die Reliabilität, das heißt die Stabilität der Ergebnisse bei Testwiederholungen, wurde anhand von zehn zufällig ausgewählten Stämmen bestimmt, welche mehrmals hintereinander getestet wurden. Es wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Testplatten bei ein und demselben Stamm nicht aus der gleichen Produktionsreihe stammten, so dass eine mögliche Kontamination nicht als serieller Testfehler maskiert worden ist. Die Tabellen 10 bis 19 geben direkt die absoluten 100%igen Übereinstimmungen wieder.

Tabelle 10  
A. gerencseriae - AL-507 v.CX /97  
Testwiederholungen: 5

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	14	34,1	34,1
1	0	0	34,1
2	1	2,4	36,5
3	2	4,9	41,4
4	5	12,2	53,6
5	19	46,3	99,9
Total:	41	99,9	

Testergebnis immer negativ:	34,10%
Testergebnis immer positiv:	46,30%
<b>Übereinstimmungen insgesamt:</b>	<b>80,40%</b>

Tabelle 11

A. neuii ssp. anitratus - AL-1119 4/99  
Testwiederholungen: 5

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	29	70,7	70,7
1	0	0	70,7
2	0	0	70,7
3	1	2,4	73,1
4	0	0	73,1
5	11	26,8	99,9
Total:	41	99,9	

Testergebnis immer negativ:	70,70%
Testergebnis immer positiv:	26,80%
<b>Übereinstimmungen insgesamt:</b>	<b>97,50%</b>

Tabelle 12  
**A. viscosus - A-82 / LHMC Be 32**  
**Testwiederholungen: 5**

positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	19	46,3	46,3
1	2	4,9	51,2
2	1	2,4	53,6
3	0	0	53,6
4	4	9,8	63,4
5	15	36,6	100
Total:	41	100	

Testergebnis immer negativ: 46,30%  
 Testergebnis immer positiv: 36,60%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 82,90%**

Tabelle 13  
**A. howellii – NCTC-11637**  
**Testwiederholungen: 5**

positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	13	31,7	31,7
1	1	2,4	34,1
2	3	7,3	41,4
3	1	2,4	43,8
4	2	4,9	48,7
5	21	51,2	99,9
Total:	41	99,9	

Testergebnis immer negativ: 31,70%  
 Testergebnis immer positiv: 51,20%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 82,90%**

Tabelle 14  
**A. hordeovulneris - ATCC-35276**  
**Testwiederholungen: 5**

positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	25	60,9	60,9
1	4	9,8	70,7
2	0	0	70,7
3	2	4,9	75,6
4	1	2,4	78
5	9	22	100
Total:	41	100	

Testergebnis immer negativ: 60,90%  
 Testergebnis immer positiv: 22,00%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 82,90%**

Tabelle 15  
**A. slackii - NCTC-11924**  
**Testwiederholungen: 6**

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	26	63,4	63,4
1	0	0	63,4
2	0	0	63,4
3	0	0	63,4
4	0	0	63,4
5	0	0	63,4
6	15	36,6	100
<b>Total:</b>	<b>41</b>	<b>100</b>	

Testergebnis immer negativ: 63,40%  
 Testergebnis immer positiv: 36,60%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 100,00%**

Tabelle 16  
**Actinobaculum suis - ATCC-33145**  
**Testwiederholungen: 5**

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	31	75,7	75,7
1	1	2,4	78,1
2	1	2,4	80,5
3	1	2,4	82,9
4	1	2,4	85,3
5	6	14,7	100
<b>Total:</b>	<b>41</b>	<b>100</b>	

Testergebnis immer negativ: 75,70%  
 Testergebnis immer positiv: 14,70%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 90,40%**

Tabelle 17  
**A. hyovaginalis - ATCC-51368**  
**Testwiederholungen: 5**

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	18	43,9	43,9
1	1	2,4	46,3
2	3	7,3	53,6
3	0	0	53,6
4	1	2,4	56
5	18	43,9	99,9
<b>Total:</b>	<b>41</b>	<b>99,9</b>	

Testergebnis immer negativ: 43,90%  
 Testergebnis immer positiv: 43,90%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 87,80%**

Tabelle 18  
**A. turicensis - DSM-9169**  
**Testwiederholungen: 5**

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	27	65,9	65,9
1	0	0	65,9
2	1	2,4	68,3
3	6	14,6	82,9
4	5	12,2	95,1
5	2	4,9	100
Total:	41	100	

Testergebnis immer negativ: 65,90%  
 Testergebnis immer positiv: 4,90%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 70,80%**

Tabelle 19  
**Propionibacterium propionicum - AI-673 v.CX/97**  
**Testwiederholungen: 5**

Positiv	Frequenz	Prozent	Kumuliert
0	26	63,4	63,4
1	1	2,4	65,8
2	2	4,9	70,7
3	1	2,4	73,1
4	2	4,9	78
5	9	22	100
Total:	41	100	

Testergebnis immer negativ: 63,40%  
 Testergebnis immer positiv: 22,00%  
**Übereinstimmungen insgesamt: 85,40%**

Um auch einzelne Testabweichungen mit zu berücksichtigen, wurden die Ergebnisse in einer Wahrscheinlichkeitsmatrix zusammengestellt (siehe Tabelle 20). Die empirische Varianz  $s^2$  wurde nach der Formel

$$s^2 = 1/(n - 1) \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

ermittelt. Der Testfehler  $p$  wurde mit der Formel

$$p = \frac{1}{2} \cdot (1 - \sqrt{1 - 4 \cdot s^2})$$

berechnet (Sneath und Johnson, 1972).

Tabelle 20  
Berechnung des Testfehlers

	Anzahl der Testabweichungen											Varianz s <sup>2</sup>	
	A. gerencseriae - AL-507 v.CX /97 Testwiederholungen: 5	A. neuii ssp. anitratus - AL-1119/4/98 Testwiederholungen: 5	A. viscosus - A-82 / LHMC Be 32 Testwiederholungen: 5	A. howellii - NCTC-11636 Testwiederholungen: 5	A. hordeovulneris - ATCC-35275 Testwiederholungen: 5	A. slackii - NCTC-11923 Testwiederholungen: 6	Act. suis - ATCC-33144 Testwiederholungen: 5	A. hyovaginalis - ATCC-51367 Testwiederholungen: 5	A. turicensis - DSM-9168 Testwiederholungen: 5	Prop. propionicum - AI-673 v.CX/96 Testwiederholungen: 5			
Adonitol	0	0	0	0	0	100	0	100	80	0		1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0192234	
L-Arabinose	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0		0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Amygdalin	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0		0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D-Arabitol	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0		2	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0376778	
Cellobiose	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0		0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Dextrin	100	0	80	100	20	0	100	100	80	40		5	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0884275	
meso-Erythritol	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0		0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fruktose	100	100	80	100	100	100	60	100	60	100		5	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0884275	
L-Fucose	0	0	100	0	0	0	0	100	60	0		2	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0376778	

Fortsetzung Tabelle 20

Galaktose	100	100	100	100	100	100	0	40	0	40		4
	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0,0722799
Gentiobiase	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukose	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -methyl- D-Glucoside	60	0	0	60	0	0	0	0	0	0		4
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0722799
Glycerol	0	100	40	0	100	100	0	80	0	0		3
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0,0553633
Inositol	80	0	100	40	0	100	0	100	60	0		5
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,0884275
Inulin	80	0	100	0	0	0	0	40	0	0		2
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0,0553633
Laktat	60	0	100	80	80	0	0	100	80	100		5
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,0884275
Laktose	100	0	80	100	20	0	0	0	0	100		2
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,0376778
D-Lyxose	100	0	20	100	0	0	0	20	40	0		4
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0,0722799
Mannitol	100	100	0	0	0	100	0	0	0	80		1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0192234
Mannose	100	100	80	100	100	100	0	100	60	100		3
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0,0553633
Maltose	100	0	100	100	0	0	100	100	60	80		3
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0,0553633
Melibiose	0	0	100	100	20	0	0	0	0	0		1
	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,0192234
Melezitose	80	0	0	100	0	0	0	0	0	0		1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0192234
Raffinose	0	100	100	100	0	0	0	0	0	100		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhamnose	40	0	0	0	0	0	20	0	0	0		4
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0553633

Fortsetzung Tabelle 20

Ribose	100	100	100	40	100	100	100	100	100	0		2
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,0376778	
Salicin	80	0	0	100	0	0	0	100	0	0		1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sorbitol	0	100	0	0	0	100	0	0	0	20		1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0192234	
Sucrose	100	0	100	100	20	0	0	100	80	100		2
	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0,0376778	
Trehalose	80	0	100	80	100	0	0	100	60	100		4
	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,0722799	
Xylose	100	0	0	100	0	0	100	100	80	0		1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,0192234	
Xylitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Katalase	0	100	100	100	100	100	0	0	0	0		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Na-Nitrat	100	0	100	20	100	100	40	100	0	100		4
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,0635331	
Harnstoff	0	0	0	40	60	100	100	0	0	60		6
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0,1038062	
Arginin	100	100	100	100	60	100	0	0	0	0		2
	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0,0376778	
Äskulin	100	60	20	100	0	0	80	100	0	0		4
	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0,0722799	
Kokkoide	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0		0
Stäbchen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nicht	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100		0
verzweigt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Verzweigt	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fäden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<2mm	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	





Bei 2703 Einzelreaktionen im Wiederholungsverfahren der zehn Teststämme aus den Spezies *Actinomyces gerencseriae*, *A. neuii ssp. neuii*, *A. viscosus*, *A. howellii*, *A. hordeovulneris*, *A. slackii*, *Actinobaculum suis*, *Actinomyces hyovaginalis*, *A. turicensis* und *Propionibacterium propionicum* errechnete sich ein Testfehler von 3,0%.

## 5. Diskussion

### 5.1. **Miniaturisierte Testsysteme im Vergleich**

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung eines zuverlässigen Nachfolgesystems zum bisher im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn benutzten Minitek®-System. Das von der Firma BD Microbiology Systems, Baltimore, produzierte Identifizierungssystem für Bakterien prüft mit Hilfe kleiner Papierscheiben, auf denen die Nachweissubstanz aufgebracht ist, zahlreiche physiologische Leistungen der Bakterien. Dieses Verfahren erwies sich als einfach zu handhaben, war zügig durchzuführen und zuverlässig in der Diagnosefindung (Schofield und Schaal, 1979b). Das Minitek®-System wird heute nicht mehr hergestellt.

Die Tendenz der Industrie, immer kleinere Nachweisverfahren zu entwickeln, geht, was die Aktinomyzeten betrifft, sicherlich in die richtige Richtung. Holmberg und Nord (1975) beschrieben die ungünstigen Verhältnisse von Inokulum-Größe, Wachstumsgeschwindigkeit und Nachweissubstrat bei dem von Slack und Gerencser (1975) vorgestellten Makroverfahren. Doch stößt die Miniaturisierung dort an ihre Grenzen, wo es unmöglich wird, eine homogene Bakteriensuspension zu erzeugen, was sich bei einigen *Actinomyces*-Spezies als nicht unproblematisch erweist. Je kleiner die Reaktionskammer, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass kleine, nicht suspendierte Bakterienkonglomerate zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Unter Anwendung miniaturisierter Verfahren legten Schofield und Schaal (1981) einen Meilenstein in der Taxonomie der Aktinomyzeten. Miniaturisierte Systeme schienen das brauchbarste Nachweisverfahren für fermentative Aktinomyzeten darzustellen, doch blieb Minitek® das einzig zuverlässige, kommerzielle Verfahren. Das API 20 Anaerobier-System oder das API 20 Strep-System wiesen eine sehr stark variierende Reproduzierbarkeit und Reliabilität bei der Identifizierung von fermentativen Aktinomyzeten auf (Schaal, 1992b). Das ebenfalls von Schaal geprüfte BioLog®-System der Firma Flow erwies sich als nicht zuverlässig. Die miniaturisierten, von der Firma Merlin hergestellten, Taxa Profile C® und Taxa Profile E® Systeme wurden als nur bedingt einsatzfähig für die klinische Routine eingestuft (Dahlen, 2004) und sind darüber hinaus auch aufgrund der über 300 Nachweisreaktionen extrem zeitaufwändig in der Durchführung, solange sie nicht auf eine praktikable Zahl von notwendigen Reaktionen verkleinert sind.

Aufbau und Ablauf des hier vorgestellten Testsystems sind an eine Vorlage von Schaal (1992) angelehnt: Bei diesem wurde das ursprünglich von Slack und Gerencser (1975) vorgeschlagene Verfahren zum Nachweis fermentativer Aktinomyzeten für konventionelle Mikrotiterplatten modifiziert. Als Basalmedium diente damals eine Thioglycolat-Lösung, die mit 0,2% Hefe-Extrakt angereichert war. Die zu prüfenden Zucker wurden als 3%ige Lösungen auf sterile Filterpapierscheiben (BD) aufgebracht und dann lyophilisiert. Die mit Zuckern imprägnierten Filterpapierscheiben kamen auf den Boden einer Mikrotiterplatte und wurden mit zwei bis drei Tropfen des Basalmediums, in dem die Bakterien suspensiert wurden, betropft. Nach Inkubation für zwei bis drei Tage im Anaerobier-Topf wurde die Säureproduktion durch Auftropfen einer 0,2%igen Bromthymolblau-Lösung nachgewiesen.

Im hier vorliegenden Test wurden die Zucker-imprägnierten Filterpapierscheiben durch sterile Flüssiglösungen der einzelnen Nachweissubstanzen ersetzt. Unter der Vorstellung, dass hierdurch eine bessere Homogenisierung von Testsubstanz und Bakteriensuspension gewährleistet sei, erwartete man auch eine größere Reliabilität im Säurenachweis. Ergänzt wurden die Basalmedien noch durch Zugabe von Tween 80 und Vit. K<sub>1</sub>, um ein besseres Wachstum der Aktinomyzeten zu ermöglichen. Die Nachweissubstanzen wurden nach Analyse der Arbeiten von Schofield und Schaal (1981), Dahlen (2004) und zahlreichen Erstbeschreibungen fakultativ anaerober fermentativer Aktinomyzeten ausgewählt, um möglichst viele Schlüsselreaktionen vertreten zu

haben und auf überflüssige Tests verzichten zu können. Das hier entwickelte Testsystem sollte einfach zu handhaben und schnell durchzuführen sein, die Verlässlichkeit des Minitek®-Systems aufweisen und darüber hinaus im besten Fall auch eine genauere Charakterisierung der Aktinomyzeten ermöglichen.

