Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Stellvertretender Direktor: Prof. Dr. med. M. Lohoff
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

---

Vergleich der genetischen und biochemisch-phänotypischen Eigenschaften von ausgewählten Stämmen der fakultativ pathogenen Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
JULIANE MAREEN MEHNERT
aus Schwedt/Oder

Marburg/Lahn 2005

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Stellvertretender Direktor: Prof. Dr. med. M. Lohoff
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

---

Vergleich der genetischen und biochemisch-phänotypischen Eigenschaften von ausgewählten Stämmen der fakultativ pathogenen Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
JULIANE MAREEN MEHNERT
aus Schwedt/Oder

Marburg/Lahn 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am:

29. September 2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. R. Mutters
Korreferent: Prof. Dr. L. Flores-de-Jacoby

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1-3
I.	**ZUSAMMENFASSUNG**	4-5
II.	**EINLEITUNG**	
2.1	Geschichtlicher Hintergrund von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	6
2.2	Eigenschaften von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	6
2.2.1	Mikromorphologie	6-7
2.2.2	Vorkommen	7
2.2.3	Parodontalerkrankungen hervorgerufen durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	7-10
2.2.4	Systemische Erkrankungen hervorgerufen durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	10-11
2.2.5	Genetische Eigenschaften	11-12
2.3	Ziele der vorliegenden Arbeit	12
III.	**MATERIAL UND METHODEN**	
3.1	Mikroorganismen	13
3.2	Kulturmedien und Zusätze	13
3.2.1	Blutagar	13-14
3.2.2	Kochblutagar	14
3.2.3	Trypticase-Soy-Bacitracin-Vancomycin-Agar (TSBV-Agar)	14
3.2.4	Proteose-Pepton-Medium	14-15
3.2.5	Thioglycolat-Bouillon	15
3.2.6	Glucose-Stammlösung	15
3.2.7	Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung	15
3.2.8	Hefeextrakt-Stammlösung	15
3.2.9	Rinderserum	15
3.2.10	Vitox® SR 90	16
3.3	Reagenzien für die DNA-Präparation	16
3.3.1	Crombach-Puffer (var.)	16

3.3.2	Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	16
3.3.3	Pronase	16-17
3.3.4	Ribonuclease (RNase)	17
3.3.5	Phenol-Kresol-Mischung	17
3.3.6	Kalium-Phosphat-Puffer	17
3.3.7	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (SSC)	17
3.4	Anzüchtung der Bakterien	18
3.5	Kulturelle und biochemische Charakterisierung	18
3.5.1	Gramfärbung	18-19
3.5.2	Katalase-Reaktion	19
3.5.3	TMPD-Oxidase-Reaktion	19
3.5.4	Bunte Reihe	19-20
3.5.4.1	Verwertung von Kohlenhydraten	20
3.5.4.2	Aminosäuredecarboxylasen	20
3.5.4.3	Urease	20
3.5.4.4	Citrat	21
3.5.4.5	Nitratreduktion	21
3.5.4.6	Indol	21
3.5.4.7	Äskulinhydrolyse-Testmedium	22
3.5.4.8	Alkalische Phosphatase	22
3.5.4.9	β-Glucosidase (ONPG)	22
3.6	Kommerzielle Schnelltestsysteme	22
3.6.1	Identifizierung mit Hilfe des BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*-Testsystems	22-23
3.6.2	Reagenzien des Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*	23-26
3.6.3	Identifizierung mit Hilfe des BD BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter*-Testsystems	26
3.6.4	Reagenzien des Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter*	27-30
3.7	Produktion von Zellmasse für die DNA-Gewinnung zur DNA-DNA Hybridisierung	31
3.7.1	Vorkultur	31
3.7.2	Massenkulturen im Feed-batch-Verfahren	31
3.7.3	Reinheitskontrollen	31
3.7.4	Ernte der Bakterien	32
3.8	DNA-Isolierung für die DNA-DNA Hybridisierung	32

3.8.1	Bakterienaufschluss	32
3.8.2	DNA-Präparation: Ausfällen der DNA und Deproteinierung	32-33
3.8.3	Entfernung von RNA	33
3.8.4	Entfernung von Polysacchariden	33-34
3.8.5	Eliminierung von Lipiden und niedermolekularen Kontaminationen	34
3.9	Konzentration und Reinheit der DNA-Präparate für die DNA-DNA Hybridisierung	34
3.9.1	Konzentration der DNA-Lösungen	34
3.9.2	Reinheit der DNA-Präparate	35
3.10	Fragmentierung der DNA für die DNA-DNA Hybridisierung	35
3.11	DNA-DNA Hybridisierung	35
3.11.1	Grundlagen	35-36
3.11.2	Auswahl der Bakterienstämme für die DNA-DNA Hybridisierung	36
3.11.3	Durchführung der DNA-DNA Hybridisierung	36-37
3.11.4	Auswertung der Reassoziationskurven	37
3.12	Präsentation der Hybridisierungsergebnisse	37-38
3.13	DNA-Gewinnung für die DNA-Sequenzierung	38
3.13.1	Isolierung genomischer DNA aus Bakterienkulturen	38-39
3.13.2	Reinheitskontrolle der aufgereinigten DNA	39-40
3.13.3	Polymerase-Ketten-Reaktion zur Vervielfältigung des aufgereinigten DNA-Materials	40-41
3.13.4	Qualitäts- und Quantitätskontrolle der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese	42
3.13.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	42
3.14	DNA-Sequenzierung	42
3.14.1	Grundlagen	43
3.14.2	Limitierte Primerverlängerung/Kettenabbruch	43
3.14.3	Gelektrophoretische Trennung der Polynucleotide	43-44
3.14.4	Sequenzierung mit dem Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	44
3.14.5	Fällung des Extensionsproduktes	44-45
3.14.6	Auswertung	45
3.15	Präsentation der Sequenzierungsergebnisse	46
3.16	Lagerung der untersuchten Bakterienstämme	46-47

IV. ERGEBNISSE

4.1	Gemeinsame phänotypische Eigenschaften der 34 untersuchten Bakterienstämme und Identifizierung der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	48
4.1.1	Mikromorphologie, Gramreaktion, Koloniemorphologie	48
4.1.2	Kulturmedien und Wachstumsfaktoren (Glukose, Hefeextrakt, Rinderserum und Viox®)	48
4.1.3	CO_2-Bedarf	48
4.1.4	Biochemische Leistungen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	49
4.1.5	Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*	49-51
4.1.6	Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter*	52
4.2	Qualität der für die DNA-DNA Hybridisierung verwendeten DNA-Präparate	53
4.2.1	Spektrophotometrische Reinheit	53
4.3	DNA-DNA Hybridisierung: Basensequenzhomologie zwischen den untersuchten Bakterienstämmen	53
4.3.1	Intraspezifische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den 34 Stämmen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	53-54
4.3.2	Präsentation der Hybridisierungsergebnisse	54
4.4	Qualität der für die DNA-Sequenzierung verwendeten DNA-Präparate	54
4.4.1	Absorptionsmessung doppelsträngiger DNA am Photometer	54
4.5	Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion	54
4.5.1	Ergebnisse der Qualitäts- und Quantitätskontrolle der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese	54-55
4.6	Ergebnisse der datenbankgestützten Identifizierung der sequenzierten Stämme	55
4.7	DNA-Sequenzierung: Basensequenzhomologie zwischen den untersuchten Bakterienstämmen	55-56
4.7.1	Präsentation der Ergebnisse nach Sequenzvergleich	56

V. DISKUSSION

5.1	Medizinische und molekularbiologische Begründung der Arbeit	57
5.1.1	*Actinobacillus actinomycetemcomitans*	57
5.1.2	Voraussetzung für die molekularbiologische Analyse: Konventionelle, kulturelle Technik und Untersuchung biochemischer Charakteristika	57-58
5.1.3	Molekularbiologische Methoden	58
5.2	Auswahlkriterien der untersuchten Bakterienstämme	58
5.2.1	Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie in Marburg	58-59
5.2.2	Medizinischer Hintergrund	59
5.2.3	Bio- und Serotypen	59-60
5.3	Phänotypie von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in der Kultur	60
5.3.1	Mikromorphologie, Koloniemorphologie und Gramreaktion	60-62
5.3.2	Ansprüche an das Nährmedium	62
5.4	Biochemische Charakteristika von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	63
5.4.1	Interpretation der Ergebnisse der „Bunten Reihe“	63-65
5.4.2	Durch biochemische Varianz bedingte Gruppeneinteilung	65-66
5.5	Schnelltestsysteme zur Ermittlung biochemischer Charakteristika von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	66
5.5.1	Interpretation der Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystem BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*	66-68
5.5.2	Interpretation der Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystem BD BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter*	68-70
5.6	Vergleich zweier Untersuchungsmethoden biochemischer Charakteristika: Bunte Reihe und Schnelltestsysteme	70-71
5.7	Molekularbiologische Methode: DNA-DNA Hybridisierung	72
5.7.1	Verfahren	72
5.7.2	Größe der DNA-Fragmente	72-73
5.7.3	Qualität der DNA-Präparate	73
5.7.4	Auswertung und Präsentation der Hybridisierungsergebnisse	73
5.7.5	Andere Hybridisierungsmethoden in der Bakterientaxonomie	74
5.7.6	Interpretation der Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung: DNA-Basensequenzhomologie innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	74-76

5.8	Molekularbiologische Methode: DNA-Sequenzierung	76
5.8.1	Verfahren	76-77
5.8.2	Aufreinigung der DNA	77-78
5.8.3	Qualität der DNA-Präparate	78
5.8.4	Ermittlung der Basensequenzhomologie und Identifizierung der Stämme	78-79
5.8.5	Auswertung und Präsentation nach Sequenzvergleich	79-80
5.8.6	Andere Sequenziermethoden	80
5.8.7	Interpretation der Ergebnisse des Basensequenzvergleiches: Basensequenzhomologie innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Bunten Reihe und der DNA-DNA Hybridisierung	81-83
5.8.8	Die Ergebnisse des Basensequenzvergleiches in Hinblick auf die Pathogenität von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	83-84
VI.	**TABELLEN**	85-103
VII.	**ABBILDUNGEN**	104-119
VIII.	**LITERATURVERZEICHNIS**	120-141
IX.	**ANHANG**	
9.1	Tabellarischer Lebenslauf	
9.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	
9.3	Danksagung	
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	

ABKÜRZUNGEN

A.	*Actinobacillus*
A.a	*Actinobacillus actinomycetemcomitans*
Abb.	Abbildung
ad.	additiv
Aqua dest.	Aqua destilata
A+T	Adenin + Thymin
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
B.	*Bacteroides*
BD/BBL	Becton & Dickinson, Heidelberg
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumdichlorid
CO_2	Kohlendioxid
CCUG	Culture Collection University of Göteborg, Schweden
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
d.h.	das heißt
ds DNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E/NF-ID-Kit	*Enteric/Nonfermenter*-Identifikations-Kit
Fc	französisch: Fragment crystalline
Fl.	Flasche
G+C	Guanin + Cytosin
Gew. %	Gewichtsprozent
h	Stunde
H.	*Haemophilus*
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCO_3	Bicarbonat
HIM	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, Bakterien-Stammsammlung
HPLC	High performance liquid chromatography
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Kpt.	Kapitel
L	Liter
LAP	lokalisiert aggressive Parodontitis
lat.	lateinisch
lfd.	laufend
LJP	lokalisiert juvenile Parodontitis
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MCCM	Medical Culture Collection Marburg
$MgCl_2$	Magnesiumdichlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
N	normal
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NaOH	Natronlauge
N/H ID System Kit	*Neisseria/Haemophilus* Identifizierungs-Kit
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
N.N.	Non Nominatur
Nr.	Nummer
O_2	Sauerstoff
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
P.	*Pasteurella*
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
PGE_2	Prostaglandin E_2
PMK	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ppm	parts per million
psi	poundforce per square inch
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute/Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat-Lösung
s.o.	siehe oben

SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
T_m	Schmelztemperatur
TMPD	N, N, N', N'-Tetramethyl-1,4-Phenylendiamindihydrochlorid
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
T_{or}	optimale Renaturierungstemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Trypticase-Soy-Agar
TSBV-Agar	Trypticase-Soy-Bacitracin-Vancomycin-Agar
u.a.	unter anderem
u.s.w.	und so weiter
UV	Ultraviolett
$V_{A, B, M}$	Renaturierungsraten
var.	variatio
V-Faktor	Wachstumsfaktor NAD
Vit.	Vitamin
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Faktor	Wachstumsfaktor Protoporphyrin IX, bzw. Protohämin
µg	Mikrogramm
µl	Mikrogramm

1. ZUSAMMENFASSUNG

Der fakultativ pathogene Mikroorganismus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gehört zur physiologischen Mundhöhlenflora des Menschen und anderer Säugetiere, wobei er sowohl in der Mundhöhle parodontal Gesunder als auch in der Mundhöhle parodontal Erkrankter vorkommt. Aufgrund seiner zahlreichen Pathogenitätsmechanismen ist er imstande, destruktive parodontale Krankheiten zu initiieren. Er wird in hohen Raten in den Parodontalläsionen von Patienten nachgewiesen, die an lokalisierter juveniler Parodontitis (LJP = alte Nomenklatur), auch lokalisierte aggressive Parodontitis (LAP = neue Nomenklatur 1997), erkrankt sind. Zudem wird ihm eine Rolle bei der Pathogenese der Endokarditis, Sepsis, Sinusitis, Chronischen Bronchitis, Pneumonie, Osteomyelitis und bei Harnwegsinfektionen, sowie Kiefer-, Schilddrüsen-, Haut- und Gehirnabszessen zugeschrieben.

A. actinomycetemcomitans stellt hohe Ansprüche an die Kulturbedingungen und ist deshalb nicht immer leicht zu diagnostizieren. Es handelt sich hierbei um ein kleines unbewegliches, nicht sporenbildendes, gramnegatives, kokkoides Stäbchen, welches zudem als fakultativ anaerob, mikroaerophil und capnophil gilt.

Um die Frage nach einer prädiktiven Aussage zur Virulenz/Pathogenität von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mittels genomischer Marker bereits in der mikrobiologischen Diagnostik zu beantworten, wurden 34 Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Marburg untersucht. Diese wurden mit zwei unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden und einer klassischen phänotypischen Charakterisierung analysiert. Weder die Untersuchung mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierung nach der optischen Renaturierungsmethode, noch die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung spiegelten jedoch die Unterschiede der von den jeweiligen Stämmen hervorgerufenen chronischen und akuten Infektionen wider. Ebenso erfolgte die Bestimmung biochemischer Eigenschaften mit Hilfe der „Bunten Reihe“ und zwei verschiedenen kommerziellen Schnelltestsystemen mit dem Ziel herauszufinden, ob phänotypische Eigenschaften für taxonomische Untersuchungen verlässliche Marker darstellen und ob gegebenenfalls bestimmte Merkmale und Merkmalskombinationen Hinweise auf das Pathogenitätspotential einzelner Isolate geben können.

Die phänotypischen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Genomuntersuchung verglichen. Auch hier kam es zu widersprüchlichen Resultaten, da sich die Unterschiede innerhalb der biochemischen Versuchsreihe nicht durch genomische Ergebnisse belegen ließen.

Im Unterschied zu den DNA-DNA Hybridisierungsergebnissen ließen sich die Vergleichswerte der DNA-Sequenzen über eine taxometrische Auswertung im „single-linkage-clustering“ als Ähnlichkeits-Dendrogramm darstellen, das die verschiedenen phänotypischen Gruppen in

unterschiedlichen Ästen aufführte. Die verschiedenen biochemischen Entitäten von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* konnten somit über das Verfahren der Sequenzierung teilweise reflektiert werden. Es ergaben sich unterschiedliche genetische Gruppen, die sich jedoch anders als die Gruppen phänotypischer Reaktionsmuster zueinander verhielten.

Zudem wurde die Verlässlichkeit der Identifizierung der 34 untersuchten *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Stämme anhand der Schnelltestsysteme überprüft, die sich bei beiden Systemen als unzureichend erwies.

Biochemische Gruppen der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sind durch Sequenzierung identifizierbar; unterschiedlich virulente Stämme lassen sich über keine der hier geprüften Methoden erkennen. In der Diagnostik sind daher möglicherweise weiterhin noch zusätzliche serologische Verfahren notwendig, solange noch kein sicherer Nachweis von Virulenzgenen routinemäßig möglich ist.

2. Einleitung

2.1 Geschichtlicher Hintergrund von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Der von KLINGER (1912) erstmals aus fünf von zwölf Hautläsionen/Aktinomykosen isolierte Mikroorganismus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* wurde primär nur mit *Actinomyces* in Verbindung gebracht, was auch anhand des Namens ersichtlich ist (lat. comitans = begleitend). KLINGER (1912) bezeichnete den Mikroorganismus als *Bacterium actinomycetem comitans*. 1929 erhielt *Actinobacillus actinomycetemcomitans* von TOPLEY & WILSON seinen noch heute gültigen Namen. Sie sorgten auch dafür, dass der Mikroorganismus 1936 als eigenständige Spezies der Gattung *Actinobacillus* zugeordnet wurde. Der Name *Actinobacillus* stammt von dem griechischen Wort „aktis“ (Strahl) ab und läßt sich anhand der Feststellung herleiten, dass *A.a.* auf festen Nährböden eine interne Sternstruktur ausbilden kann.
Der Erstbeschreibung durch KLINGER (1912) folgten zahlreiche weitere Untersuchungen, in denen *A.a.* zumeist in Kombination mit *Actinomyces* identifiziert werden konnte (BAYNE-JONES, 1925; BATES, 1933). BATES (1933) gab an, dass *A.a.* die Sauerstoff-Spannung in den umliegenden Geweben minimiere und somit zu besseren Umgebungsvoraussetzungen für den anaeroben Mikroorganismus *Actinomyces bovis* führen würde.
Es folgten zahlreiche Versuche, in denen geprüft wurde, ob *Actinobacillus actinomycetemcomitans* als alleiniger Erreger von Infektionen anzusehen sei, da es lange so schien, als wäre er außerstande Infektionen ohne *Actinomyces israelii* als Partner hervorzurufen. HOLM (1951) konnte jedoch feststellen, dass *A.a.* selbst nach Eliminierung von *A. israelii* mit Hilfe von Penicillin wiederholt in Reinkultur anzüchtbar war.
KING & TATUM (1962) unterstrichen mit ihrer umfangreichen Studie das Pathogenitätspotential von *A.a.*, indem sie 32 Fälle dokumentierten, die aufgrund einer *A.a.* Infektion entstanden waren.

2.2 Eigenschaften von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

2.2.1 Mikromorphologie

Actinobacillus actinomycetemcomitans ist ein kleines unbewegliches, nicht sporenbildendes, gramnegatives, kokkoides Stäbchen, welches sowohl einzelständig als auch paarweise, aber auch in kleinen Gruppen wächst. Es wird in unterschiedlichen Untersuchungen als fakultativ anaerob, mikroaerophil und capnophil beschrieben (HENDERSON et al., 2003).

Das Wachstum wird durch CO_2 gesteigert (OHTA et al., 1989) und durch eine Temperatur von 37°C optimiert. Der pH-Wert sollte zwischen 7,0 und 8,0 liegen (SCREENIVASAN et al., 1993). In flüssigen Medien bildet der Organismus kleine Granula, die als „körniges Wachstum" bezeichnet werden und sich am Rand und am Boden des Röhrchens festsetzen, während das restliche Medium klar bleibt. Auf Agar bilden sich kleine zirkuläre, durchscheinende Kolonien, die nach 2-3 Tagen Inkubationszeit ungefähr 1 mm Durchmesser aufweisen. Wenn die Außenränder leicht irregulär wirken und eine ausgeprägte Adhärenz zur Agar-Oberfläche aufweisen, wird von „rauen" Kolonien gesprochen, die unter schwacher mikroskopischer Vergrößerung eine stern-ähnliche Erscheinung im Inneren aufweisen, die auch mit „gekreuzten Zigarren" verglichen worden ist (KAPLAN et al., 1989). Die Oberfläche des Agars unterhalb der Kolonien wird dabei leicht „angefressen", so dass die Kolonie teilweise im Agar eingebettet wird (HENDERSON et al., 2003). Nach wiederholter Subkultivierung verschwindet die Sternstruktur im Inneren der Kolonien, so dass aus den rauen Kolonien mit starkem Adhärenz-Charakter glatte, gleichmäßige Kolonien mit opaker Oberfläche entstehen, die keine pseudopodienartige Haftung zur Agaroberfläche aufweisen (BLIX et al., 1990). Diese Transformation von Kolonien vom rauen Phänotyp hin zu Kolonien vom glatten Phänotyp geht mit dem Verlust von Fimbrien/Fibrillen/Pili einher (INOUE et al., 1990, BHATTACHARJEE et al., 2001). Die von den rauen Kolonien gebildeten Fimbrien/Fibrillen/Pili weisen eine stärkere Adhärenz zu speichelbedecktem Hydroxylapatit auf als die der glatten Phänotypen (ROSAN et al., 1988).

2.2.2 Vorkommen

Der zur natürlichen Flora der menschlichen Mundhöhle und anderer Säugetiere zählende Mikroorganismus (HEINRICH & PULVERER, 1959; GEHRING, 1986; ASIKAINEN & CHEN, 1999; ASIKAINEN et al., 1991; EKE et al., 1993), konnte sowohl aus supra- und subgingivaler Plaque (KILIAN & SCHIOTT, 1975; SLOTS et al., 1980b) als auch aus dem Speichel, von der Wangenmukosa (ZAMBON, 1985), der Gingiva, der Zunge, dem harten Gaumen und den Tonsillen isoliert werden (ASIKAINEN et al., 1991). Der Organismus findet sich ebenso in der Mundhöhle parodontal Gesunder wie in der Mundhöhle parodontal Erkrankter (HOLTTA et al., 1994).

2.2.3 Parodontalerkrankungen hervorgerufen durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Die parodontale Mikroflora gilt als eine der komplexesten beim Menschen. Über die kausale Rolle von Bakterien bei der parodontalen Erkrankung des Menschen sind die Autoren sich

weitgehend einig. Vermutlich wird Parodontitis durch spezifische Mikroorganismen verursacht, welche ein pathogenes Potential für das Parodont aufweisen, wobei die parodontale Mikroflora, die mit lokalisierter juveniler Parodontitis [LJP, alte Nomenklatur (ARMITAGE, 1999)] verbunden ist, deutliche Unterschiede zu derer der Erwachsenenparodontitis [alte Nomenklatur (ARMITAGE, 1999)] aufweist (FLORES DE JACOBY et al., 1996). *Capnocytophaga subsp.* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sind als die vorherrschenden Mikroorganismen identifiziert worden (SLOTS, 1976; MANDELL & SOCRANSKY, 1981), wobei auch *Bacteroides gingivalis, B. intermedius* und *B. endodontalis* isoliert werden konnten. Da Patienten mit juveniler Parodontitis einen Defekt der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMK) aufweisen (CIANCIOLA et al., 1977; ALTMAN et al. 1985; VAN DYKE et al., 1983; VAN DYKE et al., 1992) liegt der Schluss nahe, dass durch Interaktion mit Bakterien wie *A. actinomycetemcomitans* die bakterielle Invasion möglich wird (FLORES DE JACOBY et al., 1996). Das Krankheitsbild der lokalisierten juvenilen Parodontitis (LJP) geht mit einem rapiden Verlust des Zahnhalteapparates einher, welcher ungefähr mit der Pupertät beginnt. Die Erkrankung tritt meist im Alter von 12 bis 26 Jahren auf, wobei weibliche Personen dreimal häufiger betroffen sind. Hierbei sind insbesondere die ersten Molaren und Inzisivi befallen. Der vertikale Knochenverlust an der mesialen Stelle der Zähne ist ein wichtiges diagnostisches Merkmal (FLORES DE JACOBY et al., 1996). Nachfolgend kommt es jedoch meist zu einem generalisierten alveolaren Knochenabbau mit Zahnverlusten (BAER, 1971). Charakteristisch ist auch das geringe Aufkommen von Plaque, Karies und Zahnstein, die mit vielen anderen parodontalen Erkrankungen einhergehen. Die neutrophilen Granulozyten weisen bei 77% der Patienten eine veränderte Chemotaxis und Phagozytose auf (SUZUKI et al., 1984). Kennzeichnend ist die familiäre Häufung der Erkrankung. Die lokalisierte juvenile Parodontitis spricht gut auf eine lokale Behandlung mit entsprechender Antibiotikatherapie an, sofern die Krankheit frühzeitig diagnostiziert wird (CHRISTERSON et al., 1985; FLORES DE JACOBY, 1987). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ist in relativ hohen Raten in den Läsionen bei lokalisierter juveniler Parodontitis vertreten (ASIKAINEN et al., 1987). CHRISTERSSON et al. (1987a) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass das Vorkommen von *A.a.* in subgingivaler Plaque im Zusammenhang mit dem Ausmaß der Gewebsinfiltration durch den Mikroorganismus steht. Hierbei wird er oft zusammen mit *Eikenella corrodens* isoliert, wobei ein Synergismus der beiden Spezies zu vermuten ist (CASEY CHEN et al., 1989). LILJENBERG & LINDHE (1980) sehen in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* den Krankheitsverursacher. Hingegen findet sich nur eine niedrige Rate dieses Mikroorganismus in der subgingivalen Plaque von gesunden oder nur geringfügig erkrankten Patienten. Der Attachmentlevel bzw. der Attachmentverlust betroffener Parodontien steht in engem Zusammenhang zum subgingivalen Vorhandensein von *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans (CHRISTERSSON & ZAMBON, 1993; FLORES DE JACOBY et al., 1996).

Gelegentlich findet man auch eine Assoziation zu Fällen mit Erwachsenenparodontitis, welche durch rapiden Verlust von Attachment und alveolarem Knochen gekennzeichnet sind, sowie zu Fällen von refraktärer Parodontitis (BRAGD et al., 1987; FLORES DE JACOBY et al., 1996).

Actinobacillus actinomycetemcomitans ist imstande gingivales Gewebe zu durchdringen und in diesem lebensfähig zu bleiben, was die Analyse von Biopsiegewebe ergeben hat (SLOTS & GENCO, 1984). Wird der Organismus beseitigt, führt dies zu einer Verbesserung des klinischen Erscheinungsbildes und gelegentlich zu einem Attachmentgewinn (FLORES DE JACOBY et al., 1996). Somit besteht der therapeutische Ansatz in parodontaler Chirurgie in Kombination mit einer Antibiotikagabe (CHRISTERSSON et al., 1985; SLOTS & ROSLING, 1983; FLORES DE JACOBY et al., 1996).

Patienten mit lokalisierter juveniler Parodontitis zeigen eine bemerkenswert höhere Anti-Serum-Antwort auf *A. actinomycetemcomitans* zusätzlich zur erhöhten lokalen Synthese von Antikörpern zu dieser Spezies in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel. Im Gegensatz dazu zeigen gesunde Personen und Patienten, die unter anderen Formen von Parodontitis leiden, niedrigere *A. actinomycetemcomitans*-Antikörper-Niveaus (CHUNG et al., 1986).

So genannte „aktive Stellen“, die durch anhaltenden Knochenabbau, Verlust von Bindegewebe oder klinischem Attachment von mehr als 2 mm während eines Zeitraums von zwei bis drei Monaten gekennzeichnet sind, weisen ein deutlich erhöhtes Aufkommen des Mikroorganismus auf (SLOTS & LISTGARTEN, 1988; DZINK et al., 1985/1988; FLORES DE JACOBY et al., 1996).

Nach Untersuchungen von PULVERER & KO (1972), KING & TATUM (1962) und ZAMBON et al. (1983) weist *A. actinomycetemcomitans* drei verschiedene Serotypen (a, b und c) auf, welche durch Oberflächenantigene (Polysaccharide) charakterisiert sind. Diese serologisch unterschiedlichen Gruppen besitzen gemeinsame Antigene; gemeinsame Antigene treten auch zwischen *A. actinomycetemcomitans* und verschiedenen *Actinobacillus*- und *Haemophilus*-Spezies auf. HENDERSON et al. (2002) sprechen von 6 unterschiedlichen Serotypen a-f.

Im Falle von lokalisierter juveniler Parodontitis tritt am häufigsten der Serotyp b auf. Hingegen findet man in Proben subgingivaler Plaque von Patienten mit Erwachsenenparodontitis den Serotyp a (ZAMBON et al., 1983).

Bei 25% junger Amerikaner findet sich *A. actinomycetemcomitans* in der Mundhöhle, während nur 1% der Bevölkerung an lokalisierter juveniler Parodontitis leidet. Daraus wird ersichtlich, dass der mikrobiologische Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* es kaum möglich macht, das Erkrankungsbild der lokalisierten juvenilen Parodontitis vorherzusagen (SLOTS & LISTGARTEN, 1988; FLORES DE JACOBY et al., 1996).

A. actinomycetemcomitans verfügt über zahlreiche Pathogenitätsmechanismen, die es ihm ermöglichen, destruktive parodontale Krankheiten zu initiieren. Dazu zählt u. a. die Produktion eines hitzelabilen Immunosuppressionsfaktor, der Funktionen der Lymphzellen, wie Blastogenese, Antikörperproduktion und Lymphokine-Synthese verhindert. Er besitzt ein hitzelabiles Leukotoxin, dass menschliche Neutrophile und Monozyten abtöten kann, indem es zu pathologischen Veränderungen in den Zellmembranen der Zielzellen kommt. Sera von Patienten mit lokalisierter juveniler Parodontitis können dieses Leukotoxin neutralisieren, was einen wichtigen Faktor bei der Wirtsresistenz gegen Infektion darstellt. Zudem hemmt der Mikroorganismus die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten ohne diese Zellen zu töten. *A. actinomycetemcomitans* produziert zudem Faktoren, die die Funktionen von Fibroblasten und sowohl endothelialen als auch epithelialen Zellen einschränken. Jedoch sind diese Faktoren sehr hitzeempfindlich und werden durch proteolytische Enzyme inaktiviert. Der Mikroorganismus besitzt auch endotoxische Lipopolysaccharide, welche als B-Zellen-Mitogen wirken, sowie den alternativen Reaktionsweg des Komplementsystems aktivieren und Knochenabbau verursachen können (HAUSMANN et al., 1971; FRANK & VÖGEL, 1978; FRANK, 1980; FLORES DE JACOBY et al., 1996). Er dringt in das Wirtsgewebe ein und bleibt dort lebensfähig.
A. actinomycetemcomitans initiiert polyklonale B-Zellen-Stimulation und mitogene Reaktionen in menschlichen Blut-Lymphozyten. Die Wirtszellen reagieren auf den bakteriellen Stimulus mit der Sekretion von Entzündungsmediatoren, wie z. B.: PGE_2, IL-1β, IL-6 und TNFα, die für die parodontale Zerstörung mitverantwortlich sind (SHAPIRA et al., 1994).
A.a. wird mit folgenden parodontalen Erkrankungen in Verbindung gebracht:
- Erwachsenenparodontitis
- lokalisierte juvenile Parodontitis
- generalisierte juvenile Parodontitis
- rasch fortschreitende Parodontitis
- refraktäre Parodontitis
- mit Insulin-abhängigem Diabetes mellitus assoziierte Parodontitis

(BAUM, 2003; FLORES DE JACOBY et al., 1996)

2.2.4 Systemische Erkrankungen hervorgerufen durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Actinobacillus actinomycetemcomitans wird neben der Juvenilen Parodontitis eine wichtige Rolle bei folgenden Erkrankungen zugeschrieben: Endokarditis (SAKAZAKI et al., 1984; PIERCE et al., 1984; BANSKY & RUSSI, 1981), Kiefer-, Schilddrüsen-, Haut- und Gehirnabszesse (MARTIN et al., 1967), Endarteritis (SYMBAS et al., 1967), Harnwegsinfektionen (TOWNSEND & GILLENWATER, 1969), Osteomyelitis (MUHLE et al., 1979), Sepsis,

Sinusitis, Chronische Bronchitis und Pneumonien (MEYERS et al., 1971; BURGHER et al., 1973). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zählt zur ehemaligen HACEK-Gruppe, zu welcher auch die gramnegativen Stäbchen *Haemophilus aphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* und *Klingella kingae* zusammengefasst werden. Die Gruppierung gründet auf der Tatsache, dass diese Erreger alle eine Endokarditis hervorrufen können und hohe Ansprüche an die Kulturbedingungen stellen, so dass sie nicht immer leicht zu diagnostizieren sind (ARVAND et al., 2005; PULVERER, 2001; KAYSER, 2001).