## **5.2. Probleme dieses Testsystems**

Die Herstellung der einzelnen Testsubstanzen erwies sich als sehr zeitaufwändig. Da die Zucker hitzelabil sind, konnten die Lösungen nicht autoklaviert werden, sondern mussten einzeln per Hand mit Hilfe von Bakterienfiltern sterilisiert werden. Die folgenden Arbeitsschritte mit Beimpfen der Mikrotiterplatten mit den Testsubstanzen und Beschicken der 5ml-Fläschchen mit dem Basalmedium für die Bakteriensuspension wurden etappenweise parallel während der Arbeitsdauer durchgeführt, um nicht mit verunreinigten oder durch Gefrierbrand veränderten Substanzen arbeiten zu müssen. In einem industriell hergestellten, kommerziellen Verfahren könnten diese ersten Arbeitsschritte für den Mikrobiologen entfallen und eine große Zeitersparnis bringen. Übrig bliebe das Suspendieren der Bakterien im Basalmedium und das anschließende Beimpfen der Mikrotiterplatten mit der darauf folgenden Inkubation und Auswertung, was an zeitlichem Aufwand dem Minitek®-System gleich käme.

Das Suspendieren der Bakterien in den Basalmedium-Fläschchen stellt weiterhin eine Hürde in der Testkonstanthaltung dar, da genauestens darauf geachtet werden muss, eine homogene Trübung zu erzielen. Dies lässt sich bei den sehr unterschiedlich wachsenden *Actinomyces*-Spezies nicht immer einfach durchführen. Die Kolonien von *A. israelii* beispielsweise bilden sehr krümelige und harte Konglomerate, die nicht leicht in Suspension zu bringen sind. Erst durch längeres Rühren und vorsichtiges Ausstreichen am Flaschenrand lösen sich die Bröckchen langsam auf. Bei den weich wachsenden Kolonien von *A. naeslundii* ist dies schon durch kurzes Drehen der Impföse in der Suspensionslösung zu erreichen.

Ein nicht zu unterschätzendes Problem stellt auch die Auswertung des Testes dar, die subjektiv auf der Grundlage des Farbumschlags des Indikators zu treffen ist. Eindeutig negative Ergebnisse

(tief grünfarben) und eindeutig positive (hellgelb) sind ohne weiteres dokumentierbar. Schwer wird die Entscheidung bei den Übergangsfarben dunkelgelb bis hellgrün. Hilfreich ist es hier, sich erst einen Überblick über das Gesamtergebnis zu beschaffen. Fehlen dem Testausgang sämtlich die hellgelben positiven Reaktionen, kann man die Schwelle für einen positiven Reaktionsausfall eher ins Grüne verlagern. Dabei ist die Orientierung an dem Reaktionsausgang von Glukose, der ja bei diesen Bakterien positiv sein muss, im Vergleich zur Leerkontrolle hilfreich.

Die wohl größte Gefahr fehlerhafter Ergebnisse besteht in bakteriellen Verunreinigungen. Und da hier mit nährstoffreichen Flüssigkeiten und Basalmedien gearbeitet wird, ist die Gefahr einer mikrobiellen Kontamination besonders groß. Kontrollen, bei denen die Nachweissubstanzen ohne Bakteriensuspension dem Testverfahren unterzogen wurden, lieferten aber während der ganzen Arbeitsdauer negative Ergebnisse für Verunreinigungen. Die Basalmedien wurden öfter neu angemischt und anschließend autoklaviert, so dass auch hier Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten.

Teilweise ist es nicht einfach, aus angezüchteten Aktinomyzetenkulturen eine ausreichende Trübung des Basalmediums zu erreichen. Von *A.-naeslundii*- oder *A.-viscosus*-Kolonien reicht es aus, je zwei Brain-Heart-Infusion-Platten angelegt zu haben, um eine ausreichende Gesamtmenge zu erzielen. Dasselbe gilt für die meisten anderen Aktinomyzeten einschließlich der wichtigen Krankheitserreger *A. israelii*, *A. gerencseriae* und *Propionibacterium propionicum*. Problematischer ist es bei den neueren beschriebenen Spezies, wie z.B. *Arcanobacterium phocae*, *Actinomyces suimastitidis* oder *Actinobaculum massiliae*. Diese bilden auch nach zehn Tagen Bebrütung so dünne Kolonien, dass es schwer ist, auch mit sechs angelegten BHI-Platten eine ausreichende Trübung zu erzielen. Je mehr Platten allerdings abgeimpft werden müssen, desto höher ist auch die Gefahr der Verunreinigung.

### **5.3. Testausfälle**

Nach Abschluss des praktischen Teils der Arbeit fiel auf, dass einige Testsubstanzen durchweg negative oder nur in einzelnen Fällen positive Ergebnisse zeigten. Zu diesen zählte Dulcitol (2 positiv/150), D-Fukose (0 positiv/150),  $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside (1 positiv/150), Sorbose (1 positiv/150), D-Tagatose (1 positiv/150) und Na-Nitrit (3 positiv/150). Diese Substanzen wurden in der Clusteranalyse nicht berücksichtigt und wurden auch in der Wahrscheinlichkeitsmatrix nicht mit aufgeführt.

Es muss entweder davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Substanzen um tatsächlich nicht für die Aktinomyzetendifferenzierung geeignete Stoffe handelt oder dass bei der Zusammenstellung der Testmedien ein Fehler unterlaufen ist, der zu einer Nicht-Verstoffwechslung der Substanzen führte. Möglich kann auch eine zeitabhängige chemische Zerstörung der Testsubstanzen sein, wie es bei Pentosen bekannt ist. Zu klären wäre die Frage, ob diese Testsubstanzen nur bei Aktinomyzeten einen negativen Testausgang bewirken und somit dazu beitragen könnten, Aktinomyzeten von anderen Gattungen zu unterscheiden.

Aufgrund des Unvermögens, eine ausreichend dichte Bakteriensuspension zu erzielen, konnten beim Test von *A. suimastitidis* nur negative Kohlenhydratverstoffwechslungen aufgezeichnet werden. Die Spezies wurde deshalb nicht in der Clusteranalyse aufgeführt. Ähnliche Probleme, eine ausreichende Trübung zu erzielen, wiesen die Spezies *Actinobaculum massiliae*, *Arcanobacterium phocae* und *A.-haemolyticum* auf. Da hier aber immer noch einige deutlich positive Reaktionsausgänge zu verzeichnen waren, wurden diese Spezies mit in die Auswertung einbezogen.

### **5.4. Bedeutung der Ergebnisse**

Sowohl die Ergebnisse der Clusteranalyse, die Prüfung der Reliabilität durch Bestimmung des Testfehlers mit Wiederholungstests und die Prüfung der Validität belegen, dass das hier

vorgestellte Verfahren eine mögliche Alternative zum Minitek®-System darstellt. Der Testfehler lag mit 3,0% im tolerablen Bereich und die Clusteranalyse ließ eine Aufteilung in spezies-spezifische Cluster zu.

#### **5.4.1. Die Koeffizienten der Clusteranalyse**

Zur Auswertung der Clusteranalyse wurden zwei Koeffizienten herangezogen: Der Jaccard- und der  $S_{SM}$ -Koeffizient; beide unter Verwendung des Average Linkage Clustering Verfahrens. Der Jaccard-Koeffizient berücksichtigt in der Auswertung nur die Übereinstimmungen in positiven Ergebnissen, während beim  $S_{SM}$ -Koeffizienten sowohl positive als auch negative Testübereinstimmungen in die Auswertung mit einbezogen werden.

Eine Fehlerquelle beim hier vorgestellten Testsystem, die vor allem auf das Wachstumsverhalten der Aktinomyzeten zurückzuführen ist, liegt in einem Nicht-Verstoffwechseln einer Testsubstanz, die eigentlich umgesetzt werden sollte (siehe 5.4.3.: falsch-negative Ergebnisse: 7%). Dieses Problem, dass vor allem bei einer Konglomeratbildung in der Reaktionskammer bei nicht ausreichender Homogenisierung der Bakteriensuspension geschehen kann, tritt bei sämtlichen miniaturisierten Verfahren auf. Es kommt weit häufiger vor als die falsch-positiven Ergebnisse, die mit einer Häufigkeit von 2,54% wesentlich seltener sind.

Falsch-positive Ergebnisse entstehen vor allem durch mikrobielle Kontamination, sei es nur einer einzelnen Reaktionskammer, oder der ganzen Bakteriensuspension. Mit Dendrogramm Nr. 4 konnte gezeigt werden, dass die ausschließliche Berücksichtigung übereinstimmend positiver Reaktionsausfälle zu einem sehr guten Ergebnis führt. Die Dendrogramme Nr. 2a und Nr. 2b, unter Verwendung des  $S_{SM}$ -Koeffizienten angefertigt, zeigen ein nicht so exaktes Clusterungsergebnis. Dies lässt sich durch die Berücksichtigung negativer Übereinstimmungen erklären. Dennoch ist auch hier, bis auf wenige Ausnahmen, eine clusterspezifische Aufteilung bis auf Speziesebene möglich.

### 5.4.2. Bedeutung der morphologischen Merkmale

Die sechs angefertigten Dendrogramme besitzen nicht alle die gleiche Aussagekraft wie das zur Demonstration der Wahrscheinlichkeitsmatrix herangezogene Dendrogramm Nr. 4. Deutlich konnte demonstriert werden, wie wichtig die wenigen Daten zur Morphologie für die Charakterisierung bis auf Speziesebene sind. Die Dendrogramme Nr. 1a, Nr. 1b und Nr. 3 wurden ohne, die Dendrogramme Nr. 2a, Nr. 2b und Nr. 4 mit Zuhilfenahme der morphologischen Ergebnisse angefertigt. Wie erwartet fielen die Ergebnisse bei Nr. 1a, Nr. 1b und Nr. 3 erkennbar schlechter aus.

Beim Dendrogramm Nr. 3 musste die Cluster-Trennlinie schon bei RDCC 8,9 gesetzt werden, um nicht zu große und undefinierte Cluster zu erhalten. Trotzdem befindet sich beispielsweise der *A.-israelii*-Stamm AL-357/00 als Single Member Cluster am nächsten an dem *A.-hyovaginalis*-Hauptcluster 11. Am *A.-israelii/gerencseriae*-Hauptcluster 19 befindet sich der *A. urogenitalis* – DSM 15434 und der *A. neuui ssp. neuui* – D-1616 wird mit dem *A. hordeovulneris* – ATCC-35275 zum Cluster 29 zusammengefasst.

Werden nun, wie im Dendrogramm Nr. 4, die 14 morphologischen Merkmale in die Auswertung mit einbezogen, werden alle diese Ausreißer in eine geordnetere, den taxonomischen Gegebenheiten entsprechendere, Aufreihung geführt. Der *A.-israelii*-Stamm AL-357/00 befindet sich nun im *A.-israelii*-Hauptcluster 20, dem *A. urogenitalis* – DSM 15434 wird ein eigenes Cluster 22 zugeteilt und *A. hordeovulneris* – ATCC-35275 bekommt ein eigenes Cluster 19.

Ähnlich verhält es sich bei den beiden ersten Dendrogrammen: Im Dendrogramm Nr. 1a sind die *A.-meyeri*-Teststämme beispielsweise über die Cluster 1, 7 und 10 verteilt, der *P. propionicum* AI-673/96 bildet zusammen mit einem *A. georgiae* das Cluster 16 und die *A.-israelii/gerencseriae*-Teststämme sind über vier benachbarte Cluster verteilt.

Unter Berücksichtigung der morphologischen Merkmale (Dendrogramm Nr. 2a) werden alle *A. meyeri* in Cluster 1 zusammengefasst, *P. propionicum* - AI-673/96 wird in das *Propionibacterium*-Hauptcluster 18 einsortiert und die *A.-israelii/gerencseriae*-Stämme finden sich in nur noch zwei Clustern wieder.

### 5.4.3. Auswertung der Dendrogramme

Betrachtet man nun die drei Dendrogramme Nr. 2a, Nr. 2b und Nr. 4 (alle inklusive der morphologischen Merkmale) näher, fällt zum einen auf, dass die Trennlinie beim Dendrogramm Nr. 4 später gesetzt werden konnte (bei 12,5 im Gegensatz zu 11,5 beim Dendrogramm Nr. 2a bzw. 10,5 bei Dendrogramm Nr. 2b). Es entstand eine optimale Anzahl an Clustern (30 im Vergleich zu 26 im Dendrogramm Nr. 2a bzw. 35 im Dendrogramm Nr. 2b), was die für diesen Test bestmögliche Gruppenbildung darstellte. Die Erklärung liegt in der Verwendung des Jaccard-Koeffizienten, der negative Testübereinstimmungen vernachlässigt. Wenn man durch sauberes Arbeiten und strenge Kontrollen die Gefahr einer Verunreinigung ausschließt, können nur noch falsch-negative Testergebnisse die Auswertung negativ beeinflussen. Diese können durch zu dünne Beimpfung der Nachweiskammer entstehen, oder durch ungenügende Homogenisierung der Bakteriensuspension. Solche negativen Testausgänge fließen aber beim  $S_{SM}$ -Koeffizienten (Dendrogramme Nr. 2a und Nr. 2b) mit in die Wertung ein, wenn sie zu falschen Übereinstimmungen führen, und tragen so zu dem schlechteren Auftrennungsergebnis in diesen Dendrogrammen bei.

Dendrogramm Nr. 4 zeigt in beeindruckender Weise die Clusterung der 31 verschiedenen Spezies in 30 unterschiedliche Cluster. Das Cluster 20, welches sämtliche *A.-israelii*- und *A. gerencseriae*-Stämme enthält, ließ sich zwar in vier Untergruppen aufteilen, doch gelang es nicht, die beiden Spezies klar voneinander zu trennen. Die beiden *A.-gerencseriae*-Cluster 20 B und 20 C werden von den *A.-israelii*-Clustern 20 A und 20 D umgeben. Dies liegt zum einen an der singulären Schlüsselreaktion L-Arabinose, die bei allen getesteten *A.-gerencseriae*-Stämmen negativ ausfiel. Zum anderen kann dies dadurch erklärt werden, dass das Subcluster 20 D *A.-israelii*-Stämme enthält, die insgesamt einen schwächeren positiven Reaktionsausgang zeigten, als die anderen in Cluster 20 A. Dies wiederum lässt sich auf die schwierige Homogenisierbarkeit der *A.-israelii*-Stämme im Suspensionsmedium zurückführen.