2.2.5 Genetische Eigenschaften

Dank der Entwicklung zahlreicher molekularbiologischer Methoden konnten in den vergangenen Jahren Fortschritte im Verständnis der genetischen Struktur von *A. actinomycetemcomitans* und somit Kenntnisse der taxonomischen Stellung des Mikroorganismus und der pathologischen Mechanismen erzielt werden. POHL (1979, 1981) fand aufgrund von durchgeführten DNA-DNA Hybridisierungen nach der von DE LEY et al. (1970) entwickelten optischen Renaturierungsmethode heraus, dass die Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* auf einem niedrigeren genetischen Verwandschaftsniveau (42%) im Vergleich zu allen anderen *Actinobacillus*-Spezies steht. Es fanden sich auch keine vergleichbar hohen DNA-Bindungsraten mit *H. aphrophilus* bei den Untersuchungen von POTTS & BERRY (1983) und ESCANDE et al. (1984), obwohl dies von KING & TATUM (1962) und KILIAN & SCHIOTT (1975) aufgrund phänotypischer Ähnlichkeiten vermutet worden war. BURBACH (1987) gibt eine neue Gattung N. N. an, der die Spezies *A. actinomycetemcomitans* näher steht als der Gattung *Actinobacillus*. Die Gattung N. N. ergibt sich aufgrund der Feststellung, dass sich innerhalb der Spezies *H. aphrophilus, H. Paraphrophilus* und *H. segnis* zwei DNA-Homologie-Gruppen befinden. WEGENER (1992) gibt an, dass *A. actinomycetemcomitans* sich keiner der bestehenden Gattungen der Familie *Pasteurellaceae* zuordnen lässt und somit ein eigenes Taxon im Rang einer Gattung darstellt. Er beruft sich hierbei auch auf Ergebnisse aus DNA-DNA Hybridisierungen nach der optischen Renaturierungsmethode von DE LEY et al. (1970).

Bei der Identifizierung von Plasmiden in *A.a.* wurden von LE BLANC et al. (1993) innerhalb von 39 untersuchten Wildtypstämmen lediglich drei Plasmide gefunden: das 25.42 kb Plasmid pVT745, das 2 kb Plasmid pVT736-1 und das pVT736-2 Plasmid mit einer Größe von mehr als 30 kb, das eher in Verbindung mit Gram-positiven Bakterien auftritt (GALLI & LE BLANC, 1994).

Die vielen Virulenzfaktoren von *A.a.,* wie die Bildung von Bacteriocin, Chemotaxis-Hemmfaktoren, immunsuppressive Faktoren, zytotoxische Faktoren, Fc Bindungsproteine, Lipopolysaccharide (LPS), Kollagenasen, Antibiotikaresistenz-Determinanten, Adhäsine und Invasine

(FIVES-TAYLOR et al., 1996) lassen darauf schließen, dass das Genom dieses Mikroorganismus den Grund für diese vielfältigen Pathogenitätsmechanismen liefert. So fanden beispielsweise BHATTACHARJEE et al., (2001) heraus, dass Mutationen in *flp-1* (kodiert für die Hauptuntereinheit der Pili von *A.a.*) oder in den *tad* Genen *(tadABCDEFG)* Defekte in der Fibrillenproduktion, Autoaggregation und Adhärenz verursachen. Das *tadA* Gen ist der erste Repräsentant der Unterfamilie von potentiellen Typ IV- Sekretion ATPase Genen, und die ATPase Aktivität von TadA soll für die Sekretion und Zusammensetzung der Flp Pili und somit für die ausgeprägte Adhärenz nicht subkultivierter *A.a.* Stämme verantwortlich sein. GONCHAROFF et al. (1993) gelang es, das lktA Gen, welches für Leukotoxin kodiert, zu hybridisieren. Dieses Leukotoxin gilt als bedeutender Virulenzfaktor von *A.a.*. Auch LIN et al. (1994) gelang es, Leukotoxinsequenzen über die Polymerase-Ketten-Reaktion zu ermitteln. EBERHARD et al. (2001) gelang das Klonieren und die Sequenzierung des DNA-Adenin-N^6-Methyltransferase Genes von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Dieses Gen kodiert für das Enzym Adeninmethyltransferase, welches Adenin in der Sequenz GATC methylisiert.

2.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob Aussagen zur möglichen Virulenz/Pathogenität von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* durch eine Untersuchung genomischer Marker getätigt werden können. Dabei sollte festgestellt werden, ob anhand dieser Marker Rückschlüsse hinsichtlich der durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans* hervorgerufenen akuten oder chronischen Infektionen möglich sind. Zur Ermittlung der genomischen Marker kamen zwei unterschiedliche molekularbiologische Methoden (DNA-DNA Hybridisierung und DNA-Sequenzierung) zur Anwendung.

Die Untersuchung biochemischer Merkmale im Vergleich zur genomischen Analyse sollte zum einen klären, ob bestimmte phänotypische Eigenschaften für taxonomische Untersuchungen verlässliche Marker darstellen. Hierzu sollten die Ergebnisse der Genomuntersuchungen mit den biochemischen Daten verglichen werden und hinsichtlich ihrer taxonomischen Aussagefähigkeit analysiert werden. Zum anderen sollte herausgefunden werden, ob die ermittelten Daten aus der DNA-Sequenzierung verlässliche Informationen zur mutmaßlichen Pathogenität von *A.a.* geben können. Da die Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* kaum Plasmide besitzt, gab es hierfür Hinweise.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Mikroorganismen

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 34 Bakterienstämme der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* aus der Familie *Pasteurellaceae* POHL 1979, sowohl phänotypisch als auch genotypisch untersucht. Die untersuchten Bakterienstämme entstammten der Stammsammlung MCCM, des Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Marburg und wurden dort in lyophilisierter Form unter Vakuum und dunkel bei Raumtemperatur gehalten.

Eine Auflistung aller untersuchten Bakterienstämme, sowie deren Identität, Herkunft und Bezeichnung sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

3.2 Kulturmedien und Zusätze

Als feste Nährmedien wurden Blut- und Kochblutagar verwendet (MANNHEIM et al., 1980). Als Selektivagar für *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (SLOTS, 1982b) wurde gelegentlich auch von TSBV-Agar Gebrauch gemacht. Als flüssige Nährmedien wurden Thioglycolat-Bouillon zur Anzucht der Bakterien aus dem lyophilisierten Zustand und Proteose-Peptonmedium (Basalmedium) zur Anzucht von Massenkulturen verwendet. Jedem Liter Basalmedium wurden außerdem entsprechende Wachstumsfaktoren zugesetzt (s. Tab. 2). Zu diesen Wachstumsfaktoren zählten Glucose-Stammlösung, Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung, Hefeextrakt-Stammlösung, Rinderserum und Vitox® SR 90. Feste und flüssige Kulturmedien wurden nach den unten aufgeführten Rezepturen hergestellt und supplementiert.

3.2.1 Blutagar

Es wurden industriell hergestellte Blutagarplatten *(Oxoid RPP 008B, England)* verwendet.

Grundmedium:		39,0 g	Columbia – Agar *(Oxoid CM 331,England)*
Zusammensetzung:		23,0 g/l	Pepton *(Orthana 0-24)*
		01,0 g/l	Stärke
		05,0 g/l	NaCl
		10,0 g/l	Agar
	ad.	1000 ml	Aqua dest.

Dem autoklavierten Grundmedium wurde nach Abkühlen auf 48°C steriles, defibriniertes Schafsblut zugegeben [5 % (v/v)].

3.2.2 Kochblutagar

Es wurden industriell hergestellte Kochblutagarplatten *(Oxoid RPP 010, England)* verwendet.

Grundmedium:		40,0 g	Tryptic–Soy–Agar *(Difco 0369-01-4)*
Zusammensetzung:		15,0 g/l	Tryptone
		05,0 g/l	Soytone
		05,0 g/l	NaCl
		15,0 g/l	Agar
	ad.	1000 ml	Aqua dest.

Dem autoklavierten Grundmedium wurde nach Abkühlen auf 80°C steriles, defibriniertes Schafsblut zugegeben [5 % (v/v)].

3.2.3 Trypticase-Soy-Bacitracin-Vancomycin-Agar (TSBV-Agar)

Dieser Selektivagar wurde nach unten aufgeführter Rezeptur in der Nährbodenküche (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Marburg) hergestellt.

Zusammensetzung:		40,0 g	Trypticase - Soy - Agar *(BBL 11768)*
		75,0 g	Bacitracin *(Serva 14420)*
		01,0 g	Hefeextrakt *(Difco 0127-17-9)*
		02,0 g	Glucose *(Merck 8342)*
		05,0 g	Vancomycin *(Lilly 657)*
	ad.	1000 ml	Aqua dest.

Dem autoklavierten Grundmedium wurde nach Abkühlen auf 50°C 10 % inaktiviertes Pferdeserum zugefügt.

3.2.4 Proteose-Pepton-Medium

Zusammensetzung:		20,0 g/l	Proteose Pepton Nr. 3 *(Difco, USA)*
		06,0 g/l	Natriumchlorid *(p.a., E. Merck, Darmstadt)*
		06,0 g/l	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan *(p.a., E. Merck, Darmstadt)*
	ad.	1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wird auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, für 20 Minuten bei 121°C sterilisiert und bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verwendung dunkel aufbewahrt.

3.2.5 Thioglycolat-Bouillon

Es handelt sich hierbei um ein universelles Flüssigmedium für aerobe und anaerobe Bakterien.

Grundmedium:		29,8 g	dehydrierte Thioglycolat-Bouillon
Zusammensetzung:		15,0 g/l	Casein
		05,5 g/l	Glucose
		05,0 g/l	Hefeextrakt
		00,5 g/l	L-Cystein
		02,5 g/l	NaCl
		00,5 g/l	Na-Thioglycolat
		01,0 mg/l	Resazurin
		00,7 g/l	Agar
	ad.	1000 ml	Aqua dest.

3.2.6 Glucose-Stammlösung

20 % D(+)-Glucoselösung *(E.Merck, Darmstadt)* in Aqua dest., hitzesterilisiert.

3.2.7 Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung

1 M NaHCO3 *(E. Merck, Darmstadt)* in Aqua dest., sterilfiltriert.

3.2.8 Hefeextrakt-Stammlösung

25 %ige Hefeextrakt-Lösung *(Oxoid, Ltd., London)* in Aqua dest., klarzentrifugiert, sterilfiltriert, bei 4°C dunkel gelagert.

3.2.9 Rinderserum

Serum *(Behring-Werke, Marburg)* für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert (HINZ & KUNJARA, 1977).

3.2.10 Vitox® SR 90

Definiertes, steriles Wachstumssupplement *(Oxoid Ltd., London, England)*
zur Anreicherung verschiedener Kulturmedien;

1 Fl. enthält:	0,1 mg	Vit. B12
	100 mg	L-Glutamin
	10,0 mg	Adeninsulfat
	0,30 mg	Guanin-HCl
	0,13 mg	p-Aminobenzoesäure
	11,0 mg	L-Cystin
	2,50 mg	NAD (Coenzym 1)
	1,00 mg	Cocarboxylase
	0,20 mg	Eisen (III)-Nitrat
	0,03 mg	Thiamin-HCL
	259 mg	Cystein-HCl
	1,00 g	Dextrose

Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

3.3 Reagenzien für die DNA-Präparation

3.3.1 Crombach-Puffer (var.)

Zusammensetzung:	2 M	NaCl
	0,033 M	TRIS(hydroxymethyl)aminomethan
	0,001 M	EDTA
	q. s. HCL	pH 8,0

Die Modifikation bestand in der Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2 M (nach CROMBACH, 1972).

3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)

Laurylsulfat-Na-Salz *(reinst., Serva, Heidelberg)*
25 %ig, gelöst in Aqua dest.

3.3.3 Pronase

Pronase P *(reinst., Serva, Heidelberg)*

Gelöst in:	2 ml	Tris-HCl-EDTA
Zusammensetzung		
von Tris-HCl-EDTA:	0,010 M	Tris
	0,001 M	EDTA
	q. s. HCl	pH 7,2

Das Reagenz wurde vor Gebrauch 60 Minuten bei 37°C vorinkubiert (BERNS & THOMAS, 1961; GILLESPIE & SPIEGELMAN, 1965).

3.3.4 Ribonuclease (RNase):

Ribonuclease A [lyophilisiert, frei von RNAse B, DNase, Protease *(Serva, Heidelberg)*]

0,2 %ig in 0,1 M Na-Acetat pH 5

Vor Gebrauch wurde die Lösung 10 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt.

3.3.5 Phenol-Kresol-Mischung:

Zusammensetzung:		140 ml	m-Kresol *(E. Merck, Darmstadt)*
		1 g	α-Hydroxychinolin *(p.a.,E. Merck)*
		1000 g	Phenol Krist. *(E. Merck)*
	in	110 ml	Aqua dest. gelöst

(nach KIRBY et al., 1967).

3.3.6 Kalium-Phosphat-Puffer:

Zusammensetzung:	2,5 M	Di-Kaliumhydrogenphosphat
	2,5 M	Kaliumdihydrogenphosphat ad.
	pH 7,2	

3.3.7 Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (SSC):

0,150 M	NaCl
0,015 M	tri-Natriumcitrat-2-hydrat,
	Aqua dest., pH 7,0

Der Puffer wird in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Im Text werden die Konzentrationen als Faktor vor der Pufferbezeichnung angegeben (z. B. 0,1 x SSC oder 2 x SSC).

3.4 Anzüchtung der Bakterien

Die in lyophilisierter Form konservierten Mikroorganismen wurden nach Suspension in einem Flüssigmedium (Thioglykolatmedium) auf Blutagar- oder Kochblutagarplatten ausgestrichen.
Die Inkubation der Bakterien erfolgte in einem gasdicht verschließbaren Kerzentopf (Merck, Darmstadt). Die Bakterien wurden ihren Bedürfnissen entsprechend mikroaerophil für 2-3 Tage bei 37°C bebrütet. Hierbei kam ein chemischer CO_2-Produzent (Campy-GasPak, Microaerophilic Systems, BBL, Cockeysville, Md., USA) zur Anwendung. Dadurch wurde eine CO_2-angereicherte Atmosphäre mit ca. 5-12 % CO_2 und ca. 5-15 % O_2 geschaffen (siehe Produktinformation Campy-GasPak). Untersuchungen zur Eignung standardisierter Kultursysteme wurden von DOAN et al. (1999) durchgeführt. Nach Öffnen der Kultursysteme am 2. oder 3. Tag wurden durch Abimpfen von Einzelkolonien Reinkulturen erstellt. Dies erfolgte an einer Sterilbank (Lamin Air HLB 2448 Gs, Heraeus, Hanau) mittels steriler Platinöse und fraktioniertem Drei-Ösenausstrich. Reinheit und Identität der Kolonien wurden anhand von phänotypischen und biochemischen Tests überprüft.

3.5 Kulturelle und biochemische Charakterisierung

Die phänotypische Untersuchung sowie die Überprüfung der katabolen Stoffwechselleistungen wurden durchgeführt wie bei MANNHEIM et al. (1980) beschrieben.

3.5.1 Gramfärbung

Aufgrund der hohen Affinität des sauren Cytoplasmas der Bakterienzelle zu basischen Anilinfarbstoffen wird eine cytochemische Reaktion ermöglicht, die besonders in Form der Gram-Reaktion elementare Bedeutung für die Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien erlangt hat (Gram, 1884). Mit Hilfe der Gramreaktion werden Mikroorganismen differenziert, die sich aufgrund der Alkohollöslichkeit des komplex gebundenen Gentianaviolett unterscheiden. Wirkt Karbol-Gentianaviolett und Lugolsche Lösung auf das fixierte Präparat gramnegativer Zellen ein, erfolgt eine Entfärbung mit Alkohol und anschließender hellroter Kontrastfärbung mit Safranin. grampositive Zellen halten hingegen den dunkelblau-violetten Farbstoff fest.

Lösungen für die Gramfärbung und deren technische Durchführung

1) Karbolgentianaviolett:	10 g Gentianaviolett in 500 ml Ethanol absolut
	3 Minuten

2) Lugolsche Lösung:	6 g Jodkaliumchlorid und 3 g Jod in 900 ml Aqua dest. gelöst, 2 Minuten
3) Differenzieren mit Ethanol:	96 % Ethanol
4) Gegenfärben mit Safranin:	10 g Safranin in 1000 ml Aqua dest. gelöst, 1 Minute

5) Abspülen mit Wasser

6) Trocknen

7) Ölimmersionstechnik (Schichtseite oben, kein Deckglas, offene Blende, Kondensorlinse in Objekttischhöhe) zur Betrachtung des gefärbten bakteriologischen Präparates

3.5.2 Katalase-Reaktion

Nachweis von Cytochromsystemen:
Katalase-postive Keime besitzen ein Cytochromsystem
Katalse-negative Keime sind cytochromlos

1 Tropfen des Katalasereagenz wurde auf einen Objektträger gegeben und eine Bakterien-einzelkolonie wurde darin emulgiert. Im positiven Fall kommt es zu einer Gasentwicklung in Form von Blasenbildung.

3 % ige Wasserstoffperoxidlösung in physiologischer NaCl-Lösung
(Perhydrol p. A. 30 %iges H_2O_2 z. A., Merck, Darmstadt)

3.5.3 TMPD-Oxidase-Reaktion

Circa 10-60 Sekunden nach Auftropfen von TMPD-Reagenz auf eine 24-48 Stunden alte Kolonie trat im Falle einer positiven Reaktion eine intensive Blaufärbung auf, die auf enzymatischer Oxidation des Nadi-Gemisches und der Bildung von Indophenolblau beruhte. Die Nadi-Reaktion geht mit einem relativ hohen Gehalt an c-typischen Cytochromen einher. Durch nachträgliches Betropfen einer Nachbarkolonie konnte sichergestellt werden, dass die beobachtete Blaufärbung auf eine aktive Leistung anstatt der Eigenfarbe der autooxydablen TMPD-Lösung zurückzuführen war.

3.5.4 Bunte Reihe

Zur Überprüfung der katabolen Stoffwechselleistungen wurde eine „Bunte Reihe“ angelegt (COWAN, 1974). Eine sterile Mineralbasislösung wurde mit Kolonien des jeweils zu untersuchenden *A.a.* Stammes (ca. 1mg feucht) beimpft und auf dem Rüttler homogenisiert. Die

Substratröhrchen wurden mit je 5 Tropfen dieser Suspension beimpft. Das Ablesen der Fermentationsreaktion erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden sowie nach einer Woche. MAC FADDIN (2000) liefert eine eingehende Beschreibung der verwendeten biochemischen Reaktionen und des jeweiligen Testprinzips.

3.5.4.1 Verwertung von Kohlenhydraten

Die Substratröhrchen wurden mit Proteosepeptonwasser gefüllt und mit Kohlenhydrat-, deren Alkohol- oder Glycosidzusätzen versetzt. Als blaue Indikatorsubstanz diente Bromthymolblau. Anschließend erfolgte eine Tyndallisierung (2-3maliges Erhitzen auf 60-80°C).
Folgende Zucker wurden verwendet: D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, L-Arabinose, D-Xylose, Lactose, Maltose, Saccharose, Trehalose, Raffinose, Mannitol, Sorbitol, Salicin.
Im Falle des flüssigen Glucosemediums befand sich im Reagenzglas zusätzlich ein Durham-Röhrchen zum Auffangen von Gas, welches während des fermentativen Kohlenhydratabbaues entstehen kann. Die Säurebildung wurde durch einen Farbumschlag der den Kulturmedien beigefügtem Indikator angezeigt. Nach Zugabe der Bakteriensuspension war im Falle einer positiven Reaktion nach circa 4 Tagen ein Farbumschlag von Blau nach Gelb zu verzeichnen.

3.5.4.2 Aminosäuredecarboxylasen

Zur Prüfung der Ornithin- bzw. Lysindecarboxylaseaktivität wurden die Substratröhrchen mit einem Medium nach MÖLLER (1955) auf Proteosepetonbasis versetzt, welchem anschließend 5 g Ornithin L(+)-monochlorid (Merck), bzw. 5 g Lysinmonohydrochlorid (Merck) hinzugefügt wurden. Danach erfolgte die Beimpfung mit der Bakteriensuspension.
Eine Lilafärbung nach circa 4 Tagen wies auf eine positive Reaktion hin.

3.5.4.3 Urease

Hier fand der Ureasetest nach LAUTROP (1960) Verwendung. Als Indikatorsubstanz wurde dem Röhrchen Phenolrot zugesetzt, und es erfolgte die Beimpfung mit der Bakteriensuspension. Im Falle einer positiven Reaktion kam es nach circa 4 Tagen zu einer deutlichen Rotfärbung.

3.5.4.4 Citrat

Die Substratröhrchen wurden mit flüssigem Ammoniumcitratmedium (Simmon's Citrat) und mit Bromthymolblau als Indikatorsubstanz versetzt. Kam es nach der Beimpfung zu einer Gelbfärbung, deutete dies auf eine positive Reaktion hin.

3.5.4.5 Nitratreduktion

Es wurden 0,2 g Kaliumnitrat (Merck) und 5 g Pepton (Orthana) in 1 Liter Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend erfolgte das Abfüllen von je 0,5 ml in Reagenzgläser und das zweimalige Aufkochen im Dampftopf für jeweils 30 Minuten. Danach wurden die Röhrchen mit der Bakteriensuspension beimpft und für 96 Stunden inkubiert. Beim Abbau von Nitrat können außer Nitrit auch Reduktionsprodukte des Nitrits, insbesondere Ammoniak und/oder N_2 auftreten (Nitritreduktion). Daher erfolgte zunächst die Überprüfung einer möglichen Gasbildung (Ansammlung von Gasblasen im Durham-Röhrchen). Es folgte die Zugabe von jeweils 2 Tropfen der Lösung A und 2 Tropfen der Lösung B (Griess-Reagenz), wobei ein Farbumschlag des ursprünglich farblosen Mediums nach rot bis hin zum braunroten Präzipitat auf eine positive Reaktion hindeutete (Nachweis der Nitrit-Bildung aus Nitrat). Das Reaktionsmaximum war innerhalb von 15 Minuten erreicht. War die Reaktion negativ (keine Rotfärbung), fand eine Überprüfung des Mediums mit Zinkpulver statt. Dem durch das Nitritreagenz bereits angesäuertem Gemisch wurde eine Spatelspitze Zinkpulver zugesetzt. Im Kulturmedium noch vorhandenes Nitrat wurde durch eine nunmehr langsam eintretende positive Nitritreaktion (Rotfärbung) angezeigt, d. h. während der Bebrütung des Substratröhrchens mit dem Testkeim ist kein Nitrit aus Nitrat gebildet worden (negative Nitritreaktion). Bei ausbleibender Rotfärbung nach Zugabe von Zinkpulver wurde Nitrat über Nitrit zu Ammoniak abgebaut und die Reaktion als positiv gewertet.

Griess-Reagenz:
Lösung. A: 8 g Sulfanilsäure (Merck) gelöst in 1 Liter 5 N Essigsäure
Lösung. B: 5 g Alpha-Naphtylamin (Merck) gelöst in 1 Liter 5 N Essigsäure

3.5.4.6 Indol

Nach 96 Stunden Bebrütungszeit wurde einer Trypsinbouillon nach FRIEBER (1921) KOVACS-Reagenz (1928) zugesetzt. Eine positive Reaktion ist durch einen roten Ring zwischen der Trypsinboullion und dem Kovacs-Reagenz gekennzeichnet.

3.5.4.7 Äskulinhydrolyse-Testmedium

1 g Äskulin und 0,5 g Ferricitrat (Merck) wurden in 1 Liter wässriger Peptonlösung (1g NaCl und 2 g Pepton in 200 ml Aqua dest., pH 8) gelöst. Davon wurden jeweils 5 ml in Reagenzgläser abgefüllt und 10 Minuten autoklaviert. Der Test wird zur Identifizierung von Enterokokken verwendet, die das Substrat Äskulin spalten können. Das bei der Hydrolyse entstehende Aglykon bildet mit dem in der Testbouillon vorhandenen Eisen-Ammonium-Zitrat einen schwarzen Niederschlag, so dass eine positive Reaktion durch eine Schwarzfärbung des Mediums gekennzeichnet ist.

3.5.4.8 Alkalische Phosphatase

Bei einem pH von 7,2 wurde zu Proteosepeptonmedium Phenolphthaleinphosphat gegeben (0,01 Gew.%). Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration. Von dem Medium wurden jeweils 3 ml in Reagenzgläser abgefüllt und danach erfolgte das Beimpfen mit der Bakteriensuspension. Nach 96 Stunden erfolgte die Zugabe von 1 ml 1 N NaOH. Bei Rotfärbung handelte es sich im Vergleich zum unbeimpften Kontrollröhrchen um eine positive Reaktion.

3.5.4.9 β-Glucosidase (ONPG)

Proteosepeptonmedium wurde mit der Bakteriensuspension beimpft und anschließend ein Testblättchen (Institut Pasteur, Paris) zugegeben. Nach 4 Stunden Bebrütungsdauer wurde das Ergebnis abgelesen. Eine positive Reaktion war durch eine Gelbfärbung erkennbar.

3.6 Kommerzielle Schnelltestsysteme

3.6.1 Identifizierung mit Hilfe des BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*-Testsystems

Das BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*-Testsystem (Becton Dickinson Europe, Pre Pichat, Chemin des Sources, 38240 Meylan, France) dient zur Identifizierung häufig isolierter *Neisseria* und *Haemophilus*- sowie einiger anderer anspruchsvoller Bakterien aus klinischen Proben.

Bei diesem miniaturisierten Testsystem wurden modifizierte konventionelle, fluorogene und chromogene Substrate gebraucht, wobei die verwendeten Tests eine Modifizierung klassischer Methoden darstellten. Darunter befinden sich, wie auch bei der „Bunten Reihe“, Tests zum Nachweis von Gärung, Oxydation, Abbau und Hydrolyse verschiedener Substrate, sowie

zusätzlich chromogen- und fluorogengebundene Substrate zum Nachweis von Enzymen, die die Mikroorganismen zur Metabolisierung verschiedener Substrate verwenden. Das Testsystem wurde unter aeroben Bedingungen beimpft und inkubiert, denn ein weiteres Wachstum der Bakterien wurde nicht vorausgesetzt. Empfohlen wurde das vorherige Anzüchten der einzelnen Bakterienstämme auf Medien wie Schokoladenagar, Trypticase-Soja-Agar mit 5 % Schafsblut (TSA), Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut (Columbia) und Nährstoff-Agar, wobei die Testkultur eine höchstens 18-24 h alte Reinkultur sein durfte. Da es sich bei *Actinobacillus actinomycetemcomitans* um einen verhältnismäßig langsam wachsenden Organismus handelt, konnten in diesem Fall bis zu 48 h alte Reinkulturen verwendet werden. Das Testsystem besteht aus einem Deckel, der 29 getrocknete biochemische und enzymatische Substrate, sowie eine fluoreszierende negative Kontrolle enthält. Mehrere morphologisch gleiche Kolonien wurden mit der Spitze eines sterilen Baumwolltupfers abgenommen und in der in Röhrchen enthaltenen Inokulumsflüssigkeit suspendiert. Die Röhrchen wurden anschließend auf dem Rüttler für etwa 10-15 Sekunden homogenisiert. Die Trübung sollte anschließend einem McFarland Standard Nr. 3 entsprechen. Danach wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens in alle 30 Vertiefungen des Untersatzes gefüllt und der Deckel auf dem Untersatz hinuntergedrückt, bis er einrastete. Durch die zugeführte, beimpfte Inokulumsflüssigkeit wurden die getrockneten Substrate rehydriert und die Testreaktion eingeleitet. Die beimpften Panels wurden in Inkubationsschalen gestellt und unter aeroben Bedingungen bei 35-37°C im Brutraum für 4 Stunden inkubiert. Der Inkubator sollte eine Luftfeuchtigkeit von 40-60 % und eine CO_2freie Atmosphäre aufweisen. Nach der Inkubationszeit wurden innerhalb von 30 Minuten die Vertiefungen mit den Bezeichnungen F bis J mit einer regulären Lampe (weißes Licht), die Spalten A bis E (fluoreszierende Substrate) mit der UV-Lampe im BD Crystal Panel-Betrachter auf Farbumschläge und Floureszenz untersucht, die durch eine metabolische Aktivität der Mikroorganismen entstanden waren. Das sich ergebende Muster der 29 Reaktionen wurde in eine zehnziffrige Profilnummer umgewandelt (s. Abb. 1), die als Basis für die Identifizierung des verwendeten Mikroorganismus diente. Biochemische und enzymatiche Reaktionsmuster für das 29 Substrate umfassende BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*-Testsystem waren für eine Vielzahl von Mikroorganismen in der BD CRYSTAL-Datenbank in Form eines installierten elektronischen Codebuches gespeichert. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der errechneten Profilnummer und der bekannten Zellmorphologie jedes einzelnen Stammes mit denen in der Datenbank des Computers gespeicherten Reaktionsmustern.

3.6.2 Reagenzien des Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*

Die benötigten Reagenzien wurden von dem Hersteller Becton Dickinson Europe geliefert.

Inokulumsflüssigkeit:

KCl		7,5 g
$CaCl_2$		0,5 g
Tricin N-*[2-Hydroxy-1,1-bis (Hydroxymethyl)-Methyl]*-Glycin		0,895 g
Aqua dest.	ad.	1000 ml

Im BBL CRYSTAL N/H ID-Sytem verwendeten Reagenzien:

Panelposition	**Reaktive Bestandteile**
4A	Fluoreszierendes Cumarinderivat
2A	4MU-Phosphat
1A	L-Prolin-AMC
4B	L-Serin-AMC
2B	LYS-ALA-AMC
1B	L-Tryptophan-AMC
4C	L-Phenylamin-AMC
2C	N-Sukzinyl-ALA-PRO -ALA-AMC
1C	ALA-ALA-PHE-AMC
4D	L-Glutaminsäure-AMC
2D	L-Arginin-AMC
1D	Ornithin-AMC
4E	Glyzin-AMC
2E	GLY-PRO-AMC
1E	4MU-β-D-Galaktosid

Die Reaktionen der oben aufgelisteten Substrate konnten nach Zugabe der Bakteriensuspension als positiv bewertet werden, wenn die einzelnen Panelvertiefungen eine stärkere Fluoreszenz als die fluoreszierende, negative Kontrolle (Panelposition 4A, FCT-Vertiefung) aufwiesen. Das wurde mit der im Panel-Betrachter integrierten UV-Lampe überprüft.

4F	Saccharose
2F	Maltotriose
1F	Karubinose
4G	Pyranose

2G	Maltobiose
1G	Disaccharid
4H	Riberol
2H	Lävulose

Die Reaktionen der oben aufgelisteten Substrate konnten nach Zugabe der Bakteriensuspension als positiv bewertet werden, wenn die einzelnen Panelvertiefungen einen goldgelben Farbumschlag aufwiesen, während ein orange/roter Farbumschlag auf eine negative Reaktion hinwies (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1H	p-n-p-Phosphorylcholin
4I	γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide
2I	p-n-p-Phosphat
1I	ONPG

Die Reaktionen der oben aufgelisteten Substrate konnten nach Zugabe der Bakteriensuspension als positiv bewertet werden, wenn die einzelnen Panelvertiefungen durch einen gelben Farbumschlag gekennzeichnet waren. Negative Reaktionen waren anhand farbloser Panelvertiefungen erkennbar (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

4J	Harnstoff

Kam es zu einer positiven Reaktion nach Zugabe der Bakteriensuspension, so zeigte sich ein aquamarinblauer Farbumschlag an Panelposition 4 J. Bei einer negativen Reaktion wies die entsprechende Panelvertiefung einen gelb/grünen Farbumschlag auf (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

2J	Reazurin

Bei einer positiven Reaktion des Substrates nach Zugabe der Bakteriensuspension, wies die Panelvertiefung einen rosa Farbumschlag auf. Ein blau/lila Farbumschlag war hingegen ein Hinweis auf eine negative Reaktion (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1J Ornithin

Kam es zu einer positiven Reaktion nach Zugabe der Bakteriensuspension, zeigte sich ein lila Farbumschlag an Panelposition 1J. Bei einer negativen Reaktion wies die Panelvertiefung stattdessen eine gelb/graue Farbe auf (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).
Die Prinzipien der Verwertung und des Abbaus der einzelnen Wirkstoffe basieren unter anderem auf Veröffentlichungen von MANAFI et al. (1991), COWAN et al. (1974) und MAC FADDIN (2000).