Alle im Cluster 20 D (Dendrogramm Nr. 4) subsumierten Teststämme bilden im Dendrogramm Nr. 2a ein eigenes Cluster 23. Wie schon erwähnt, handelt es sich vermutlich um schlechter gewachsene *A.-israelii*-Stämme als die anderen. Somit kommen falsch-negative Ergebnisse mehr

zum Tragen, werden im Dendrogramm Nr. 2a mitberücksichtigt und führen zu einer separaten Clusterbildung (siehe aber auch weiter unten).

Wenn nun die Clusteranalyse anscheinend die beiden Spezies *A. israelii* und *A. gerencseriae* nicht auseinander halten kann, so lassen sie sich für den Untersucher doch per definitionem sicher anhand der Schlüsselreaktion L-Arabinose trennen. Da ein einzelner Wert bei der computergestützten Clusteranalyse aber im Gesamtbild nicht so stark auffällt, resultiert hieraus die Ungenauigkeit in der Diskriminierung zwischen diesen beiden Spezies.

Es gibt aber auch Anzeichen dafür, dass die beiden Spezies *A. israelii* und *A. gerencseriae* noch immer heterogen sind: Dafür spricht eine gewisse serologische Heterogenität, und auch die bisherigen 16S rDNA-Sequenzdaten zeigen keine besondere Homogenität dieser Spezies. Hier sind deshalb weitere physiologische, morphologische und phylogenetische Untersuchungen erforderlich, um eine endgültige Klärung der taxonomischen Struktur dieser Gruppe fermentativer Aktinomyzeten zu erreichen.

#### **5.4.4. Reliabilität und Validität**

Um die Stabilität der Ergebnisse bei wiederholter Testdurchführung zu überprüfen, wurden zehn zufällig ausgewählte Teststämme mehrmals hintereinander getestet. Das Ergebnis, welches in 4.5. ausführlich dokumentiert ist, belegt eindeutig, dass mit einer Fehlerquote von 3,0% eine Zuverlässigkeit vorliegt, auf die man sich aus wissenschaftlicher Sicht verlassen kann.

Um die Validität des Testsystems zu demonstrieren, wurden exemplarisch einige bekannte Referenzdaten zu den physiologischen Leistungen der fermentativen Aktinomyzeten direkt auf die erhobenen Daten der Wahrscheinlichkeitsmatrix (Tabelle 9) projiziert. Bis auf wenige Ausnahmen lässt sich klar erkennen, dass die mit dem hier vorgestellten Testsystem gewonnenen Daten mit den Referenzwerten übereinstimmen.

Die falsch-positiven Ergebnisse, die als schwerwiegendere Probleme anzusehen sind, liegen mit 2,54% weit im Bereich des Tolerablen und belegen für sich alleine genommen schon die Zuverlässigkeit des Testsystems.

Die falsch-negativen Ergebnisse, die mit 7% hoch erscheinen, müssen aber unter dem Gesichtspunkt betrachtet werden, dass diese Ergebnisse durch ein schlechteres Bakterienwachstum verschiedensten Ursprungs hervorgerufen worden sein können. Eine Konglomeratbildung in der Reaktionskammer, eine zu hohe Sauerstoffkonzentration während der Testzeit durch Sauerstoffeinschluß in den Mikrotiterplatten oder zu dünne Beimpfung können mögliche Ursachen darstellen. Die Ergebnisse spiegeln also nicht in jedem Fall ein nicht funktionierendes Testsystem wieder, sondern zeigen ein weiteres Mal die diffizile Handhabung der Aktinomyzeten auf. Die falsch-negativen Ergebnisse sollten aus diesem Grund in der Bewertung des Testsystems eine nicht zu große Rolle spielen, sondern nur im Vergleich mit anderen Systemen, die die selben Problemfelder aufweisen, betrachtet werden.

#### 5.4.5. Diagnostische Tabelle

Basierend auf der Auswertung von Tabelle 9 (siehe 4.4.) wurde eine Diagnostische Tabelle entwickelt (Tabelle 9a), welche es ermöglicht, anhand der drei Kriterien „+ / - /d“ zwischen verschiedenen Spezies zu unterscheiden. Identifizierungsschlüssel in dieser Art sind von großer praktikabler Bedeutung für die tägliche mikrobiologische Arbeit. Positive und negative Reaktionsergebnisse verschiedener Spezies liegen nebeneinander und können so im direkten Vergleich zum Ergebnis führen.

Testausgänge, die in  $\geq 90\%$  positiv verliefen („+“), lassen sich einfach von Testausgängen, welche in  $\leq 10\%$  positiv verliefen („-“), unterscheiden. Schlüsselreaktionen, wie zum Beispiel L-Arabinose zur Differenzierung zwischen *A. israelii* und *A. gerencseriae*, können in dieser Tabelle ebenso wiedergefunden werden, wie auch die vielen „d“-Testausgänge, die einer positiven Reaktion in 11-89% entsprechen. Da es sich nicht um konstant positive (oder negative) Ergebnisse handelt, sind sie in der Praxis zur Speziesdiagnostik von zweitrangiger Bedeutung. Zu

bestehenden Diagnostiktabellen bietet die hier entwickelte Tabelle eine umfangreiche Ergänzung, nicht zuletzt deshalb, da oft neuere Spezies in den Auflistungen fehlen oder nicht so umfangreich getestet wurden.

#### **5.4.6. Ausblicke**

Das hier vorgestellte Testverfahren zählt offensichtlich zu den besten und sichersten routinemäßig einsetzbaren Systemen zur Aktinomyzetendiagnostik. Die globale Vernachlässigung der Aktinomykosen und deren Erreger, der Aktinomyzeten, und der Drang, Forschungsgelder für molekularbiologische Identifizierungsverfahren zu investieren, haben dazu geführt, dass heute kein vergleichbar sicheres, routinemäßig einsetzbares Identifizierungssystem für Aktinomyzeten auf dem Markt ist.

Die im Rahmen dieser Dissertation erarbeitete Methodik zum Aufbau und Ablauf des Testverfahrens stellt eine große zeitliche Inanspruchnahme von medizinischem Personal dar, wenn sämtliche Arbeitsschritte durchlaufen werden müssen. Es wäre wünschenswert, wenn die Herstellung der Testsubstanzen und die Befüllung der Mikrotiterplatten mit diesen in einem industriellen Verfahren durchgeführt würden. Tiefgefroren oder gegebenenfalls lyophilisiert sollten diese kommerziell erwerblich sein und im Lieferumfang des Weiteren fertige Fläschchen für die Bakteriensuspension enthalten.

Die Diagnostik der fermentativen Aktinomyzeten stellt schon von vorn herein ein schwieriges Problem in der mikrobiologischen Diagnostik dar. Weiterhin wird es Spezialisten bzw. spezialisierten Zentren vorbehalten sein, Aktinomyzetendiagnostik zu betreiben. Die hohen Anforderungen an Nährmedien, Sauerstoff- und CO<sub>2</sub>-Sättigung, die langsame Wachstumsgeschwindigkeit und die große Gefahr der Verunreinigung bilden nur die ersten Hürden auf dem Weg der Diagnosesicherung. Ist die erfolgreiche Isolierung einer Reinkultur aber gelungen, kann mit dem hier präsentierten Testsystem eine sichere Speziesdiagnostik innerhalb von zwei bis neun Tagen erfolgen.

## 6. Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigte sich mit der Weiterentwicklung eines für die Aktinomyzetendiagnostik einsetzbaren Testverfahrens. In Eigenarbeit wurde ein System entwickelt, welches auf miniaturisierter Verfahrensweise, ähnlich dem Minitek®-System, eine Aktinomyzetendiagnostik bis auf Speziesebene erlaubt.

Das Testsystem verfügt über 46 Nachweisreaktionen, welche als flüssige Reagenzien für den Test zur Verfügung stehen. Zu diesen Reaktionen zählen im Einzelnen die Säureproduktion aus 39 Kohlenhydraten, Nitrat- und Nitritreduktion, Harnstoff- Arginin- und Äskulinverstoffwechslung, Indol- und Katalasenachweis. Die Testsubstanzen werden zweiprozentig angemischt und in einer Menge von je 125µl in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gefüllt.

Der Test beginnt mit der Anzüchtung einer ausreichenden Menge an Bakterien, welche in einem flüssige Thioglycolat-Lösung enthaltenden Fläschchen suspendiert werden, bis eine gleichmäßige Trübung entsteht. Die Bakteriensuspension wird im Verhältnis 1:1 (Gesamtmenge 250µl) in die Reaktionskammern der mit Nachweissubstanzen bestückten Mikrotiterplatte gefüllt und 48 Stunden bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Auswertung erfolgt optisch an Hand des Farbumschlags nach Zugabe von entsprechenden Indikatorlösungen. Die Durchführungsdauer beläuft sich nach Erhalt einer Reinkultur auf zwei bis neun Tage, welche die Bakterienakquirierung (bis zu sieben Tage) und Testinkubation (zwei Tage) mit einschließen.

Ergänzt wird die Aussagekraft der Ergebnisse durch die Einbeziehung morphologischer Merkmale, welche in der mikrobiologischen Aktinomyzeten-Diagnostik – ganz gleich welches Verfahren angewandt wird – in jedem Fall erfolgen sollte.

87 verschiedene Teststämme aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn kamen bei der Testprüfung zum Einsatz. Sie bildeten in ihrer Gesamtheit eine speziesübergreifende, repräsentative Auswahl der verschiedensten Aktinomyzeten.

Durch Clusteranalyse wurden die Ergebnisse ausgewertet und die gewonnenen Daten in Form von Dendrogrammen bildlich dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Dendrogrammen mit - beziehungsweise ohne - Berücksichtigung morphologischer Merkmale belegten die Wichtigkeit dieser einfach zu gewinnenden Daten. Auch unter Koeffizientenwechsel konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, bis auf Speziesebene zu differenzieren.

Die Reliabilität, durch Wiederholung zufällig ausgesuchter Teststämme errechnet, wies einen Testfehler von 3,0% auf. Die Validität der Ergebnisse wurde durch Vergleich mit bestehenden Referenzwerten bestimmt und eine falsch-positiv Quote von 2,54% bestimmt.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die Zielsetzungen als erfolgreich herausstellten. Zum einen erwies sich die Differenzierungsgenauigkeit des Testsystems als hoch genug, zum anderen waren Durchführungsdauer und Handhabung mit dem Minitex®-System vergleichbar und deshalb äquivalent routinemäßig einsetzbar.

Wünschenswert wäre ein industrielles Verfahren, welches die Herstellung der Testsubstanzen und die Befüllung der Mikrotiterplatten mit diesen einschließt. Tiefgefroren oder gegebenenfalls lyophilisiert sollten diese kommerziell erwerblich sein und im Lieferumfang des Weiteren fertige Fläschchen für die Bakterensuspension enthalten.

## 7. Tabellenanhang

Im Folgenden werden die Dendrogramme Nr.1-4 vorgestellt. Da die genaue Stammidentifizierung wegen einer eingeschränkten Darstellungsbreite des „Case Label“ nur anhand der „Case Num“ möglich ist, werden die einem bestimmten Bakterienstamm zugeordneten Nummern in Tabelle 21 aufgelistet.

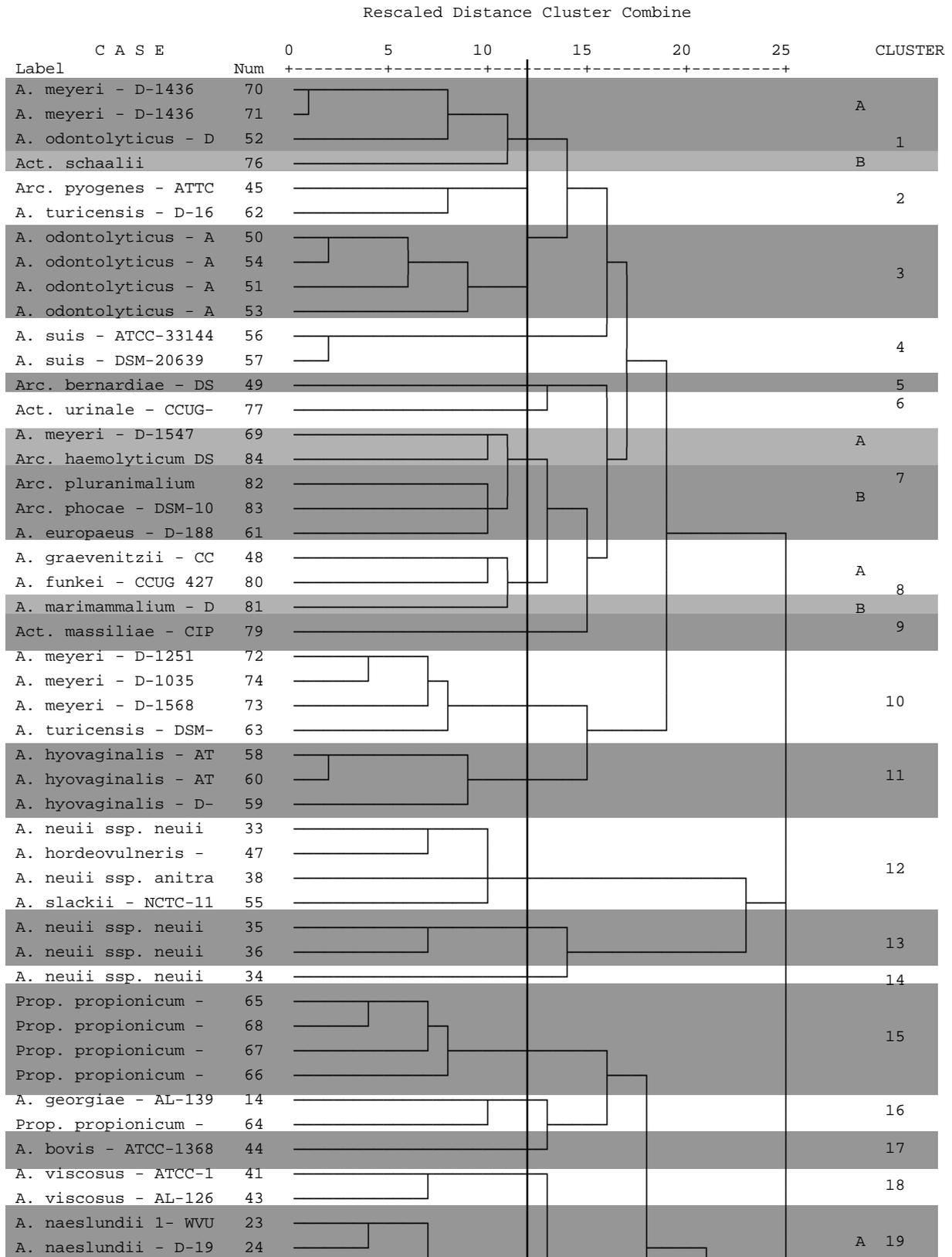
Tabelle 21  
Im Dendrogramm verwendete Stamm-Nummern