3.6.3 Identifizierung mit Hilfe des BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter* -Testsystems

Dieses System dient der Identifizierung klinisch wichtiger, aerober gramnegativer Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* und einigen anderen gramnegativen Bakterien, die Glukose entweder fermentieren oder nicht. Auch hier finden sich wie bei dem unter Punkt 3.6.1 genannten BD BBL CRYSTAL™-*Neisseria/Haemophilus*-Testsystem Modifikationen der klassischen Methoden, wie Fermentations- und Oxidationstests als auch Abbau- und Hydrolysetests verschiedener Substrate.
Das *E/NF*-ID-KIT bestand aus den gleichen Uttensilien wie das zuvor beschriebene *N/H*-ID-Kit und war auch wie dieses zu handhaben (s. Kpt. 3.6.1). Unterschiede fanden sich in der Zusammensetzung der 30 Reagenzien in Form dehydrierter enzymatischer/biochemischer Substrate und der Inokulumsflüssigkeit. Die Inkubationszeit betrug hier 18-20 Stunden bei 35-37°C. Mit Hilfe des BBL CRYSTAL-Leuchtkastens konnten die Panels anschließend betrachtet und anhand der Farbreaktionstabelle beurteilt werden. Durch Addition der den positiven Testergebnissen zugeordneten Werte in den jeweiligen Reihen A bis J ergab sich eine zehnstellige Profilnummer (s. Abb. 2). Sowohl diese Nummer als auch die mittels „Bunter Reihe“ ermittelten Testergebnisse der Indol- und Oxidasereaktion wurden computergestützt (elektronisches Codebuch) ausgewertet. Die im BD BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter*–ID–System verwendeten Tests basieren auf der mikrobiellen Nutzung und dem mikrobiellen Abbau spezifischer Substrate, welche von verschiedenen Indikatorsystemen nachgewiesen werden. Gärungsreaktionen weisen die Fähigkeit eines Isolates nach, unter Ausschluß von Luftsauerstoff Kohlenhydrate zu metabolisieren, und Oxidationsreaktionen basieren auf der Fähigkeit eines Organismus, das Substrat mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu metabolisieren. Beide Reaktionen werden in der Regel durch die Verwendung eines pH-Indikators im Testsubstrat nachgewiesen. Bei Hydrolyse produzieren chromogene Substrate Farbumschläge, die visuell nachgewiesen werden können.

3.6.4 Reagenzien des Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter*

Die benötigten Reagenzien wurden von dem Hersteller Becton Dickinson Europe geliefert.

Inokulumsflüssigkeit:

NaCl		8,50 g
3-Morpholinopropansulfonsäure		0,8372 g
Aqua dest.	ad.	1000 ml

Im BBL CRYSTAL™-*Enteric/Nonfermenter* ID-Sytem verwendeten Reagenzien:

Panelposition	**Reaktive Bestandteile**
4A	Arabinose
4B	Mannose
4C	Saccharose
4D	Melibiose
4F	Rhamnose
4F	Sorbit
4G	Mannitol
4H	Adonit
4I	Galaktose
4J	Inosit

Durch die Verwertung von Kohlenhydraten kam es zu einem pH-Abfall und zu einem Indikatorumschlag (Phenolrot). Wiesen die oben genannten Panelvertiefungen eine gold-gelbe Farbe auf, war die Reaktion nach Zugabe der Bakteriensuspension positiv. Eine orange/rote Farbe wies hingegen auf eine negative Reaktion hin (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

2A	P-n-p-Phosphat
2B	P-n-p-α-β-Glukosid
2C	P-n-p-β-Galaktosid

Durch die enzymatische Hydrolyse von farblosem Aryl-substituierten Glycosid oder Phosphatester wurde gelbes p-Nitrophenol freigesetzt. Eine positive Reaktion zeigte sich bei allen drei Panelvertiefungen durch einen gelben Farbumschlag nach Zugabe der Bakteriensuspension. Blieben die Panelvertiefungen farblos, so war dies ein Hinweis auf eine negative Reaktion (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

2D Prolin-Nitroanilid

Durch enzymatische Hydrolyse des farblosen Amid-Substrates wurde gelbes P-Nitroanilin freigesetzt.
Daher war eine positive Reaktion durch eine Gelbfärbung nach Zugabe der Bakteriensuspension gekennzeichnet, während es sich bei einer farblosen Panelvertiefung um eine negative Reaktion handelte (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

2E	P-n-p-Biphosphat
2F	P-n-p-Xylosid
2G	P-n-p-α-Arabinosid
2H	P-n-p-Phosphorylcholin
2I	P-n-p-β-Glukuronid
2J	P-n-p-N-Acetylglukosaminid

Durch die enzymatische Hydrolyse von farblosem Aryl-substituierten Glykosid oder Phosphatester wurde gelbes p-Nitrophenol freigesetzt. Eine positive Reaktion war durch eine Gelbfärbung nach Zugabe der Bakteriensuspension gekennzeichnet. Bei einer negativen Reaktion blieb die entsprechende Panelvertiefung farblos (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1A γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid

Durch enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrates wurde gelbes p-Nitroanilin freigesetzt, so dass eine positive Reaktion nach Zugabe der Bakteriensuspension durch eine Gelbfärbung gekennzeichnet war. Bei einer negativen Reaktion blieb die Panelvertiefung farblos (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1B Äskulin

Durch die Hydrolyse von Äskulin wurde ein schwarzes Präzipitat in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen erzeugt, so dass eine positive Reaktion eine braune/kastanienbraune Färbung der Panelvertiefung nach Zugabe der Bakteriensuspension hervorrief, während eine negative Reaktion dazu führte, dass die Panelvertiefung farblos/strohfarben blieb (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1C p-Nitro-DL-Phenylalanin

Durch oxidative Desaminierung von Phenylalanin wurde eine braune Farbe in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen erzeugt, so dass eine positive Reaktion zu einer gold/dunkelorangen Verfärbung der Panelvertiefung nach Zugabe der Bakteriensuspension führte. Eine negative Reaktion war durch eine Gelbfärbung der Panelvertiefung gekennzeichnet (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1D Harnstoff

Durch Hydrolyse von Harnstoff und das daraus resultierende Ammonium führten zum Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau). Eine positive Reaktion war durch einen blau/blaugrünen Farbumschlag nach Zugabe der Bakteriensuspension gekennzeichnet, während es bei einer negativen Reaktion zu einer gelbgrünen Verfärbung der Panelvertiefung kam (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1E Glyzin

Durch Abbau von Glyzin enstanden alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) auslösten. Somit ließ sich die positive Reaktion anhand eines blau/blaugrünen Farbumschlages nach Zugabe der Bakteriensuspension erkennen, während eine positive Reaktion durch eine Gelb/Grün- Färbung gekennzeichnet war (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1F Citrat

Durch Abbau von Citrat entstanden alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) auslösten. Eine positive Reaktion rief eine Hellblau/Blau-Färbung nach Zugabe der Bakteriensuspension hervor, während eine negative Reaktion an einer Gelb/Grün-Färbung der Panelvertiefung erkannt wurde (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1G Malonsäure

Durch Verwertung von Malonat entstanden alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau) hervorriefen. Bei einem hellblau/blauem Farbumschlag nach Zugabe der Bakteriensuspension handelte es sich um eine positive Reaktion, während eine negative Reaktion durch einen gelb/grünen Farbton der Panelvertiefung gekennzeichnet war (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1H Triphenyltetrazoliumchlorid

Durch Reduktion der Tetrazoliumverbindung kam es zur Bildung von rotem Formazan.
Kam es nach Zugabe der Bakteriensuspension zu einem rosa/rotem Farbumschlag handelte es sich um eine positive Reaktion, während eine farblose Panelvertiefung kennzeichnend für eine negative Reaktion war (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

1I Arginin
1J Lysin

Durch anaeroben Katabolismus kam es zu einem pH-Anstieg und zu einem Farbumschlag des Indikators Bromkresolviolett. Eine rot/violette Färbung der Panelvertiefungen nach Zugabe der Bakteriensuspension sprach für eine positive Reaktion, während eine negative Reaktion eine Gelb/Braun-Färbung hervorrief (s. mitgelieferte Farbtabelle vom Hersteller).

Die Prinzipien der Verwertung und des Abbaus der einzelnen Wirkstoffe basieren unter anderem auf Veröffentlichungen von MANAFI et al. (1991), FORBES et al. (1998), COWAN (1974), MAC FADDIN et al. (2000) und MÖLLER (1955).

3.7 Produktion von Zellmasse für die DNA-Gewinnung zur DNA–DNA Hybridisierung

3.7.1 Vorkultur

Als Vorkultur und somit als Ausgangspunkt für alle weiteren Arbeiten diente eine Kochblutagarkultur, auf der die Bakterien durch Ausstreichen einer typischen Einzelkolonie kloniert worden waren. Diese Vorkulturen waren am Tag ihrer Verwendung zwei Tage alt.

3.7.2 Massenkulturen im Feed-batch-Verfahren

Bei der Anzucht der Bakterien wurde das Feed-batch-Verfahren verwendet, bei welchem in zwei Vorgehensstufen eine umfangreiche Vermehrung der einzelnen Bakterienstämme angestrebt wurde.
Hierbei fanden routinemäßig 1 l Steilbrustflaschen Verwendung. Diese wurden mit jeweils gleicher Menge des Basalmediums (Proteose-Peptonmedium) und der in Tabelle 2 aufgelisteten Wachstumsfaktoren gefüllt und bei 37°C vorbebrütet. Anschließend wurden sie mit je einem 1 cm^2 großen Stückchen Kochblutagar beimpft, welches zuvor mittels steriler Platinöse aus einer bewachsenen Agarplatte ausgestochen worden war. Die Kochblutagar-Stückchen waren jeweils mit typischen Einzelkolonien der zu untersuchenden *A.a.* Stämme bewachsen. Die inokulierten Steilbrustflaschen wurden bei 37°C stehend bebrütet, bis eine sichtbare Trübung eintrat (Δ_{E578} = 0,2). Die sterilfiltrierte 1 M $NaHCO_3$-Lösung diente zur Einstellung des Säuregehaltes der Kultur ad. pH 7,0. 300–500 ml jeder Kultur wurden in 2 l Fernbachkolben (Jenaer Glaswerke, Schott u. Gen. , Mainz) überführt. Diese wurden auf einem Rundschüttler (G 25 New Brunswick, Scientific Co., New Brunswick, New York) mit 90 rpm bis zum Eintritt in die maximal stationäre Phase inkubiert, die aufgrund der Trübungsentwicklung (Transmission bei 578 nm) bestimmt wurde.

3.7.3 Reinheitskontrollen

Bevor die Kulturen geerntet wurden, fand eine mikroskopische Kontrolle auf Reinheit statt. Dafür wurde von jeder Kultur ein nach Gram gefärbtes Präparat angefertigt und beurteilt. Zusätzlich wurde von jedem Massenkulturansatz ein Ausstrich auf Kochblutagar angefertigt und die Reinheit mittels Koloniemorphologie beurteilt.

3.7.4 Ernte der Bakterien

Nachdem die frühstationäre Phase erreicht war, wurden die Kulturen in einer Kühlzentrifuge (Mod. J-21B, Beckman Instruments GmbH, München) mit 8800 x g und bei 4°C sedimentiert. Die Pellets wurden in 1 x SSC gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 20–40 ml 1 x SSC resuspendiert.
Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellsuspensionen bei -25°C tiefgefroren.

3.8 DNA-Isolierung für die DNA-DNA Hybridisierung

Als Grundlage diente die von DE LEY et al. (1970) veröffentlichte Methode, welche eine Kombination der Methoden von MARMUR (1961) und KIRBY et al. (1967) darstellt. Die hier verwendete, modifizierte Methode ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Für die DNA-Extraktion wurden Feuchtzellen entsprechend 2,0-4,5 g Bakterientrockensubstanz verwendet. Die für die Isolierung der DNA benötigten Lösungen finden sich zusammengefasst in Abbildung 4. Die Natriumchlorid-Natriumcitrat-Stammlösung (20 x SSC) wurde je nach Bedarf verdünnt (10 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC).

3.8.1 Bakterienaufschluss

Um die Inaktivierung und Zerstörung zelleigener DNasen herbeizuführen, wurden die aufgetauten Zellsuspensionen mit dem im Crombach-Puffer (CROMBACH, 1972) enthaltenen EDTA, mit Pronase P und mit Natriumlaurylsulfat (SDS) lysiert: Die aufgetauten Zellsuspensionen wurden mit dem gleichen Volumen Crombach-Puffer versetzt und für 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad gerührt *(Elektrorührer ES 5, Kika-Werke, Staufen)*. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde der Zellsuspension 50 µg/ml Pronase P und bis zu 10 % (v/v) SDS (abhängig vom Lyseverhalten des Bakterienstammes) zugefügt, um die Nucleinsäuren aus den Zellen freizusetzen. Die Pronase wurde zuvor eine Stunde in 2,0 ml Tris-HCl-EDTA bei 37°C vorinkubiert (BERNS & THOMAS, 1961; GILLESPIE & SPIEGELMANN, 1965). Nach 3–6 Stunden Inkubation im Wasserbad unter ständigem Rühren waren die Zellen lysiert, die Lösung klar und viskös.

3.8.2 DNA–Präparation: Ausfällen der DNA und Deproteinierung

Das Lysat wurde nach dem Abkühlen auf 4°C mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt (MARMUR, 1961) und für 30 Minuten bei 500 rpm vorsichtig mit einem Elektrorührer *(Typ E 60, Heidolph Elektro KG, Kelheim)* gerührt. Durch

Zentrifugieren bei einer mittleren relativen Zentrifugalkraft von 15 000 x g für 10 Minuten wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt *(Zentrifuge Model J – 21 B, Beckman Instruments GmbH, München)*. Anschließend wurden der wässrigen, DNA-haltigen Phase 2 % (v/v) einer gesättigten NaCl-Lösung zugesetzt und die DNA mit dem doppelten Volumen an eiskaltem, absoluten Ethanol (1h, -20°C) ausgefällt. Zur weiteren Präparation wurde nur DNA verwendet, die sich auf einen Glasstab wickeln ließ. Dadurch war gesichert, dass kurzkettige DNA-Fragmente und autonome Plasmid-DNA von intakter, langkettiger DNA getrennt wurden. Die in 0,1 x SSC gelöste DNA wurde durch Zugabe von 10 x SSC auf 1 x SSC konzentriert. Durch mehrmaligen Wechsel von Rühren mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) für jeweils 15 Minuten und Zentrifugation wurden die Proteine und das SDS von der DNA getrennt, bis keine weiße Mittelschicht mehr vorhanden war. Im Anschluß wurde nochmals, wie oben beschrieben, mit Ethanol ausgefällt und gelöst. Um DNA–Verluste zu vermeiden und die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Mittelschichten gesammelt, in 0,1 x SSC gelöst und mit 10 x SSC auf eine Konzentration von 1 x SSC gebracht. Anschließend wurde mehrmals mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gerührt, zentrifugiert und die DNA wie beschrieben mit Ethanol ausgefällt und gewickelt. Nach Lösen in 0,1 x SSC und Konzentrieren auf 1 x SSC mit 10 x SSC, wurde die neu gewonnene DNA mit der restlichen DNA–Lösung vereinigt.

3.8.3 Entfernung von RNA

Um eine Verunreinigung der DNA mit RNA zu verhindern, wurde die DNA-Lösung zur Hydrolyse eventuell vorhandener RNA mit Ribonuclease A (50 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung kontaminierender DNasen wurde die RNase vorher in 2,0 ml 0,1 M Na-Acetat aufgenommen und 10 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt (THOMAS et al., 1967).

3.8.4 Entfernung von Polysacchariden

Da die DNA bis zu diesem Zeitpunkt noch durch Polysaccharide kontaminiert war, erkennbar an der Opaleszenz der Lösung, wurde die DNA–Lösung auf 0,5 M NaCl eingestellt, mit dem 0,5 fachen Volumen Phenol/Kresol (1:1) ausgeschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert.
Die nach der Zentrifugation auftretenden Mittelschichten wurden in 1 x SSC aufgenommen, erneut in Phenol/Kresol geschüttelt und zentrifugiert, um DNA-Verluste zu vermeiden. Die gesammelten wässrigen Überstände wurden mit Na-Benzoat zu einer Endkonzentration von 20 % (w/v) versetzt.

Dies erhöhte die Löslichkeit der DNA für die nachfolgende spezifische DNA-Fällung mit 0,2 bis 0,25 Volumen m-Kresol. Das m-Kresol wurde der auf 0°C abgekühlten Lösung tropfenweise zugegeben, vorsichtig untergeschlagen und die Lösung für mehrere Stunden bei 0°C im Eiswasserbad belassen. Anschließend wurde die ausgefällte DNA durch niedrigtouriges Zentrifugieren sedimentiert, in 0,1 x SSC gelöst und 16 Stunden bei 4°C gegen das 40-fache Volumen 0,1 x SSC dialysiert.

3.8.5 Eliminierung von Lipiden und niedermolekularen Kontaminationen

Zur Abtrennung von lipophilen Verunreinigungen wurde die in 0,1 x SSC gelöste DNA mit 1 Volumen 2,5 M Kalium-Phosphat-Puffer und 1 Volumen 2-Methoxyethanol 15 Minuten ausgeschüttelt und anschließend für 45 Minuten bei 11500 x g getrennt. Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde mit 2 % (v/v) NaCl-Lösung (gesättigt) versetzt und die DNA anschließend mit dem doppelten Volumen eiskalten Ethanols ausgefällt. Nach 30–60 Minuten wurde die DNA aufgewickelt und nach Auspressen des Ethanols in 0,1 x SSC gelöst. Im Anschluß folgte jeweils eine Dialyse für 16 Stunden gegen 1 x SSC sowie 30 Stunden gegen 0,1 x SSC mit einmaligem Pufferwechsel zur Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen. Die nun hochgereinigte DNA wurde für 5 Minuten bei 20500 x g ein letztes Mal abzentrifugiert und bei -80°C gelagert.

3.9 Konzentration und Reinheit der DNA-Präparate für die DNA-DNA Hybridisierung

An einem registrierenden Spektralphotometer *(IMA-Gilford, Modell 250)* wurden von den in 1cm Quarzküvetten enthaltenen DNA-Präparaten Absorptionsspektren zwischen 220 nm und 320 nm aufgenommen. Anhand dieser ermittelten Spektren lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit und Konzentration der DNA ziehen (THOMAS & ABELSON, 1967).

3.9.1 Konzentration der DNA–Lösungen

Die Konzentration der DNA-Lösungen ist der Höhe des Extinktionsmaximums proportional, wobei die spezifische Absorption der DNA bei 260 nm liegt und 0,02 $cm^2/\mu g$ beträgt (CHARGAFF, 1955). Nach CRYER et al. (1975) entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml, und so kann dann analog die jeweilige Konzentration berechnet werden.

3.9.2 Reinheit der DNA–Präparate

DNA hat ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum mit Maxima bei 208 nm und 260 nm und einem Minimum bei 234 nm. Eine Verunreinigung der DNA führt daher zu einem Absorptionsanstieg bei 208 nm, was zu einem Überlappen des Minimums bei 234 nm führt. Hier kann der Quotient aus $\Delta_{E260} : \Delta_{E234}$ zur Beurteilung der DNA–Reinheit herangezogen werden. Da Proteine spezifisch bei 280 nm absorbieren, wird bei DNA der Quotient $\Delta_{E260} : \Delta_{E280}$ zur Beurteilung des Grades der Verunreinigung durch Proteine gewählt. Die Absorptionsquotienten $\Delta_{E260} : \Delta_{E234}$ sowie $\Delta_{E260} : \Delta_{E280}$ (s. Tab. 5) erlauben daher eine Aussage hinsichtlich der Protein- bzw. RNA-Kontamination und sollten bei hochgereinigter DNA zwischen 1,8 und 2,2 bzw. 1,6 und 2,0 liegen (THOMAS und ABELSON, 1967). JOHNSON (1981) merkt jedoch an, dass der Extinktionskoeffizient für Proteine deutlich niedriger als der für Nukleinsäuren liegt, so dass der Quotient $\Delta_{E260} : \Delta_{E280}$ als nicht besonders sensitiv angesehen werden muss.

3.10 Fragmentierung der DNA für die DNA-DNA Hybridisierung

Für die DNA-DNA Hybridisierung wurden die DNA–Proben mittels einer French-Pressure-Cell-Press (Aminco, Silver Springs, USA) mit einem Druck von 21000 psi bei einer Durchflußrate von 1–2 ml/Minute in definierte Einzelfragmente zerlegt. Nach Untersuchungen von POHL (1979) ergibt sich hierbei eine mittlere Fragmentgröße von $1{,}1 \times 10^6$ Dalton.

3.11 DNA–DNA Hybridisierung

3.11.1 Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit wurde die optische Renaturierungsmethode von DE LEY et al. (1970) verwendet. Sie basiert auf den Renaturierungskinetiken wie sie von MARMUR & DOTY (1962) sowie WETMUR & DAVIDSON (1968) für denaturierte DNA beschrieben wurden: Bei thermisch denaturierter DNA in Lösung lässt sich der Grad der Renaturierung und somit der Grad der Heteroduplexbildung bei 260 nm am Spektralphotometer aufzeichnen. Der Grad der Heteroduplex-Bildung ist der gemessenen Absorptionsabnahme direkt proportional. Durch Vergleich initialer Reassoziationskinetiken zweier unterschiedlicher DNA–Lösungen mit der ihrer Mischung kann die Basensequenzähnlichkeit anhand des Ausmaßes der Heteroduplexbildung bestimmt werden und somit indirekt auch der Verwandschaftsgrad der Genome. Eine zusammenfassende Beschreibung der Methode findet sich bei DE LEY (1971): Für die DNA-DNA-Hybridisierung nach der optischen Methode benötigt man für *Enterobacteriaceae* eine optimale DNA-Konzentration von 80-100 µg/ml. Da die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien

nur etwa halb so große Genommassen besitzen wie die *Enterobacteriaceae*, wurden zur Erzielung gleicher optimaler Hybridisierungsbedingungen wie von DE LEY (1971) angegeben, DNA–Konzentrationen von 60 µg/ml verwendet.

3.11.2 Auswahl der Bakterienstämme für die DNA–DNA Hybridisierung

Bei einer großen Zahl von untersuchten Bakterienstämmen ergibt sich eine theoretisch mögliche Anzahl von Hybridisierungen, die in der Praxis nicht durchführbar ist n(n-1)/2). Deshalb wurde zur Verringerung der Hybridisierungsmessungen anhand der zuvor erfolgten biochemischen/phänotypischen Charakterisierung eine Gruppeneinteilung (s. Tab. 6a) festgelegt, deren jeweilige Stämme gleiche Reaktionsmuster bei der Bunten Reihe aufwiesen und deren Phänotypen somit eine hohe genetische Ähnlichkeit nahelegten. Aus jeder der 7 Gruppen wurde ein charakteristischer Vertreter gewählt (Ausnahme: Gruppe 3 lieferte 2 Repräsentanten, s. Tab. 6b) und mit jeweils einem Vertreter einer anderen Gruppe hybridisiert (s. Tab. 6c). Somit konnten innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* trotz weitgehend angenommener DNA-Homologie interspezifische Verwandschaftsverhältnisse geklärt werden.

3.11.3 Durchführung der DNA-DNA Hybridisierung

Nachdem die DNA-Lösungen auf eine Konzentration von ca. 60 µg/ml eingestellt worden sind, wurden sie in einer French-Pressure-Cell-Press fragmentiert. Anschließend wurden Mischungen der DNA-Lösungen von je zwei zu untersuchenden Stämmen im Verhältnis 1:1 hergestellt.
Durch 10 minütiges Kochen sowohl der gemischten als auch der unvermischten DNA–Lösungen wurde die DNA thermisch denaturiert. Nach Zugabe von 70°C heißem 10 x SSC wurde die Konzentration des Puffers von 0,1 x SSC auf 2 x SSC heraufgesetzt und im Anschluß sofort in die vorgeheizten Küvetten des Spektralphotometers pipettiert. Der Absorptionsabfall wurde bei 260 nm und einer optimalen Renaturierungstemperatur T_{OR} von 69°C verfolgt und mittels eines Flachpultschreibers aufgezeichnet (Gilford, Modell 1100).
T_{OR} wurde nach der von GILLIS et al. (1970) aufgestellten Gleichung bestimmt:

$$\mathbf{T_{OR} = 0{,}51 \times \% (G + C) + 47{,}0\ °C}$$

HUSS et al. (1983) fanden heraus, dass eine Streuung der Reassoziationstemperatur von bis zu 15°C möglich ist, ohne dass eine Änderung der Reassoziationskinetik auftritt. Mit der berechneten T_{OR} von 69°C lassen sich daher Genome mit einem (G + C)-Gehalt zwischen 29 % und 58 % vergleichen.

Während der Renaturierungsreaktion wurde die Temperatur im Reaktionsraum des Gilford Spektralphotometers (Modell 250, Gilford Instruments GmbH, Neuss) über ein Durchfluß-wasserbad (Lauda-Thermostat, Meßgerätewerk Lauda, Dr. R. Wobser KG) konstant gehalten. Das Spektralphotometer verfügte über eine Vier-Küvetten-Wechsel-Automatik. Die Reassoziationskinetik wurde für jeweils 30-40 Minuten verfolgt, wobei der Absorptionsabfall alle 30 Sekunden gemessen wurde.

3.11.4 Auswertung der Reassoziationskurven

Die Reassoziation fragmentierter Einzelstrang-DNA verläuft unter Idealbedingungen entsprechend einer Kinetik 2. Ordnung. Diese Idealbedingungen sind direkt zu Beginn der Reassoziation bei Überschuss an freien Nukleinsäurebasen gegeben. Beeinflußt wird die Kinetik durch verschiedene Faktoren wie Fragmentlänge, Kationenkonzentration des Puffers und DNA-Konzentration (MARMUR & DOTY, 1961; WETMAR & DAVIDSON, 1968). Durch die parallel in einem Messvorgang ablaufende Renaturierung der DNA-Lösungen A und B und der Mischung M aus beiden im Verhältnis 1:1, ergeben sich identische Versuchsbedingungen für jede der drei Reassoziationskinetiken. Die die Kinetik beeinflussenden Faktoren konnten so kompensiert werden (HUSS et al., 1983). Aus dem Extinktionsabfall Δ_{E}, welcher der Steigung der Reassoziationskurven entspricht, lassen sich die Renaturierungsraten v_A, v_B und v_M ableiten. Aus den Renaturierungsraten lässt sich wiederum der Grad der Bindung D in Prozent zwischen den DNA-Molekülen anhand der Formel:

$$\% \, D = \frac{100 \times 4 V_M - (V_A + V_B)}{2\sqrt{V_A \times V_B}}$$

bestimmen. Dies spiegelt den Grad der Genomverwandtschaft wider (DE LEY et al., 1970).

3.12 Präsentation der Hybridisierungsergebnisse

Die taxometrische Auswertung der DNA-DNA Hybridisierungsergebnisse erfolgte nach dem Verfahren des „single-linkage-clustering“ (SKERMAN, 1967; SNEATH & SOKAL, 1973). Mit Hilfe dieser Methode, bei welchem es sich um ein agglomeratives statistisches Verfahren handelt, konnten die Genomverwandtschaften der untersuchten Stämme ausgewertet werden. Hierbei fusionieren die nächstliegenden Nachbarobjekte, und die Ergebnisse können in einem Dendrogramm (s. Abb. 5) graphisch dargestellt werden, indem die vorliegenden Daten ein

taxonomisches Gebäude bilden. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die tendenziell zu hohe Ermittlung der Verwandschaftsgrade.

3.13 DNA-Gewinnung für die DNA-Sequenzierung

Da die DNA-Gewinnung über das QIAamp® DNA Mini Kit als verhältnismäßig schnelle und zudem leichte Methode angesehen werden muß, um an die komplett aufgereinigte bakterielle DNA zu gelangen, die auch bei der nachfolgenden PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) und Sequenzierung verlässliche Daten liefert, fand dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Zudem erleichterte der Umstand, dass als Ausgangsmaterial lediglich Reinkulturen der untersuchten Bakterienstämme in Form von klonierten Einzelkolonien ausreichend waren, das Vorgehen erheblich.
Hinzu kam, dass bei dieser Aufreinigungsmethode keine Phenol/Chloroform Extraktion oder Alkohol-Präzipitation erforderlich waren. Die DNA wird in AE-Puffer oder Wasser gelöst und ist so direkt für die PCR verfügbar oder kann bei -20 °C für den späteren Gebrauch aufbewahrt werden. Die auf diese Weise gereinigte DNA ist frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminaten und Inhibitoren.
DNA, welche mit dem QIAamp® Kit aufgereinigt wurde besteht aus Fragmenten von ca. 20-30 kb Größe. Da DNA dieser Länge während des PCR-Verlaufes komplett denaturiert wird, ist somit eine Vervielfältigung hoher Effizienz gesichert.

3.13.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterienkulturen

Mit einer sterilen Öse wurden 2-3 Einzelkolonien von einer mit *A.a.* beimpften Platte abgenommen und in 180 µl des Puffers ATL (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden) durch Hineinrühren überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K und Mischen auf dem Vortexmischer. Die darauffolgende Inkubation bei 56°C diente der Zell-Lyse, wobei der Effekt dadurch verstärkt wurde, dass die in den Mikrozentrifugationsröhrchen befindlichen Proben auf einer Schüttel-Plattform (Rocking Platform) bei 950 ppm platziert wurden. Statt der QIAGEN®-Protease wurde Proteinase K verwendet, da andernfalls eine reduzierte Aktivität in Gegenwart des ATL Puffers zu verzeichnen gewesen wäre. Die Zell-Lyse war nach 3 Stunden abgeschlossen und die Röhrchen wurden im Anschluss für kurze Zeit zentrifugiert, um Tropfen am Deckelinneren zu beseitigen.
In der Zwischenzeit wurde die beheizbare Schüttelplattform auf 70°C hochgeheizt und erneut mit den Mikrozentrifugationsröhrchen bestückt, nachdem in diese jeweils 200 µl AL-Puffer hineingefüllt worden waren. Zuvor wurden die Röhrchen noch für 15 Sekunden auf dem Vortexmischer geschüttelt. Die Inkubationszeit auf der Plattform betrug 10 Minuten. Auch

danach erfolgte das Zentrifugieren der Probenröhrchen zur Entfernung der Tropfen am Deckelinneren aufgrund der Wärmeentwicklung. Die teilweise beobachtete primäre Bildung eines weißen Präzipitats nach Zugabe des AL-Puffers war ohne Effekt auf das spätere Ergebnis. Dieses verschwand zudem während der Inkubation bei 70°C. Im Anschluss wurden den Proben 200 µl Ethanol absolut (96-100%) zugefügt, und sie wurden sowohl für 15 Sekunden auf dem Vortexmischer geschüttelt, als auch anschließend zentrifugiert, um erneut die Tropfen am Deckelinneren zu beseitigen. Ziel dieses ausgiebigen Mischens war eine homogene Lösung. Dennoch kam es vor, dass sich nach Zugabe von Ethanol ein weißer Niederschlag bildete, der ohne Wirkung auf das Ergebnis blieb, solange auch das Präzipitat zusammen mit der restlichen Mixtur in ein mit einem QIAamp® Spin-Column bestücktem Sammelröhrchen (2ml) überführt wurde. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm für 1 Minute. Danach wurde das QIAamp® Spin Column ohne Berührung in ein neues, sauberes Sammelröhrchen umgesetzt und das zuvor benutzte, Filtrat enthaltende Röhrchen verworfen. Das Spin-Column wurde vorsichtig geöffnet, und es wurden 500 µl AW 1 Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Auch im Anschluß erfolgte das Umsetzen des Spin Columns in ein sauberes 2 ml Sammelröhrchen, wobei das alte Sammelröhrchen samt Inhalt weggeworfen wurde. Wieder wurden 500 µl eines Waschpuffers AW 2 in das Spin Column gegeben. Anschließend wurde bei 14 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und das Spin Column nochmals in ein neues 2 ml Sammelröhrchen umgesetzt. Der darauffolgende Zentrifugationsschritt (14 000 rpm für 1 Minute) diente dem definitiven Eliminieren des Waschpuffers AW 2. Im Anschluss wurde das Spin Column in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) gesetzt und das benutzte Sammelröhrchen verworfen. In das QIAamp® Spin Column wurden 200 µl AE-Puffer hinzugefügt, das Ganze für mindestens 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde dann noch einmal wiederholt, bevor die DNA-Aufreinigung beendet war. In dem Mikroreaktionsgefäß befand sich nun die aufgereinigte DNA.

Die Menge an DNA variierte mit der Menge des verwendeten Bakterienmaterials. 25 mg führten zu einer Ausbeute von ca. 10-30 µg an DNA in 400 µl Wasser (25-75 ng/ µl) mit einer Absorptionsrate (A_{260}/A_{280}) von 1,7–1,9. Wasser eignete sich jedoch nicht, wenn eine Langzeitlagerung der aufgereinigten DNA geplant war, da es zur Säurehydrolyse kommen konnte. Besser war in diesem Fall der AE-Puffer.