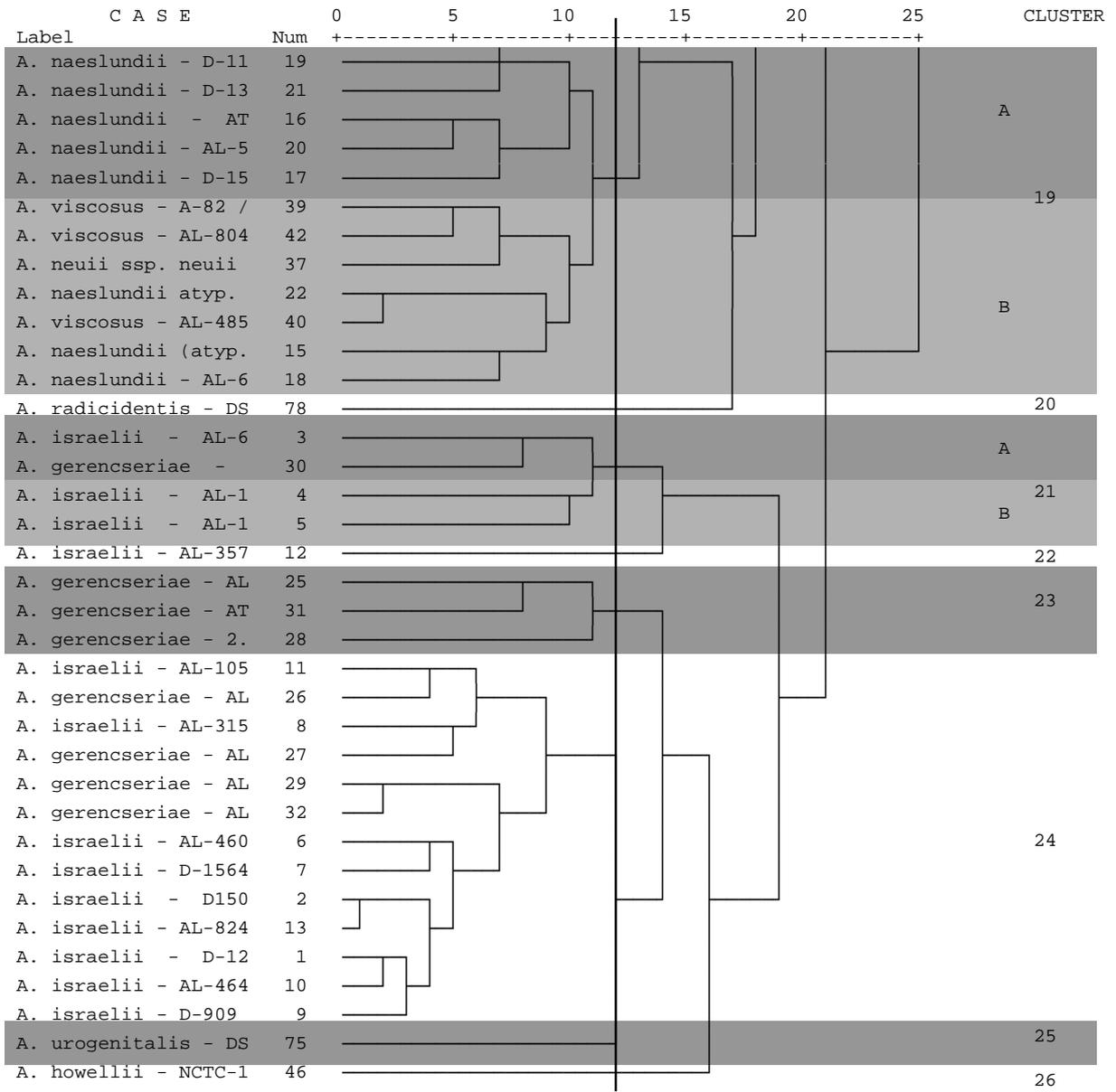
1	<i>A. israelii</i>	IMMIB D-1231	43	<i>A. viscosus</i>	IMMIB AL-1267 (99)
2	<i>A. israelii</i>	IMMIB D-1501	44	<i>A. bovis</i>	ATCC-13683
3	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-640 (97)	45	<i>Arc. pyogenes</i>	ATCC-19411
4	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-181'1 /97	46	<i>A. howellii</i>	NCTC-11636
5	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-174 '3 (3/94)	47	<i>A. hordeovulneris</i>	ATCC-35275
6	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-460	48	<i>A. graevenitzii</i>	CCUG-27294
7	<i>A. israelii</i>	IMMIB D-1564	49	<i>Arc. bernardiae</i>	DSMZ-9152
8	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-315 II/97	50	<i>A. odontolyticus</i>	IMMIB AL-305 /04
9	<i>A. israelii</i>	IMMIB D-909	51	<i>A. odontolyticus</i>	IMMIB AL-355'1 (96)
10	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-464 (5/97)	52	<i>A. odontolyticus</i>	IMMIB D-1244
11	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-105 /99	53	<i>A. odontolyticus</i>	IMMIB AL-557(00)
12	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-357/00	54	<i>A. odontolyticus</i>	ATCC-17929
13	<i>A. israelii</i>	IMMIB AL-824 I (1/97)	55	<i>A. slackii</i>	NCTC-11923
14	<i>A. georgiae</i>	IMMIB AL-1394 I/95	56	<i>Act. suis</i>	ATCC-33144
15	<i>A. naeslundii</i> (atyp.)	IMMIB AL-131 (97)	57	<i>Act. suis</i>	DSMZ-20639
16	<i>A. naeslundii</i>	ATCC-12104	58	<i>A. hyovaginalis</i>	DSMZ-10695
17	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB D-1531	59	<i>A. hyovaginalis</i>	IMMIB D-1263
18	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB AL-679 (96)	60	<i>A. hyovaginalis</i>	ATCC-51367
19	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB D-1197	61	<i>A. europaeus</i>	IMMIB D-1886
20	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB AL-535 v. CC/96	62	<i>A. turicensis</i>	IMMIB D-1678
21	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB D-1320	63	<i>A. turicensis</i>	DSMZ 9168
22	<i>A. naeslundii</i> (atyp.)	IMMIB AL-157 /93	64	<i>Prop. propionicum</i>	IMMIB AL-673(96)
23	<i>A. naeslundii</i>	WVU 398 (A-62)	65	<i>Prop. propionicum</i>	IMMIB D-1385
24	<i>A. naeslundii</i>	IMMIB D-1980	66	<i>Prop. propionicum</i>	IMMIB D-1735
25	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-837 (97)	67	<i>Prop. propionicum</i>	IMMIB AL-117 (00)
26	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-363 (kl./97)	68	<i>Prop. propionicum</i>	IMMIB D-1976
27	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-507 v. CX/97	69	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1547
28	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-749 II'6(97)	70	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1436 (Hutform)
29	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-234 (I/97)	71	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1436 (Kuppelf.)
30	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB D-1470	72	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1251
31	<i>A. gerencseriae</i>	ATCC-23860	73	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1568
32	<i>A. gerencseriae</i>	IMMIB AL-304 (97)	74	<i>A. meyeri</i>	IMMIB D-1035
33	<i>A. neuii</i> ssp. <i>neuui</i>	IMMIB D-1616	75	<i>A. urogenitalis</i>	DSMZ-15434
34	<i>A. neuii</i> ssp. <i>neuui</i>	DSMZ-8576	76	<i>Act. schaalii</i>	CCUG-27420
35	<i>A. neuii</i> ssp. <i>neuui</i>	IMMIB D-1311	77	<i>Act. urinale</i>	CCUG-46093
36	<i>A. neuii</i> ssp. <i>neuui</i>	IMMIB D-1572	78	<i>A. radidentis</i>	DSMZ-15433
37	<i>A. neuii</i> ssp. <i>neuui</i>	IMMIB AL-1132 II/94	79	<i>Act. massiliae</i>	CIP - 107404
38	<i>A. neuii</i> ssp. <i>anitratu</i> s	IMMIB AL-1119 (98)	80	<i>A. funkei</i>	CCUG-42773
39	<i>A. viscosus</i>	LHMC Be 32 (A-82)	81	<i>A. marimammalium</i>	DSMZ-15383
40	<i>A. viscosus</i>	IMMIB AL-485'3 (3/95)	82	<i>Arc. pluranimalium</i>	CCUG-42575
41	<i>A. viscosus</i>	ATCC-15987	83	<i>Arc. phocae</i>	DSMZ-10004
42	<i>A. viscosus</i>	IMMIB AL-804'1 (1/97)	84	<i>Arc. haemolyticum</i>	DSMZ-20595