3.13.2 Reinheitskontrolle der aufgereinigten DNA

Es wurden entsprechend der Anzahl der Proben Mikroreaktionsgefäße bereitgestellt und in jedes 80 µl HPLC-Wasser und jeweils 2 µl einer aufgereinigten DNA-Probe hineinpipettiert. Diese Lösung wurde 15 Sekunden auf dem Vortexmischer geschüttelt und das Photometer

anschließend für die Absorptionsmessung doppelsträngiger DNA bei einer Menge von 2 + 80 µl HPLC eingestellt. Vor der Messung der Proben erfolgte die Vermessung eines Leerwertes mit 80 µl HPLC-Wasser. Im Anschluß wurde jede Probe einzeln in eine entsprechende Photometer-Küvette gegeben und das Ergebnis abgelesen. Die Ergebnisse, die bei reiner DNA zwischen 1,5 und 2,0 (A_{260}/A_{280}) liegen sollten, sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.13.3 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Vervielfältigung des aufgereinigten DNA-Materials

In der vorliegenden Arbeit wurde das in vitro Verfahren der Polymerase-Kettenrektion (Polymerase Chain Reaction, PCR) zur Anreicherung der zuvor aufgereinigten DNA-Fragmente verwendet.

Das Prinzip der PCR basiert auf einer chemischen Methode, mit welcher, ausgehend von einem selektiven DNA-Extrakt, ein bestimmter Genabschnitt in vitro vervielfältigt werden kann (SAIKI et al., 1988, MULLIS et al., 1986). Die automatisierte PCR kann nur mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt werden, da während des ersten Arbeitschrittes der PCR die Doppelstränge der zu untersuchenden DNA bei 95°C aufgeschmolzen werden und eine nicht-hitzestabile Polymerase somit zerstört werden würde. Folglich müsste nach jedem PCR-Zyklus neue Polymerase zugegeben werden, was das Vorgehen erheblich erschweren und die Fehlerrate erhöhen würde. Deshalb wurde die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaqticus* (Taq-Polymerase) verwendet.

Die PCR bietet gegenüber anderen Techniken eine Reihe von Vorteilen: Es werden nur geringe Mengen an Ausgangs-DNA benötigt, da die Sensitivität dieser Methode sehr hoch war. Der Untersuchungszeitraum betrug nur wenige Stunden, und die PCR lief weitgehend automatisiert ab.

Die Reagenzien zur Durchführung der PCR gab es in standardisierten Kits zu kaufen, wobei immer folgende Inhaltsstoffe enthalten sein mussten: Puffer, $MgCl_2$, dNTP's (Desoxy-nucleotidtriphosphate; N steht stellvertretend für eine der vier Basen: Adenin-A, Cytosin-C, Guanin-G und Thymin-T), Primer und DNA-Polymerase. Dieses spezifische Reaktionsgemisch wurde einer zyklisch wiederkehrenden Abfolge verschiedener Temperaturschritte ausgesetzt, so dass es zu einer Vermehrung/Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes kam. Der Zyklus der PCR bestand aus drei diskreten Temperaturschritten, die in einem frei program-mierbaren Thermo-Cycler eingestellt wurden:

1) DENATURIERUNG: Beim Erhitzen auf 95 °C schmilzt die zu amplifizierende doppelsträngige DNA auf, und es ergeben sich Einzelstränge.

2) ANNEALING: Durch rasches Abkühlen auf ca. 55°C wird die Reassoziation der Einzelstränge verhindert und die Primer (2 verschiedene Oligonucleotide mit gegensinniger Orientierung) lagern sich an entsprechend komplementäre Strangabschnitte des Templates an.

3) EXTENSION: Die DNA-Polymerase verlängert bei 72°C ab dem Primer den Strang und vervollständigt so durch den Einbau der dNTP's den Einzelstrang zum Doppelstrang. Diese neuen Moleküle dienen im nächsten Zyklus wieder als Template.

So wächst die Zahl der doppelsträngigen DNA (ds DNA) theoretisch nach: 2^n (n = Anzahl der Zyklen), so dass eine einzige DNA-Matrize in 30 Zyklen auf das Milliardenfache amplifiziert wird (s. Abb. 7).

Durchführung der PCR:

Die zuvor aufgereinigte DNA wurde auf eine Konzentration von 1 ng eingestellt, während der Mastermix, sowie die positive und negative Kontrolle des 16 S Kits aufgetaut wurden. Entsprechend der Zahl zu amplifizierender DNA-Proben wurden 0,2 ml Eppendorf-cups in einem Ständer aufgestellt und mit der Stammnummer oder einer Referenznummer beschriftet. In jedes Eppendorf-cup wurde dann jeweils 25 µl einer DNA-Probe hineinpipettiert, wobei zusätzlich zwei Eppendorf-cups mit jeweils 25 µl des Positiv-Kontrollreagenz und des Negativ-Kontrollreagenz befüllt wurden. Anschließend kam der im 16 S Kit enthaltene Mastermix hinzu (25 µl), und die Eppendorf-cups wurden für wenige Sekunden auf dem Vortexmischer geschüttelt und anschließend anzentrifugiert.

Nun wurden alle Eppendorf-cups in den Thermocycler gestellt und das Programm ‚Big Dye' gestartet, wobei primär für 10 Minuten bei 95°C erhitzt wurde, um dann auf 60°C abgekühlt zu werden (30 Sekunden) und anschließend wieder auf 72°C erwärmt zu werden (45 Sekunden). Dieser Zyklus des Erhitzens auf 95°C (30 Sekunden), des Abkühlens auf 60°C (30 Sekunden) und des anschließenden Temperaturanstiegs auf 72°C (45 Sekunden) wurde 30 Mal wiederholt. Zum Abschluss wurden die Proben bei 72°C für 10 Minuten gehalten und danach auf unbestimmte Zeit auf 4°C deutlich abgekühlt (s. Abb. 8).

3.13.4 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese

Nach der PCR wurde ein 2%-iges Agarosegel gegossen und in die Gelkammern jeweils 5 µl der Proben sowie 5 µl Laufpuffer gegeben. Nur wenn die Banden der Proben denen der positiven Kontrolle entsprachen, wurden die entsprechenden, amplifizierten DNA-Proben zur Sequenzierung weiterverwertet. Dies ist auf der Abbildung 9a/b ersichtlich.

3.13.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mittels Microcon-100-Column von Millipore®. Die Sammelröhrchen (collection tubes) wurden entsprechend der Anzahl der aufzureinigenden Produkte aufgestellt und beschriftet. Pro Sammelröhrchen wurde jeweils ein Microcon-100-Column verwendet und mit der blauen Seite nach oben in das Sammelröhrchen gesteckt. Darauf wurden dann 500 µl HPLC pipettiert und die Microcons bei 2000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Im Anschluß wurden noch einmal 400 µl HPLC auf das Microcon pipettiert und das zu reinigende PCR-Produkt dazugegeben. Auch jetzt wurde wieder bei 2000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert.
Es folgte die Aufstellung der gleichen Anzahl neuer Sammelröhrchen sowie deren Beschriftung. Die zuvor zentrifugierten Microcons wurden mit der blauen Seite nach unten in die neuen Sammelröhrchen gesetzt und 25 µl HPLC zu pipettiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm für 3 Minuten. Die benutzten Microcons konnten anschließend verworfen werden, da sich die aufgereinigten PCR-Produkte im Sammelröhrchen befanden und nun für den Sequenziervorgang verwendet werden konnten.

3.14 DNA – Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit fand die Didesoxynucleotid-Methode Anwendung. Eine grundlegende Arbeit zu dieser Form der DNA-Sequenzierung wurde von SANGER et al. (1977) vorgelegt. Bei der von SANGER und Mitarbeitern (1977) entwickelten Didesoxynucleotid-Methode wird die enzymatische DNA-Replikation zur Herstellung einer Polynucleotidpopulation genutzt (GECKELER & ECKSTEIN, 1998; SCHOTT, 1998). Dabei wird heutzutage standardmäßig mit T7- oder Taq-Polymerase gearbeitet.

3.14.1 Grundlagen

In Kombination mit Oligonucleotiden, die komplementäre Sequenzen aufweisen, bilden einzelsträngige DNA-Fragmente über den Basenpaarungsmechanismus doppelsträngige Bereiche aus (Hybridisierung, s. Kpt. 3.11). Gibt man DNA-Polymerase und die vier natürlichen Mononucleotidtriphosphate hinzu, wird das 3'-Ende des hybridisierten Oligonucleotids schrittweise zum Doppelstrang verlängert. Hierbei kondensiert immer nur das entsprechend der Monomereinheit des vorgegebenen DNA-Fragments (Template) komplementäre Mononucleotid an das sogenannte Starternucleotid (Primer), so dass der Einzelstrang zum Doppelstrang „aufgefüllt" wird.

3.14.2 Limitierte Primerverlängerung/Kettenabbruch

Dem Reaktionsansatz werden außer den vier natürlichen Mononucleotidtriphosphaten kleine Mengen von sogenannten Kettenabbruchmolekülen zugesetzt, weshalb man bei dieser Methode auch von „Kettenabbruchmethode" spricht. Diese Moleküle sind z. B. 2', 3'-Didesoxy-ribonucleotidtriphosphate oder Arabinosylnucleotide, und sie werden von der DNA-Polymerase in gleicher Weise wie die natürlichen Verbindungen an das 3'-Ende des hybridisierten Starteroligonucleotids kondensiert.
Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe z. B. eines eingebauten 2', 3'-Didesoxyribo-nucleotids ist es im nachfolgenden Kondensationsschritt nicht möglich ein weiteres Mono-nucleotid an das 3'-Ende der neu synthetisierten Polynucleotidkette (verlängerter Primer) zu hängen. Der Kettenabbruch hat stattgefunden (s. Abb. 10a/b). Dem Reaktionsgemisch werden nur so viele Kettenabbruchnucleotide hinzugefügt, dass bei jeder neu synthetisierten Nucleotid-kette nur einmal ein Kettenabbruchnucleotid anstelle des natürlichen Nucleotids eingebaut wird, um so eine vorhersehbare Polynucleotidpopulation zu gewährleisten.

3.14.3 Gelelektrophoretische Trennung der Polynucleotide

Zur Auftrennung der Komponenten der zuvor synthetisierten Polynucleotidpopulationen wurde ein hochauflösendes Polyacrylamidgel (Sequenziergel) verwendet. Dabei wurden die Nucleotidketten elektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt, wobei die Trennleistung der Methode so hoch ist, dass noch Polynucleotide getrennt werden, die sich in ihrer Länge nur um eine Monomereinheit unterscheiden. Insgesamt können bis zu 500 Nucleotideinheiten pro Sequenziergel ermittelt werden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Polynucleotide können nach der Auftrennung mittels Fluoreszenzmessungen in automatischen Sequenziergeräten detektiert werden (s. Abb. 11). Dabei werden die Rohdaten in Form von Chromatogrammen

farbig ausgedruckt. Die detektierten Polynucleotide stellen sich hierbei als „DNA-Peaks“ dar, und die ermittelte Sequenz wird direkt mit angegeben (s. Abb. 12).

3.14.4 Sequenzierung mit dem Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Die für die Cycle-Sequenzierung erforderliche bakterielle DNA-Menge sollte bei 2-3 µg liegen. Diese Menge sollte die Benutzung aller Primer gewährleisten, obwohl selbst weniger ausreichen dürfte, sofern man, wie in dieser Arbeit, mit einem Kapillar-Instrument misst. Natürlich spielt neben der Menge des zuvor gereinigten PCR-Produktes auch die Länge und die Reinheit eine wichtige Rolle.

Durchführung:

Es wurden 0,2 ml Eppendorf-cups aufgestellt und entsprechend der Stammnummern durchnummeriert. Anschließend wurde in jedes Eppendorf-cup 8,0 µl des Terminator Ready Reaction Mix pipettiert, sowie 3 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 3,2 pmol Primer (Forward bzw. Reverse Primer) und 4 µl HPLC. Das Gesamtvolumen sollte 20 µl betragen. Anschließend wurden die Proben kurz auf dem Vortexmischer geschüttelt und anzentrifugiert, bevor die Proben in den Thermocycler gestellt und das Programm ‚Big Dye 1’ gestartet wurde, bei welchem folgender Zyklus 25mal ablief:

1) Nach dem Hineinsetzen der Proben befand sich der vorgeheizte Thermocycler auf 96°C (Rapid thermal ramp = 1°C/Sekunde). Diese Temperatur wurde für 1 Minute gehalten, bevor der Wiederholungsmodus der 25 Zyklen begann.

2) Nach dem Hochheizen auf 96°C (Rapid thermal ramp auf 96°C = 1°C/Sekunde), wurde diese Temperatur für 10 Sekunden gehalten, bevor die Proben auf 50°C abgekühlt wurden (Rapid thermal ramp auf 50°C = 1°C/Sekunde). Diese Temperatur wurde für 5 Sekunden gehalten, um anschließend auf 60°C erhöht zu werden (Rapid thermal ramp auf 60 °C = 1 °C/Sekunde). 60°C wurden für 4 Minuten beibehalten, bevor der Zyklus durch erneutes Hochheizen auf 96 °C von vorn begann (insgesamt 25 Mal, s. Abb. 13).

3) Nach den 25 Zyklen wurden die Proben auf 4°C abgekühlt (Rapid thermal ramp auf 4°C = 1°C/Sekunde) und bei dieser Temperatur gehalten, bis sie zur Fällung der Extensions-Produkte gebraucht wurden. Zuvor mussten jedoch die Inhalte der Eppendorf-cups durch Anzentrifugieren vom Deckelinneren entfernt werden.

3.14.5 Fällung des Extensionsproduktes

In Verbindung mit der Cycle-Sequenzing-Methode eignet sich die Alkohol-Fällung der Extensionsprodukte, um nicht eingebaute Bestandteile des Reaktionsgemisches, z.B. nicht

verwertete ddNTPs oder dNTPs zu minimieren. Da Ethanol absolut (100 %) dazu tendiert, Wasser aus der Atmosphäre zu absorbieren, muss im Vorfeld sicher gestellt sein, dass die endgültige Konzentration des zur Präzipitation verwendeten Ethanols nicht zu gering ist und die späteren Sequenzergebnisse verfälscht. Entsprechend der zu untersuchenden DNA-Proben wurden 1,5 ml Eppendorf-cups verwendet. In diese wurden jeweils 250 µl 100 %iges Ethanol sowie 10 µl Natriumacetat hineinpipettiert. Zu den Proben wurden jeweils 80 µl HPLC gegeben und durchmischt, bevor dieses Gemisch in die schon mit Ethanol und Natriumacetat befüllten 1,5 ml Eppendorf-cups überführt wurde. Die Eppendorf-cups wurden anschließend bei 13 000 rpm für 20 Minuten und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert, und es erfolgte eine Zugabe von 190 µl 80 %igen Ethanols. Anschließend wurde erneut zentrifugiert; diesmal bei 13 000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Auch danach wurde der entstandene Überstand abgenommen (zweimal 100 µl) und die Eppendorf-cups im Anschluß bei 37°C in einem Heizblock für ½ Stunde getrocknet. Danach erfolgte die Aufnahme der Probe in 19 µl TSR und die Überführung in 0,5 ml Tubes. Diese wurden mit einem Deckel verschlossen und nochmals im Thermocycler bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und für den Sequenzerlauf im Gerät ABI P_{RISM}® 310 (Applied Biosystems, GmbH, Weiterstadt) vorbereitet. Dieses Gerät wurde im Juli 1995 als erstes Kapillar-Elektrophoresis-Sequenziergerät eingeführt. Nach dem Sequenzier-Lauf wurden die Proben ausgewertet, indem man im Internet anhand der detektierten Sequenzen im Vergleich zu in Datenbanken gespeicherten Sequenzen den Keim identifizieren konnte. Da in unserem Fall die Identität von *A.a*. im Vorfeld weitgehend bestimmt wurde, war vielmehr ein Sequenzvergleich zwischen den einzelnen *A.a.* Stämmen interessant.

3.14.6 Auswertung

Würde das Bandenmuster „per Hand“ ausgewertet werden, könnte vom Boden des Gels zur Auftragestelle hin die Nucleotidsequenz vom 5’ zum 3’-Ende abgelesen werden, wobei die am weitesten gewanderte Bande dem kürzesten Nucleotid, d. h. dem um nur eine Monomereinheit verlängerten Primer entspräche, u.s.w. .