### 7.1. Dendrogramm Nr.1a Simple-Matching-Koeffizient

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 11,5 RDCC

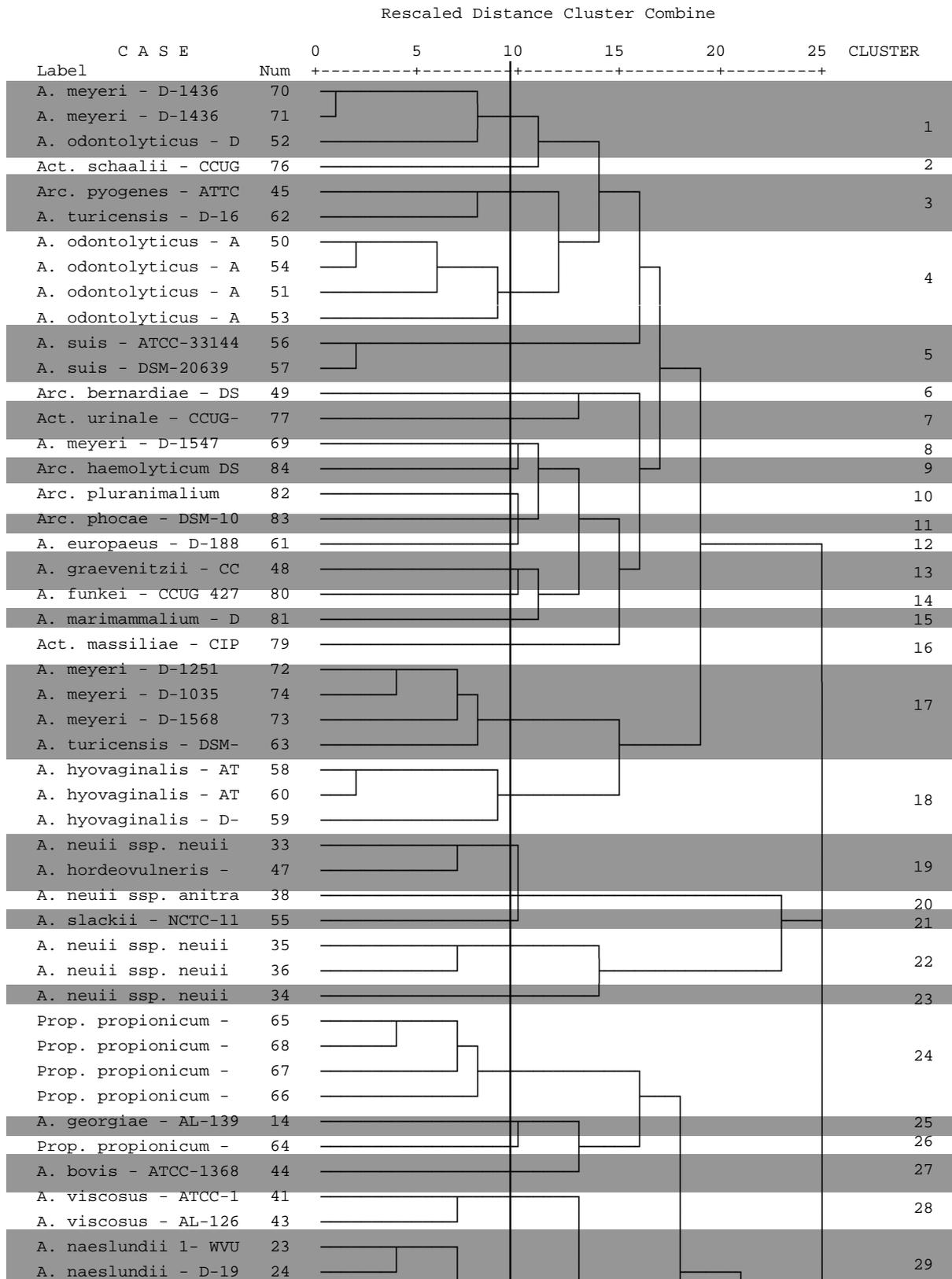


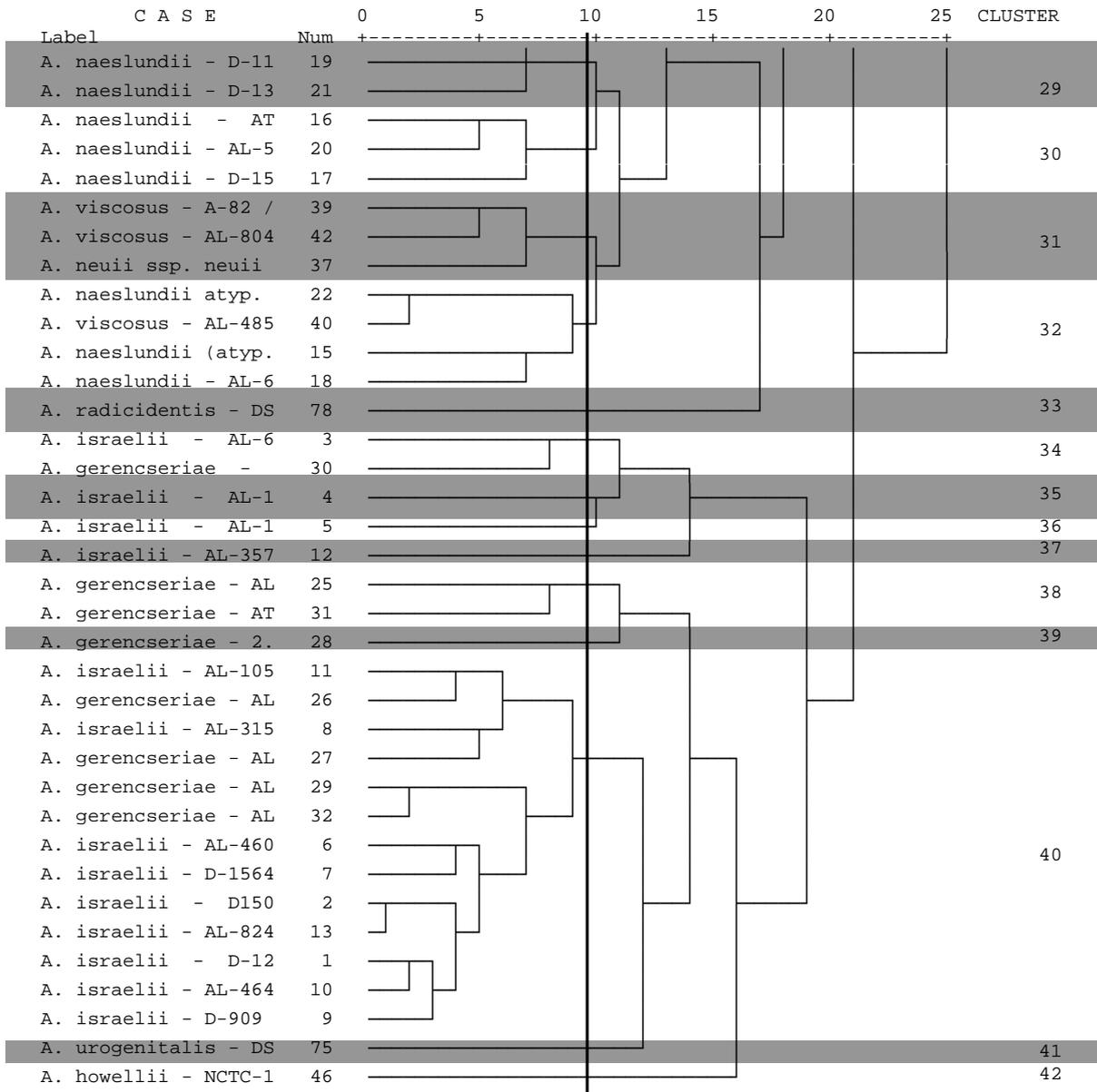


## 7.2. Dendrogramm Nr.1b *Simple-Matching-Koeffizient*

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 9,9 RDCC

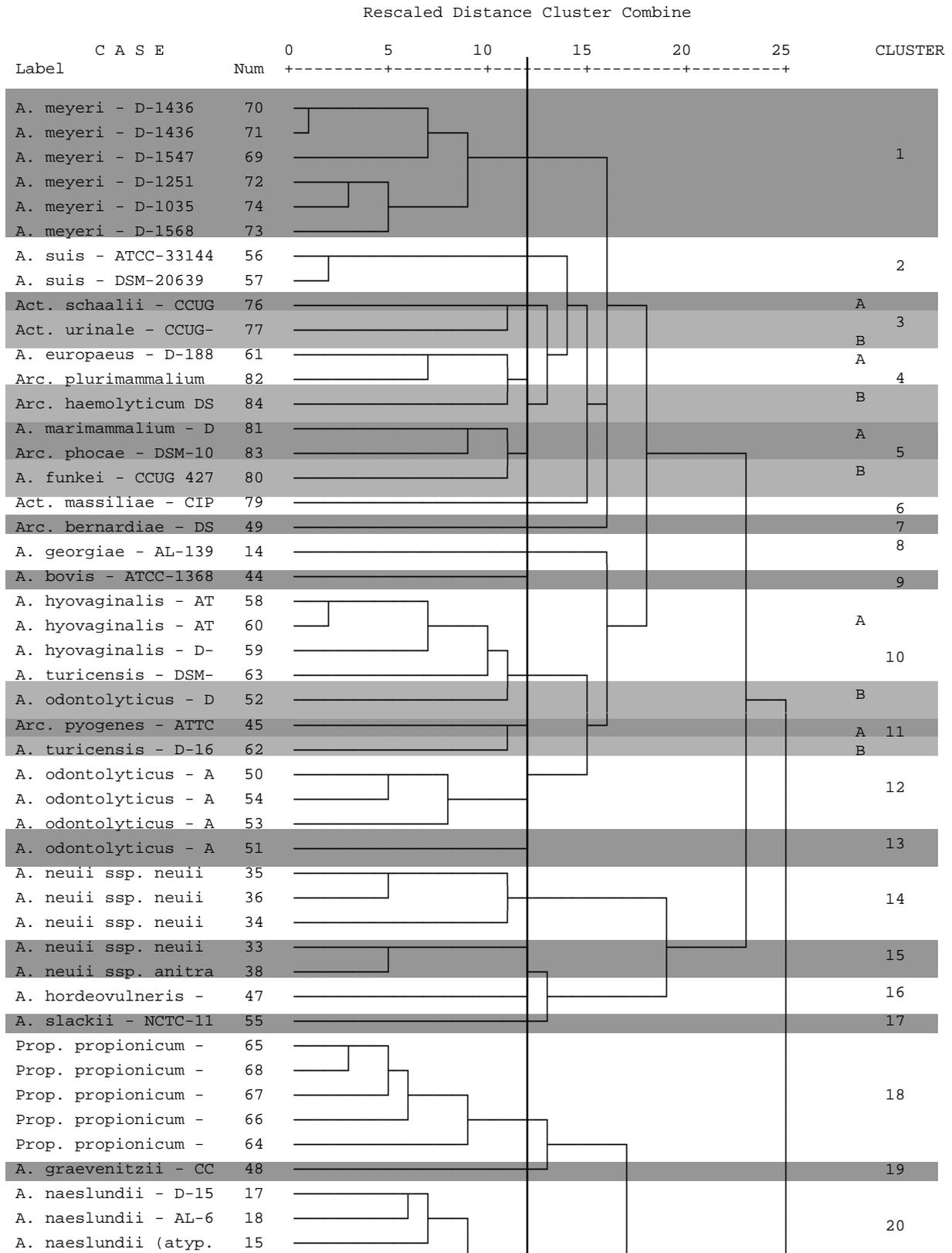


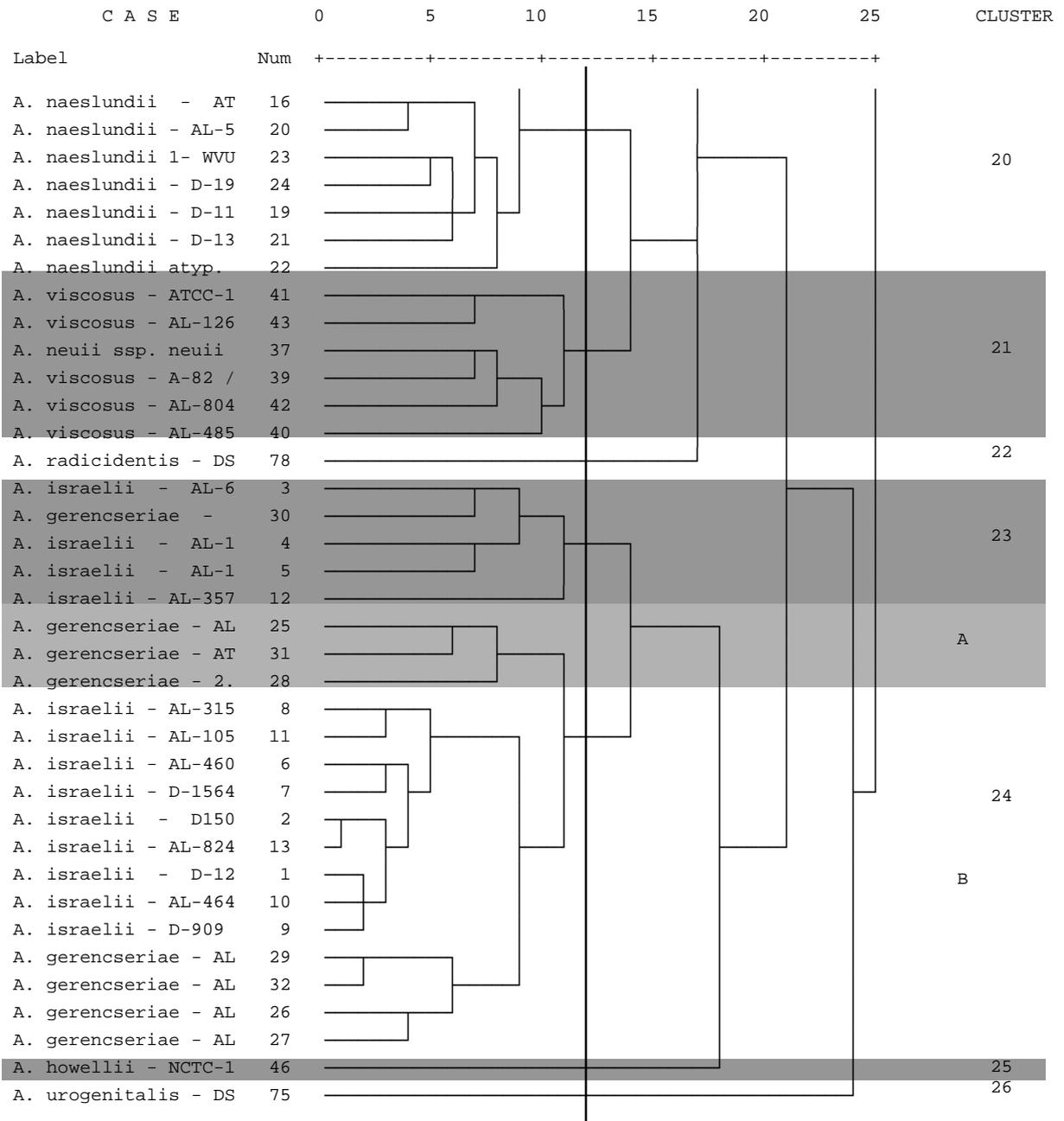


### 7.3. Dendrogramm Nr.2a Simple-Matching-Koeffizient

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 11,5 RDCC

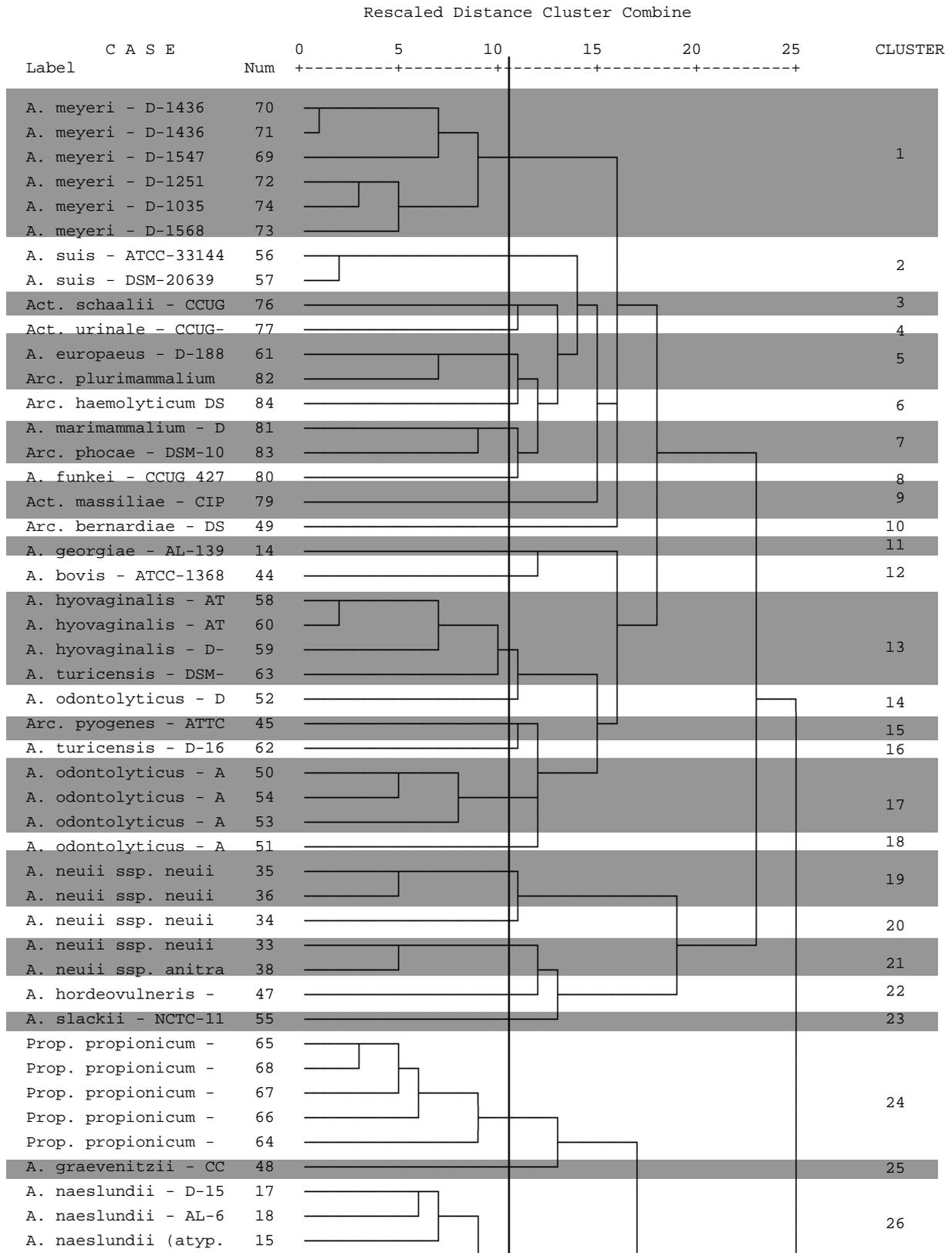


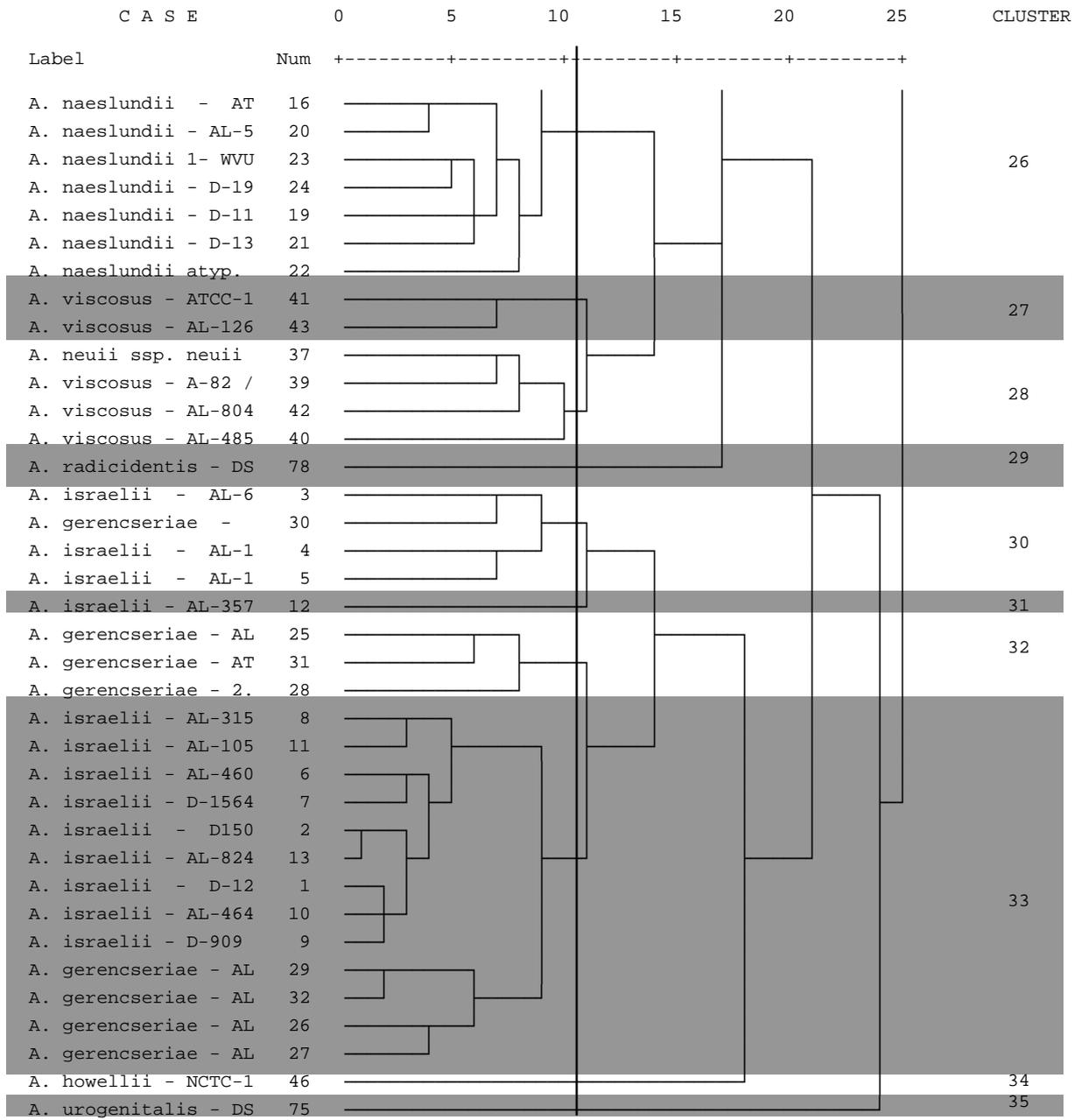


### 7.4. Dendrogramm Nr.2b *Simple-Matching-Koeffizient*

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 10,5 RDCC



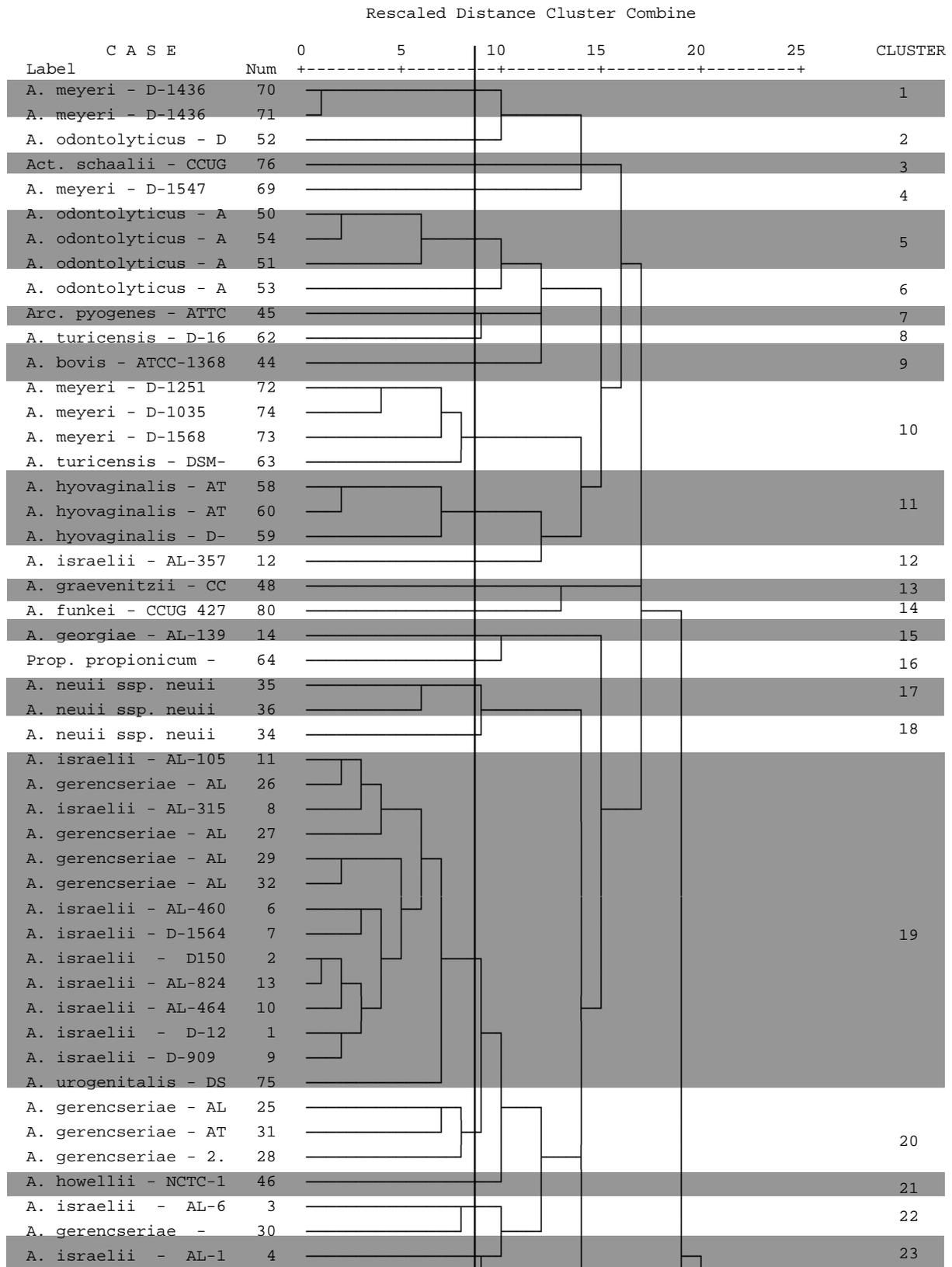


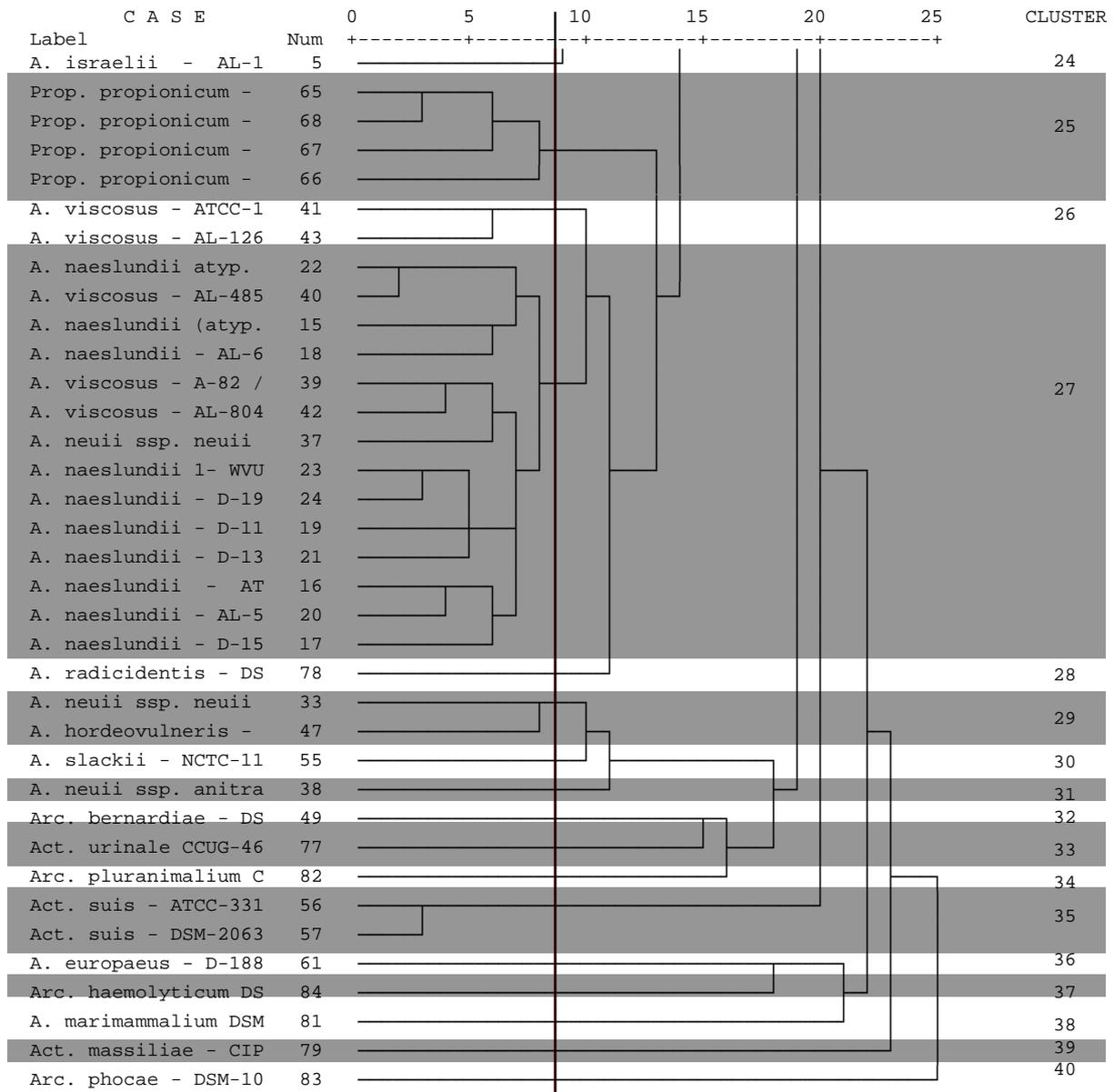
## 7.5. Dendrogramm Nr.3

## Jaccard-Koeffizient

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 8,9 RDCC



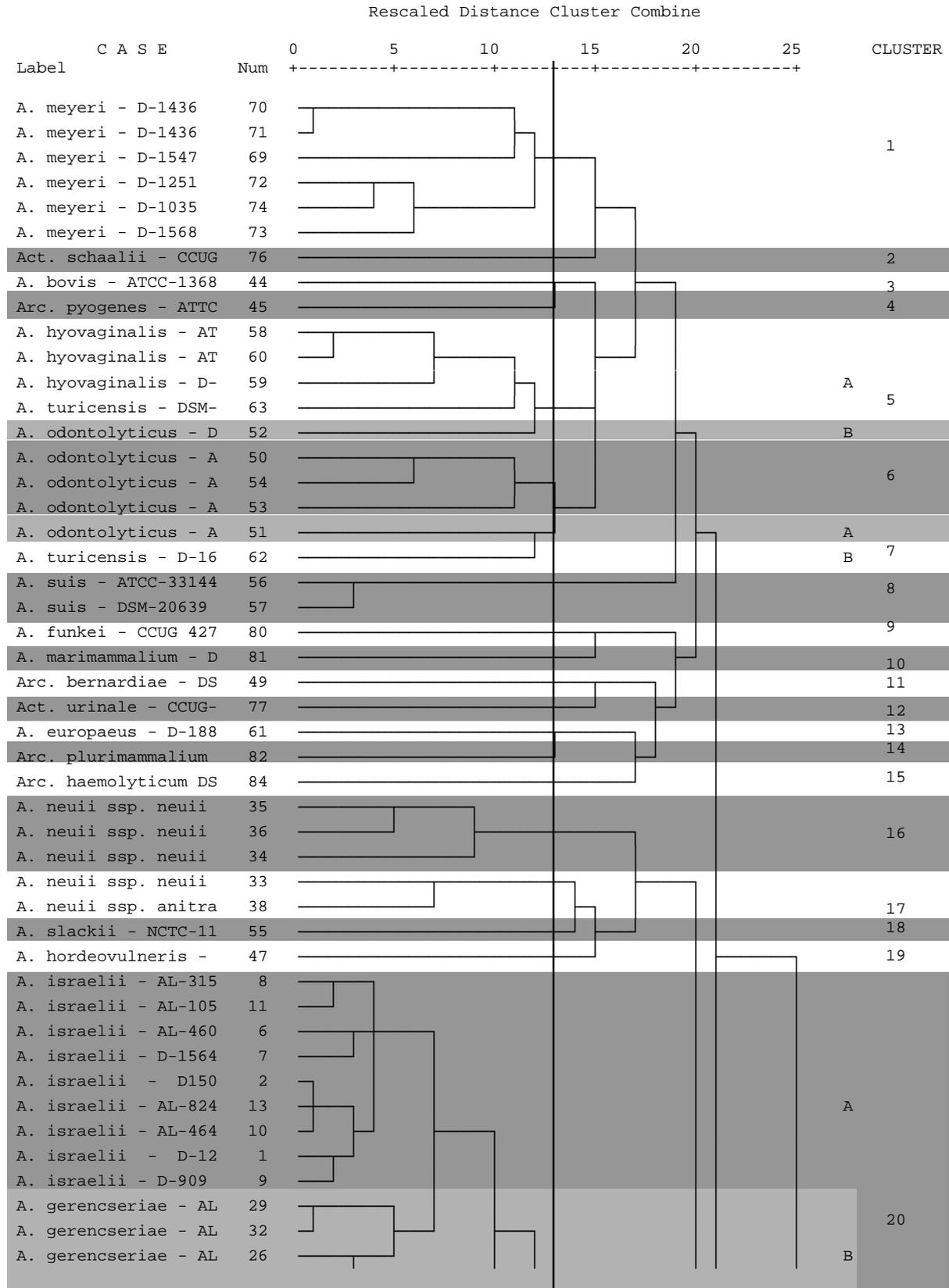


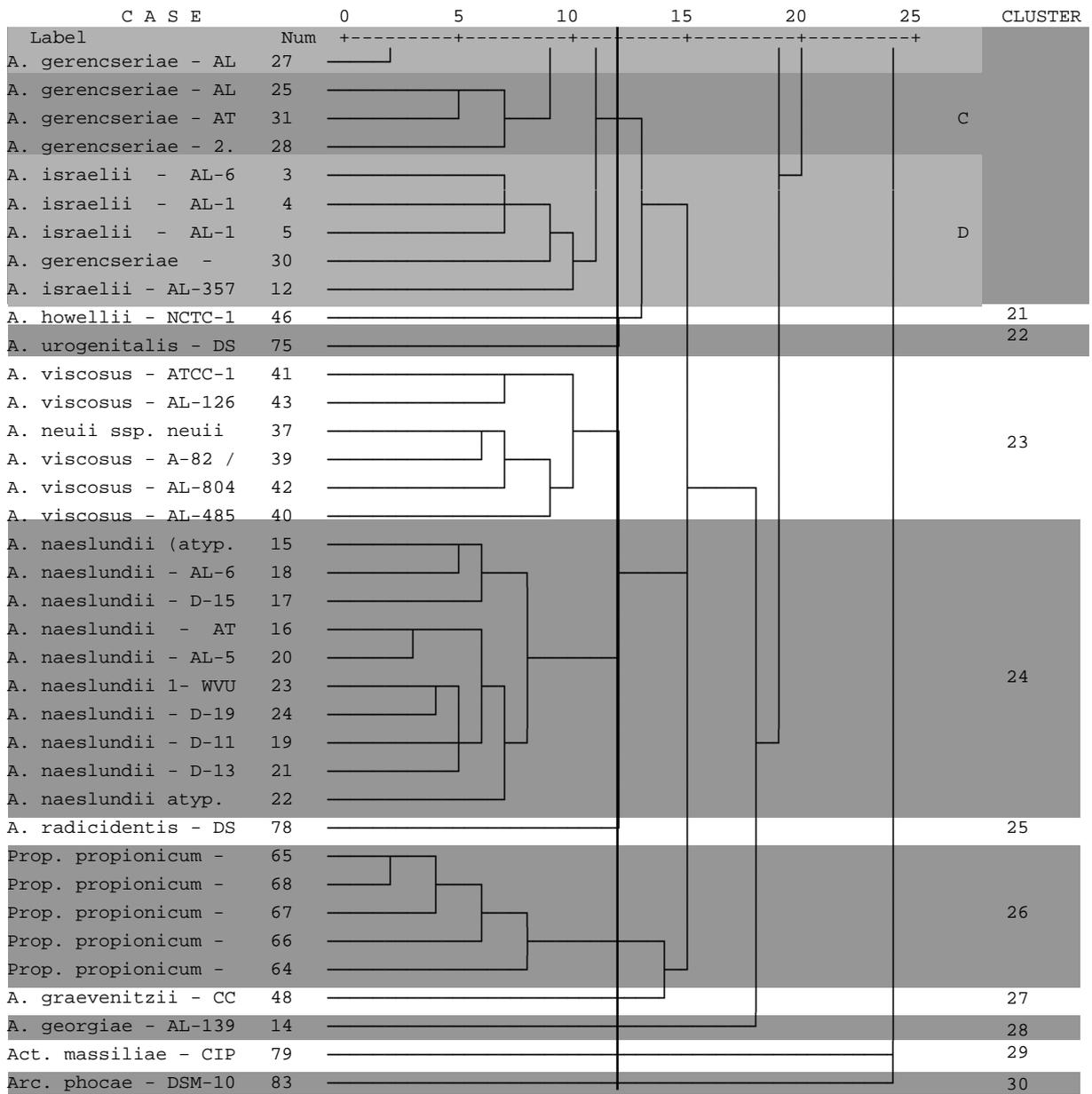
## 7.6. Dendrogramm Nr.4

## Jaccard-Koeffizient

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Trennlinie 12,5 RDCC





## 8. Literaturverzeichnis

1. Amdur BH, Szabo EI, Socransky SS. Fatty acids of Gram-positive bacterial rods from human dental plaque. *Arch.Oral Biol.* 1978;23:23-29
2. Baird AS. Pelvic actinomycosis: still a cause for concern. *J.Fam.Plann.Reprod.Health Care* 2005;31:73-74
3. Batty I. *Actinomyces odontolyticus*, a new species of actinomycete regularly isolated from deep carious dentine. *J.Pathol.Bacteriol.* 1958;75:455-459
4. Beighton D. Establishment and distribution of the bacteria *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the mouth of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Arch.Oral Biol.* 1985;30:403-407
5. Bollinger O. Über eine neue Pilzkrankheit beim Rinde. *Zentralblatt der medizinischen Wissenschaften* 1877;15:481-485
6. Bowden GH, Fillery ED. Wall carbohydrate antigens of *A. israelii*. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1978;107:685-692
7. Bowden GH, Hardie JM. Commensal and pathogenic *Actinomyces* species in man. *Soc.Appl.Bacteriol.Symp.Ser.* 1973;2:277-299
8. Bowden GH, Hardie JM, Fillery ED. Antigens from *Actinomyces* species and their value in identification. *J.Dent.Res.* 1976;55:A192-A204
9. Boyd A, Williams RAD. Estimation of the volumes of bacterial cells by scanning electron microscopy. *Arch.Oral Biol.* 1971;16:259-267
10. Brandt PD, de Wet FA, Botha SJ, de Wet BJ. Anti-bacterial efficacy of new self-etching dentine bonding agent. *SADJ.* 2004;59:280-282

11. Buchanan AM, Scott JL, Gerencser MA, Beaman BL, Jang S, Biberstein EL. *Actinomyces hordeovulneris* sp. nov., an agent of canine actinomycosis. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1984;34:439-443
12. Buchanan RE. Studies in the classification and nomenclature of the bacteria. *J.Bacteriol.* 1918;3:403-406
13. Bujwid O. Über die Reinkultur des *Actinomyces*. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene* 1889;6:630-633
14. Carvalho LH, D'Avila GB, Leao A, Goncalves C, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II--microbiological results. *J.Clin.Periodontol.* 2005;32:406-411
15. Charfreitag O, Collins MD, Stackebrandt E. Reclassification of *Arachnia propionica* as *Propionibacterium propionicum* comb. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1988;38:354-357
16. Charfreitag O, Stackebrandt E. Inter- and intragenetic relationships of the genus *Propionibacterium* as determined by 16S rRNA sequences. *J.Gen.Microbiol.* 1989;135:2065-2070
17. Collins MD, Gerencser MA, Slack JM. Enumeration and identification of Actinomycetaceae in human dental calculus using the fluorescent antibody technique. *Arch.Oral Biol.* 1973;18:145-153
18. Collins MD, Hoyles L, Kalfas S, Sundquist G, Monsen T, Nikolaitchouk N, Falsen E. Characterization of *Actinomyces* isolates from infected root canals of teeth: description of *Actinomyces radicidentis* sp. nov. *J.Clin.Microbiol.* 2000;38:3399-3403

19. Collins MD, Johnes D, Kroppenstedt RM, Schleifer KH. Chemical studies as a guide to the classification of *Corynebacterium pyogenes* and *Corynebacterium haemolyticum*. J.Gen.Microbiol. 1982a;128:335-341
20. Collins MD, Jones D, Schofield GM. Reclassification of '*Corynebacterium haemolyticum*' (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen.nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom.rev., comb.nov. J.Gen.Microbiol. 1982b;128:1279-1281
21. Collins MD, Pascual C. Reclassification of *Actinomyces humiferus* (Gledhill and Casida) as *Cellulomonas humilata* nom. corrig., comb. nov. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 2000;50 Pt 2:661-663
22. Collins MD, Stubbs S, Hommez J, Devriese LA. Molecular taxonomic studies of Actinomyces-like bacteria isolated from purulent lesions in pigs and description of *Actinomyces hyovaginalis* sp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol. 1993;43:471-473
23. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalem W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. J.Periodontol. 2005;76:778-784
24. Coykendall AL, Munzenmaier AJ. Desoxyribonucleic acid hybridisation among strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. Int.J.Syst.Bacteriol. 1979;29:237-240
25. Csukas Z, Palfalvi M, Kiss R. The role of *Propionibacterium propionicus* in chronic canaliculitis. Acta Microbiol.Hung. 1993;40:107-113
26. Cummins CS. Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. J.Gen.Microbiol. 1970;28:35-50

27. Cummins CS, Harris H. The chemical composition and taxonomic character. J.Gen.Microbiol. 1956;14:583-600
28. Cummins CS, Harris H. Studies on the cell wall composition and taxonomy of *Actinomycetales* and related groups. J.Gen.Microbiol. 1958;14:583-600
29. Dahlen NA Einsatz des Taxa Profile C und Taxa Profile E Systems zur Klassifizierung und Identifizierung fakultativ anaerober (fermentativer) Aktinomyzeten. Inaugural-Dissertation, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Universität Bonn, 2004
30. Dent VE, Williams RAD. *Actinomyces denticolens* Dent & Williams sp. nov., a new species from the dental plaque of cattle. J.Appl.Bacteriol. 1984a;56:183-192
31. Dent VE, Williams RAD. *Actinomyces howellii*, a species from the dental plaque of cattle. Int.J.Syst.Bacteriol. 1984b;34:316-320
32. Dent VE, Williams RAD. *Actinomyces slackii* sp. nov. from dental plaque of dairy cattle. Int.J.Syst.Bacteriol. 1986;36:392-395
33. Ellen RP, Onose H. pH measurements of *Actinomyces viscosus* colonies grown on media containing dietary carbohydrates. Arch.Oral Biol. 1978;23:105-111
34. Felsenstein L. Numerical Methods for inferring evolutionary trees. Quarterly Rev.Biol. 1982;52:379-404
35. Fillery ED, Bowden GH, Hardie JM. A comparison of strains of bacteria designated *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. Caries Res. 1978;12:299-312

36. Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees: a method based on mutation distances as estimates from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science* 1967;155:279-284
37. Fortner J. Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaerobier. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.Abt.I.Orig.* 1928;108:155-159
38. Fox GE, Pechmann KG, Woese CR. Comparative cataloguing of the 16S ribosomal ribonucleic acid. Molecular approach to procaryotic systematics. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1977;27:44-57
39. Funke G, Alvarez N, Pascual C, Falsen E, Akervall E, Sabbe L, Schouls L, Weiss N, Collins MD. *Actinomyces europaeus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1997a;47:687-692
40. Funke G, Ramos CP, Fernandez-Garayzabal JF, Weiss N, Collins MD. Description of human-derived Centers for Disease Control coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1995;45:57-60
41. Funke G, Stubbs S, Graevenitz A, Collins MD. Assignment of Human-derived CDC Group 1 Coryneform bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces neuui* subsp. *neuui* sp. nov., subsp. nov., and *Actinomyces neuui* subsp. *anitratus* subsp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1994;44:167-171
42. Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, III, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 1997b;10:125-159
43. Garant PR, Cho Moon II, Lacono V, Shemala GJ. Immuno-electro microscopic study of antigenic surface components of *Actinomyces naeslundii* in human dental plaque. *Arch.Oral Biol.* 1979;24:369-377

44. Garcia Ramos E, Kickick Tello N, Rozco J, Caballero R, Cardonna Carillo P. Isolation of *Actinomyces* species and other microorganisms from 140 hypertrophic tonsils in children. *Revista Latinoamericana di Microbiologia* 1984;26:251-260
45. Georg LK, Brown JM. *Rothia*, gen. nov. An aerobic genus of the family Actinomycetaceae. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1967;17:79-88
46. Georg LK, Pine L, Gerencser MA. *Actinomyces viscosus*, comb. nov., a catalase positive facultative member of the Genus *Actinomyces*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1969;19:291-293
47. Gerencser MA The application of fluorescent antibody techniques to the identification of *Actinomyces* and *Arachnia*. In: Bergan and Norris, Hrsg. *Methods in Microbiology*. Vol 13. London, New York, San Francisco: Academic Press, 1979
48. Gilmour MN, Howell A, Bibby BG. The classification of organisms termed *Leptotrichia (Leptotrix) buccalis*. I. Review of the literature and proposed separation into *Leptotrichia buccalis* Trevisan 1879 and *Bacterionema gen. nov.*, *B. matruchotii* (Mendel 1919) comb. nov. *Bacteriol.Review* 1961;25:131-141
49. Gledhill WE, Gledhill LE, Casida Jr. Predominant catalase-negative soil bacteria. II Occurrence and characterisation of *Actinomyces humiferus* sp. n. *Appl.Microbiol.* 1969;18:114-121
50. Goodfellow M, Cross T Classification. In: Goodfellow MaW, Hrsg. *The Biology of Actinomycetes*. London and New-York: Academic Press, 1984
51. Goodfellow M, Minnikin DE The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, Hrsg. *The Prokaryotes*. A

Handbook of Habitats, Isolation and Identifikation of Bacteria. Berlin:  
Springer-Verlag, 1981

52. Guinier D, Mathieu P, Baulard R, Viennet G, Manton G. A false peritoneal carcinomatosis. *Ann.Chir* 2005;130:186-189
53. Hall V, Collins MD, Hutson R, Falsen E, Duerden BI. *Actinomyces cardiffensis* sp. nov. from human clinical sources. *J.Clin.Microbiol.* 2002;40:3427-3431
54. Hall V, Talbot PR, Stubbs SL, Duerden BI. Identification of clinical isolates of actinomyces species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis. *J.Clin.Microbiol.* 2001;39:3555-3562
55. Hancock IC Analysis of Cell wall Constituents of Gram-positive Bacteria. In: Goodfellow and O'Donnel AG, Hrsg. *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics. Modern microbiological methods.* Chichester, England: John Wiley & Sons, 1994
56. Harz CO. Ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes. *Jahresbericht der Königlichen Centralen Thierarzneischule München* 1877;5:125-140
57. Heinrich S, Korth H Zur Nährbodenfrage in der Routinediagnostik der *Aktinomykose*. Einsatz unsicherer biologischer Substrate durch ein standardisiertes Medium. In: Heile HJ, Hrsg. *Krankheiten durch Aktinomyceten und verwandte Erreger.* Berlin: Springer Verlag, 1967
58. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *V.P.I. Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Blacksburg, VA. Southern Printing Co. 1977;
59. Holm P. Studies on the aetiology of human actinomycosis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 1951a;Suppl. 91:172-173

60. Holm P. Studies on the aetiology of human actinomycosis. II. Do the other microbes of actinomycosis possess virulence? *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 1951b;28:391-406
61. Holmberg K, Hallander HO. Numerical taxonomy and laboratory identification of *Bacterionema matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, and some related bacteria. *J.Gen.Microbiol.* 1973;76:43-63
62. Holmberg K, Nord CE. Numerical taxonomy and laboratory identification of *Actinomyces* and *Arachnia* and some related bacteria. *J.Gen.Microbiol.* 1975;91:17-44
63. Hori H, Osawa S. Evolutionary change in 5S rRNA secondary structure and phylogenetic tree of 54 5S rRNA species. *Proc.Nat.Acad.Science USA* 1976;76:381-385
64. Hoyles L, Falsen E, Foster G, Collins MD. *Actinomyces coleocanis* sp. nov., from the vagina of a dog. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2002;52:1201-1203
65. Hoyles L, Falsen E, Foster G, Pascual C, Greko C, Collins MD. *Actinomyces canis* sp. nov., isolated from dogs. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2000;50 Pt 4:1547-1551
66. Hoyles L, Falsen E, Holmstrom G, Persson A, Sjoden B, Collins MD. *Actinomyces suimastitidis* sp. nov., isolated from pig mastitis. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001a;51:1323-1326
67. Hoyles L, Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Foster G, Henderson D, Collins MD. *Actinomyces catuli* sp. nov., from dogs. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001b;51:679-682

68. Hoyles L, Pascual C, Falsen E, Foster G, Grainger JM, Collins MD. *Actinomyces marimammalium* sp. nov., from marine mammals. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 2001c;51:151-156
69. Israel J. Neue Beobachtungen auf dem Gebiete der Mykosen des Menschen. Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin 1878;74:15-53
70. Johnes DB, Kaplan W, Brown JM, White W. Studies of cervicovaginal smears for the presence of *actinomyces*. Mycopathologia 1983;83:53-55
71. Johnson JL, Cummins CS. Cell Wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms classica propionibacteria and strains of *Arachnia propionica*. J.Bacteriol. 1972;109:1047-1066
72. Johnson JL, Moore LVH, Kaneko B, Moore WEC. *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and the *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. Int.J.Syst.Bacteriol. 1990;40:273-286
73. Kayikcioglu F, Akif AM, Haberal A, Faruk DO. Actinomyces infection in female genital tract. Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol. 2005;118:77-80
74. Kilian M. Rapid identification of Actinomycetaceae and related bacteria. J.Clin.Microbiol. 1978;8:127-133
75. Kroppenstedt RM Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow and Minnikin, Hrsg. Chemical methods in bacterial systematics. London: Academic Press, 1985
76. Kroppenstedt RM, Kutzner HJ. Biochemical taxonomy of some problem actinomycetes. Zbl.Bakt.Hyg.I Abt., Suppl.6 1978;125-133

77. Kuijper EJ, Wiggerts HO, Jonker GJ, Schaal KP, de Gans J. Disseminated actinomycosis due to *Actinomyces meyeri* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand.J.Infect.Dis.* 1992;24:667-672
78. Lachner-Sandoval V Über Strahlenpilze. Eine bacteriologisch-botanische Untersuchung. Inaugural-Dissertation, Straßburg. Bonn: Universitätsdruckerei Karl Georgie, 1898
79. Lawson PA, Falsen E, Akervall E, Vandamme P, Collins MD. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1997;47:899-903
80. Lawson PA, Falsen E, Foster G, Eriksson E, Weiss N, Collins MD. *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001a;51:55-59
81. Lawson PA, Nikolaitchouk N, Falsen E, Westling K, Collins MD. *Actinomyces funkei* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001b;51:853-855
82. Lentze F Die *Aktinomykose* und die *Nokardiosen*. In: Grumbach A, Bonin O, Hrsg. Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. Vol. 2. 2<sup>nd</sup> Edition. Stuttgart: Georg Thime Verlag, 1969
83. Ludwig W, Kirchhof G, Weizenegger M, Weiss N. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium suis* to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces suis* comb. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1992;42:161-165
84. Minnikin DE, Alshamaony L, Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J.Gen.Microbiol.* 1975;88:200-204

85. Nikolaitchouk N, Hoyles L, Falsen E, Grainger JM, Collins MD. Characterization of Actinomyces isolates from samples from the human urogenital tract: description of *Actinomyces urogenitalis* sp. nov. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 2000;50 Pt 4:1649-1654
86. Orla-Jensen S. La classification des bactéries lactiques. Lait 1924;4:468-474
87. Pandhi PN, Hammound BF. The bipolar lipids of *Actinomyces viscosus*. Arch.Oral Biol. 1978;23:17-21
88. Pascual C, Foster G, Falsen E, Bergstrom K, Greko C, Collins MD. *Actinomyces bowdenii* sp. nov., isolated from canine and feline clinical specimens. Int.J.Syst.Bacteriol. 1999;49 Pt 4:1873-1877
89. Pascual RC, Falsen E, Alvarez N, Akervall E, Sjöden B, Collins MD. *Actinomyces graevenitzii* sp. nov., Isolated from human clinical specimens. Int.J.Syst.Bacteriol. 1997;47:885-888
90. Pine L. Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. Int.J.Syst.Bacteriol. 1970;20:445-474
91. Pine L, Boone CJ. Comparative cell wall analyses of morphological forms within the genus Actinomyces. J.Bacteriol. 1967;94:875-883
92. Pine L, Georg LK. Reclassification of *Actinomyces propionicus*. Int.J.Syst.Bacteriol. 1969a;19:267-272
93. Pine L, Georg LK. The classification of *Actinomyces propionicus*. Int.Bull.Bacteriol.Nomencl.Tacon. 1969b;15:143-163
94. Pine L, Hardin H. *Actinomyces israelii*, a cause of lacrimal canaliculitis in man. J.Bacteriol. 1959;78:164-170

95. Pott B, Vandame P, Kersters K Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. In: Goodfellow and O'Donnel, Hrsg. Modern microbiological methods. Chemical methods in procaryotic systematics. Chichester, United Kingdom: J. Wiley and Sons Ltd., 1994
96. Pulverer G, Schaal KP Pathogenicity and medical importance of aerobic and anaerobic *actinomycetes*. In: Mordarski M, Kurylowicz W, Jeljaszewicz J, Hrsg. Nocardia and Streptomyces. Proceedings of the International Symposium on Nocardis and Streptomyces. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 1978
97. Pulverer G, Schaal KP. Human actinomycoses. *Drugs Exp Clin Res* 1984;10:187-196
98. Pulverer G, Schütt-Gerowitt H, Schaal KP. Human cervicofacial actinomycoses: microbiological data for 1997 cases. *Clin.Infect.Dis.* 2003;37:490-497
99. Ramos CP, Foster G, Collins MD. 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.* 1997;47:46-53
100. Rogers AH, van der Hoeven JS, Mikx FH. Inhibition of *Actinomyces viscosus* by bacteriocin-producing strains of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of gnotobiotic rats. *Arch.Oral Biol.* 1978;23:477-483
101. Russel C, Melville TH. A review. Bacteria in the human mouth. *J.Appl.Bacteriol.* 1978;44:163-181
102. Schaal KP. Die *Actinomykosen* des Menschen - Diagnose und Therapie. *Dtsch Ärzteblatt* 1979;31:1997-2006

103. Schaal KP Laboratory Diagnosis of Actinomycete Diseases. In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, Hrsg. The Biology of the Actinomycetes. London: Academic Press, 1984
104. Schaal KP Identification of Clinically Significant Actinomycetes and Related Bacteria Using Clinical Techniques. In: Goodfellow M, Minnikin DE, Hrsg. Chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985
105. Schaal KP The genus *Actinomyces* Harz 1877. In: Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Hrsg. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986a
106. Schaal KP The genus *Arachnia* Pine and Georg 1969. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Hrsg. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2. Baltimore-London: Williams & Wilkins, 1986b
107. Schaal KP Fakultativ bis obligat anaerobe, grampositive, sporenlöse Stäbchenbakterien. In: Burkhardt F, Hrsg. Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart, New York: Thieme, 1992a
108. Schaal KP The genera *Actinomyces*, *Arcanobacterium* and *Rothia*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Scheifer KH, Hrsg. The Prokaryotes, Vol. 1. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag, 1992b
109. Schaal KP Aktinomykosen. In: Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e.V., Hrsg. DGPI-Handbuch 1997: Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. München: Futuramed Verlag, 1997
110. Schaal KP Die Aktinomyzeten. In: Köhler W, Eggert HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. (vormals Brandis et al.): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, 2001

111. Schaal KP, Beaman BL Clinical significance of *actinomycetes*. In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, Hrsg. The Biology of the Actinomycetes. London: Academic Press, 1984
112. Schaal KP, Gatzer R Serological and numerical phenetic classification of clinically significant fermentative *actinomycetes*. In: Arai T, Terao K, Yamazaki M, Miyaji M, Unemoto T, Hrsg. Filamentous Microorganisms. Biomedical Aspects. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1985
113. Schaal KP, Lee HJ. Actinomycete infections in humans--a review. Gene 1992;115:201-211
114. Schaal KP, Pulverer G. Fluoreszenzserologische Differenzierung von fakultativ anaeroben *Aktinomyzeten*. Zbl.Bakt.Hyg.I Abt.Orig.A. 1973;225:424-430
115. Schaal KP, Pulverer G The genera *Actinomyces*, *Agromyces*, *Arachnia*, *Bacterionema* and *Rothia*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, Hrsg. The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Heidelberg - New York: Springer Verlag, 1981
116. Schaal KP, Pulverer G Epidemiologic, etiologic, diagnostic and therapeutic aspects of endogenous actinomycetes infections. In: Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V, Hrsg. Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Orlando: Academic Press, 1984
117. Schaal KP, Schofield GM. Current ideas on the taxonomic status of the *Actinomycetaceae*. Zbl.Bakt.Hyg.I Abt. 1981a;Suppl. 11:67-78
118. Schaal KP, Schofield GM. Taxonomy of *Actinomycetaceae*. Rev.Inst.Pasteur (Lyon) 1981b;14:27-39

119. Schaal KP, Schofield GM Classification and identification of clinically significant *Actinomycetaceae*. In: Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V, Hrsg. Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Orlando: Academic Press, 1984
120. Schleifer KH, Seidl PH Chemical composition and structure of murein. In: Goodfellow and Minnikin, Hrsg. Chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985
121. Schofield GM, Schaal KP. A simple basal medium for carbon source utilization tests with the anaerobic actinomycetes. FEMS Mikrobiology Letters 1979a;5:309-310
122. Schofield GM, Schaal KP. Application of the Minitek differentiation system in the classification and identification of *Actinomycetaceae*. FEMS Mikrobiology Letters 1979b;5:311-313
123. Schofield GM, Schaal KP. Rapid micromethods for detecting deamination and decarboxylation of amino acids, indole production, and reduction of nitrate and nitrite by facultatively anaerobic actinomycetes. Zentralbl.Bakteriol.A 1980;247:383-391
124. Schofield GM, Schaal KP. A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. J.Gen.Microbiol. 1981;127:237-259
125. Slack JM Family *Actinomycetaceae* Buchanan 1918 Genus *Actinomyces* Harz 1877. In: Buchanan and Gibbons, Hrsg. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th edition. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1974
126. Slack JM, Gerencser MA *Actinomyces*, filamentous Bacteria. Biologie and pathogenicity. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1975

127. Slack JM, Landfried S, Gerencser MA. Morphological biochemical and serological studies on 64 strains of *Actinomyces israelii*. J.Bacteriol. 1969;97:873-884
128. Sneath PHA. The application of computers to taxonomy. J.Gen.Microbiol. 1957;54:1-11
129. Sneath PHA. Analysis and interpretation of sequence data for bacterial systematics: the view of a numerical taxonomist. Syst.Appl.Microbiol. 1989;12:15-31
130. Sneath PHA, Johnson R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. J.Gen.Microbiol. 1972;72:377-392
131. Sokal RR, Michener CD. A statistical method for evaluating systematic relationships. Kansas University Science Bulletin 1958;38:1409-1438
132. Sreenivasan PK, Furgang D, Zhang Y, DeVizio W, Fine DH. Antimicrobial effects of a new therapeutic liquid dentifrice formulation on oral bacteria including odorigenic species. Clin.Oral Investig. 2005;9:38-45
133. Stackebrandt E, Charfreitag O. Partial 16S rRNA primary structure of five *Actinomyces* species: phylogenetic implications and development of an *Actinomyces israelii*-specific oligonucleotide probe. J.Gen.Microbiol. 1990;136:37-43
134. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNS-DNS-reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int.J.Syst.Bacteriol. 1994;44:846-849
135. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new classification system, *Actinobacteria classis nov.* Int.J.Syst.Bacteriol. 1997;47:479-491
136. Sutter VL, Finegold SM Anaerobic bacteriology manual. Los Angeles UCLA: 1972

137. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK, Chu FC, Tsang PC, Cheung BP. Direct detection of *Actinomyces* spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. *J.Dent.* 2003;31:559-568
138. Thompson L, Lovestedt SA. An *Actinomyces*-like organism obtained from the human mouth. *Mayo Clin.Proc.* 1951;26:169-175
139. Varma D, Chang B, Musaad S. A case series on chronic canaliculitis. *Orbit.* 2005;24:11-14
140. von Graevenitz A, Plinter V, Gruner E, Pfyffer GE, Funke G. Identification of coryneform and other gram-positiv rods with several methods. *APMIS* 1994;102:381-389
141. Waksman SA, Henrici AT Family *Actinomycetaceae* Buchan. In: Breed, Murray, Hitchens, Hrsg. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th edition. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1948
142. Wolff M, Israel J. Über Reincultur des *Actinomyces* und seine Übertragbarkeit auf Thiere. *Archiv der Pathologischen Anatomie, Physiologie und Klinischen Medizin* 1891;126:11-59
143. Wüst J, Stubbs S, Weiss N, Funke G, Collins MD. Assignment of *Actinomyces pyogenes*-like (CDC coryneform group E) bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces radingae* sp. nov. and *Actinomyces turicensis* sp. nov. *Appl.Microbiol.* 1995;20:76-81