Anhand des Sets, in welchem die Bande lokalisiert wäre, könnte festgestellt werden, ob die Base T, C, G oder A addiert wurde. Jedoch wurde in dieser Arbeit statt der deutlich aufwendigeren Methode der radioaktiven Markierung und anschließender „Handauswertung“ des Autoradiogrammes, der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen der Vorzug gegeben, da die Sequenzen der einzelnen *A.a.* Stämme über Fluoreszensmessungen im Sequenziergerät detektiert werden konnten. Die detektierten Polynucleotide stellten sich hierbei als „DNA-Peaks“ im ausgedruckten vierfarbigen Chromatogramm dar, wobei die ermittelte Sequenz mit angegeben wurde. Die Sequenzen der einzelnen Stämme konnten anschließend anhand einer

Sequenzdatenbank im Internet unter folgender Seite verglichen werden: **(www.ebi.ac.uk/bioinformatics/sequenceanalysis/alignment)**

3.15 Präsentation der Sequenzierungsergebnisse

Die taxometrische Auswertung der DNA-Sequenzvergleiche wurde wie im Kapitel 3.12 (Präsentation der Hybridisierungsergebnisse) beschrieben, nach dem Verfahren des „single-linkage-clustering“ (SKERMAN, 1967; SNEATH & SOKAL, 1973) durchgeführt. Das Dendrogramm (s. Abb. 6) spiegelt die über die DNA-Sequenzierung ermittelten Verwandschaftsgrade der repräsentativen *A.a.* Stämme wider.

3.16 Lagerung der untersuchten Bakterienstämme

Zur Lagerung der untersuchten Bakterienstämme wurde das CRYOBANK™-Stammhaltungssystem für Miroorganismen verwendet. Mit diesem System konnte die sichere Rekultivierung und einfache Lagerung der Mikroorganismen sichergestellt werden, da sich das permanente Subkultivieren als sehr aufwendig erwies. In den sterilen Kryoröhrchen befanden sich jeweils 25 chemisch behandelte Kügelchen, an deren Oberfläche die untersuchten Mikroorganismen binden konnten. Nach der erfolgten Beimpfung der Cryobank mit dem entsprechenden Keim, wurde diese Stammkultur anschließend im Gefrierschrank bei -20°C gehalten. Zum Ansetzen einer neuen Kultur musste nun lediglich ein Kügelchen aus der Cryobank entnommen werden und auf einer geeigneten Agarplatte ausgerollt werden.
Protokoll:

1) Nach der Beschriftung des Cryobankgefäßes wurde dieses unter sterilen Bedingungen geöffnet und mit einem Platinösenabstrich beimpft.
2) Das Gefäß wurde anschließend fest verschlossen und 4-5mal mit der Hand vorsichtig geschüttelt, wobei es nicht auf dem Vortexmischer gemischt werden durfte! Beim Schütteln kam es dann zu einer Bindung der Organismen an die poröse Kügelchenoberfläche.
3) Mit einer sterilen Pipette wurde das Kryomedium vollständig abgehoben und verworfen, bevor das Gefäß erneut fest verschlossen wurde.
4) Nun konnten die einzelnen Gefäße bei -20°C eingefroren werden.
5) Beim Ansetzen einer neuen Kultur wurde unter sterilen Bedingungen das Gefäß wieder geöffnet und mit einer sterilen Platinöse ein Kügelchen entnommen. Das Gefäß musste daraufhin sofort wieder verschlossen werden.

6) Das entnommene Kügelchen wurde auf einer geeigneten Agarplatte ausgerollt oder in ein Flüssigmedium gegeben, und unter den für den Keim geeigneten Bedingungen wurde eine identische Kultur herangezüchtet.

Untersuchungen zur entsprechenden Lagerung von Mikroorganismen wurden von WHITE & SANDS (1985) und FELTHAM et al. (1978) vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Gemeinsame phänotypische Eigenschaften der 34 untersuchten Bakterienstämme und Identifizierung der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

4.1.1 Mikromorphologie, Gramreaktion, Koloniemorphologie

Bei den *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Stämmen aus der Marburger Stammsammlung handelte es sich um gramnegative, unbewegliche, nicht-sporenbildende 0,5 x 1,5 µm große kokkoide Stäbchenbakterien. Nach 72 Stunden Bebrütungszeit bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 37°C und unter mikroaerophilen Bedingungen konnten 0,5-1 mm große, grauweiße, transluzente Kolonien nachgewiesen werden. Die Stämme 10, 16, 23, 24, 31, 33 und 34 (lfd. Nr.) erwiesen sich als adhärent. Bei Betrachtung mit der Lupe gegen Licht wiesen nur wenige Kolonien eine zentrale Sternstruktur auf (s. Abb. 0). Die Kolonien der Stämme 14, 19, 24, 26 und 34 (lfd. Nr.) wiesen eine raue Oberfläche auf, während die anderen Stämme durch eine glatte Oberflächenstruktur gekennzeichnet waren.

4.1.2 Kulturmedien und Wachstumsfaktoren (Glukose, Hefeextrakt, Rinderserum und Vitox®)

In Thioglykolatbouillon war das Wachstum der meisten Stämme körnig, gelegentlich aber auch schleimbildend. Es beschränkte sich größtenteils auf die mikroaerophile Zone des Bouillonröhrchens. Besonders zahlreiche Kolonien wurden durch Ausstriche auf Kochblutagar erzielt. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zeigte sich V-Faktor (NAD) und X-Faktor (Hämin) unabhängig. Die Anzucht von Massenkulturen der einzelnen Stämme wurde nicht durch die alleinige Zugabe von Rinderserum beschleunigt. Ebensowenig erbrachte die Anreicherung mit Glukose-Stammlösung auf eine 0,2 %ige Lösung einen bemerkenswerten Vorteil. Das Optimalmedium zur Anzucht von Massenkulturen bestand aus einer Grundlage von Proteosepeptonen, 0,4 % Hefeextrakt-Lösung und 1,0 % Vitox® (s. Tab. 2).

4.1.3 CO_2- Bedarf

Die *A.a.* Stämme entwickelten sich besonders gut in einer CO_2-angereicherten mikroaerophilen Atmosphäre, wobei aber auch ein aerobes Milieu eine Vermehrung gewährleistete. Die optimale Temperatur zur Anzucht lag bei 37°C.

4.1.4 Biochemische Leistungen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Alle untersuchten Bakterienstämme verhielten sich chemoorganotroph und benötigten eine organische Stickstoffquelle. Charakteristisch war der fermentative Stoffwechseltyp aller untersuchten *A.a.* Stämme mit Ausnahme des Stammes Nr. 34 (lfd. Nr.). Die biochemischen Leistungen aller untersuchten Stämme sind in der Tabelle 3 aufgeführt. TMPD-Oxidase- und Katalase-Reaktionen waren positiv. Hämolyse von Schaferythrozyten konnte nicht festgestellt werden. Die Tests auf Indol, Urease, Lysin- und Ornithin-Decarboxylase, β-Galaktosidase (ONPG) sowie Äskulin fielen negativ aus. Die Untersuchung auf Nitratreduktion fiel bei allen untersuchten Stämmen positiv aus, bis auf Stamm 33 (lfd. Nr.). Bei den Stämmen 8, 18, 23 und 24 (lfd. Nr.) fiel diese Reduktion jedoch schwach aus. Nahezu alle der untersuchten Stämme säuerten prompt folgende der angebotenen Zucker: D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose und Maltose. Lediglich Stamm 34 verwertete keinen der gebotenen Zucker, während Maltose ebensowenig von Stamm 31 (lfd. Nr.) gesäuert wurde. Bei diesem Stamm war wiederum auch die Glukoseverwertung verzögert. Auch Stamm 11 (lfd. Nr.) zeigte eine schwächere Säuerung von Glukose. Eine Gasbildung aus D-Glukose konnte man bei folgenden Stämmen beobachten: 1–21 und 31 (lfd. Nr.). Die Stämme 27–30 (lfd. Nr.) zeigten eine schwache oder verzögerte Galaktoseverwertung. D-Mannit wurde von den Stämmen 1–30, sowie von dem Stamm 32 (lfd. Nr.) verwertet. D-Xylose wurde von den Stämmen 14–21 (lfd.Nr.), sowie schwach und verzögert von den Stämmen 31–33 (lfd. Nr.) verwertet. Die anderen Kohlenhydrate L-Arabinose, D-Laktose, Saccharose, Trehalose, Raffinose, Sorbitol und Salicin konnten durch die verschiedenen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Stämme nicht abgebaut werden. Anhand der aufgeführten biochemischen Leistungen und der teilweise auftretenden Varianz innerhalb der 34 untersuchten Stämme der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* konnte eine intraspezifische Gruppeneinteilung vorgenommen werden (s. Tab. 6a). Innerhalb dieser 7 Gruppen traten ähnliche biochemische Reaktionsmuster auf (s. Tab. 3). Aus diesen Gruppen erfolgte wiederum die Auswahl von 8 Repräsentanten (s. Tab. 6b). Die DNA der 8 Repräsentanten wurde in dieser Arbeit zur Vergleichsanalyse der beiden Methoden: DNA-DNA Hybridisierung nach der optischen Renaturierungsmethde (DE LEY et al., 1970) und Basensequenzvergleich nach Sequenzierung (Didesoxynucleotid-Methode nach SANGER et al., 1977) herangezogen.

4.1.5 Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*

Mit diesem miniaturisierten Testsystem konnten die 34 Stämme anhand von 29 Reaktionen untersucht werden. Die Tabelle 4a zeigt die Ergebnisse des BD BBL CRYSTAL™ -

Neisseris/Haemophilus - Testsystems. Bei der Auswertung der Stämme ergaben sich 5 verschiedene Zahlencodes, von denen sich 3 nach der computergestützten Auswertung *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zuordnen ließen.

Der Zahlencode mit der Nummer 2004000060 errechnete sich nach der Untersuchung der Stämme 5, 9, 10, 12-14, 16, 17, 20-22, 24, 28-31, 32, 34 (lfd. Nr.). Hierbei zeigten die genannten Stämme eine positive Reaktion bei den Substraten 4MU-Phosphat (Panelposition 2A) und L-Glutaminsäure-AMC (Panelposition 4D), was sich unter der UV-Lampe als blaue Fluoreszenz im Vergleich zur negativen fluoreszierenden Kontrolle (Panelposition 4A) darstellte. Außerdem reagierten die jeweiligen Stämme positiv auf die Substrate γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide (Panelposition 4I) und p-n-p-Phosphat (Panelposition 2I). Dies ließ sich wiederum unter einer regulären Lampe (weißes Licht) als Gelbfärbung erkennen. Bei allen anderen der verbliebenen 25 Subtrate (s. Kpt. 3.6.2) kam es zu einer negativen Reaktion. Anhand des Zahlencodes 2004000060 fehl-identifizierte die vom Hersteller mitgelieferte Software 18 der 34 untersuchten *A.a.* Stämme als *Moraxella osloensis*.

Der Zahlencode mit der Nummer 2446400060 errechnete sich nach der Untersuchung der Stämme 1-4, 6-8, 11, 15, 19, 25-27 (lfd. Nr.). Hierbei zeigten die genannten Stämme eine positive Reaktion bei den Substraten 4MU-Phosphat (Panelposition 2A), L-Serin-AMC (Panelposition 4B), L-Phenylalanin-AMC (Panelposition 4C), L-Glutaminsäure-AMC (Panelposition 4D), L-Arginin-AMC (Panelposition 2D) und Glyzin-AMC (Panelposition 4E), was sich unter der UV-Lampe als blaue Fluoreszenz im Vergleich zur negativen fluoreszierenden Kontrolle (Panelposition 4A) darstellte. Außerdem reagierten die jeweiligen Stämme positiv auf die Substrate γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide (Panelposition 4I) und p-n-p-Phosphat (Panelposition 2I). Dies ließ sich wiederum unter einer regulären Lampe (weißes Licht) als Gelbfärbung erkennen. Bei allen anderen der verbliebenen 21 Subtrate (s. Kpt. 3.6.2) kam es zu einer negativen Reaktion. Anhand des Zahlencodes 2446400060 fehl-identifizierte die vom Hersteller mitgelieferte Software 13 der 34 untersuchten *A.a.* Stämme als *Kingella kingae*.

Der Zahlencode mit der Nummer 2446410060 errechnete sich nach der Untersuchung des Stammes 18 (lfd. Nr.). Hierbei zeigte dieser eine positive Reaktion bei den Substraten 4MU-Phosphat (Panelposition 2A), L-Serin-AMC (Panelposition 4B), L-Phenylalanin-AMC (Panelposition 4C), L-Glutaminsäure-AMC (Panelposition 4D), L-Arginin-AMC (Panelposition 2D) und Glyzin-AMC (Panelposition 4E), was sich unter der UV-Lampe als blaue Fluoreszenz im Vergleich zur negativen fluoreszierenden Kontrolle (Panelposition 4A) darstellte. Außerdem reagierte Stamm 18 (lfd. Nr.) positiv auf die Substrate Karubinose (Panelposition 1F), γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide (Panelposition 4I) und p-n-p-Phosphat (Panelposition 2I). Dies ließ sich wiederum unter einer regulären Lampe (weißes Licht) als Gelb- bzw. Goldgelbfärbung erkennen. Bei den restlichen 20 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion. Somit

unterschied sich das Reaktionsmuster der fehl-identifizierten *Kingella kingae* Stämme nur in Hinblick auf das Substrat Karubinose (Panelposition 1F). Dies führte jedoch durch die positive Karubinose-Reaktion des Stammes 18 (lfd. Nr.) zur korrekten computergestützten Identifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Der Zahlencode mit der Nummer 2656420161 errechnete sich nach der Untersuchung des Stammes 23 (lfd. Nr.). Hierbei zeigte dieser eine positive Reaktion bei den Substraten 4MU-Phosphat (Panelposition 2A), L-Serin-AMC (Panelposition 4B), LYS-ALA-AMC (Panelposition 2B), L-Trypthophan-AMC (Panelposition 1B), L-Phenylalanin-AMC (Panelposition 4C), ALA-ALA-PHE-AMC (Panelposition 1C), L-Glutaminsäure-AMC (Panelposition 4D), L-Arginin-AMC (Panelposition 2D), Ornithin-AMC (Panelposition 1D) und Glyzin-AMC (Panelposition 4E), was sich unter der UV-Lampe als blaue Fluoreszenz im Vergleich zur negativen fluoreszierenden Kontrolle (Panelposition 4A) darstellte. Außerdem reagierte Stamm 23 (lfd. Nr.) positiv auf die Substrate Maltotriose (Panelposition 2F), Karubinose (Panelposition 1F), p-n-p-Phosphorylcholin (Panelposition 1H), γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide (Panelposition 4I), p-n-p-Phosphat (Panelposition 2I) und Ornithin (Panelposition 1J). Dies ließ sich unter einer regulären Lampe (weißes Licht) als Gelb-bzw.Goldgelbfärbung und im Falle der positiven Ornithin-Reaktion als Lilafärbung erkennen. Bei den restlichen 13 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion. Anhand des Zahlencodes 2656420161 identifizierte die vom Hersteller mitgelieferte Software den untersuchten Stamm 23 (lfd. Nr.) als *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Der Zahlencode mit der Nummer 2446430161 errechnete sich nach der Untersuchung des Stammes 33 (lfd. Nr.). Hierbei zeigte dieser eine positive Reaktion bei den Substraten 4MU-Phosphat (Panelposition 2A), L-Serin-AMC (Panelposition 4B), L-Phenylalanin-AMC (Panelposition 4C), L-Glutaminsäure-AMC (Panelposition 4D), L-Arginin-AMC (Panelposition 2D) und Glyzin-AMC (Panelposition 4E), was sich unter der UV-Lampe als blaue Fluoreszenz im Vergleich zur negativen fluoreszierenden Kontrolle (Panelposition 4A) darstellte. Außerdem reagierte Stamm 33 (lfd. Nr.) positiv auf die Substrate Maltotriose (Panelposition 2F), Karubinose (Panelposition 1F), p-n-p-Phosphorylcholin (Panelposition 1H), γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilide (Panelposition 4I), p-n-p-Phosphat (Panelposition 2I) und Ornithin (Panelposition 1J). Dies ließ sich wiederum unter einer regulären Lampe (weißes Licht) als Gelb- bzw. Goldgelbfärbung und im Falle der positiven Ornithin-Reaktion als Lilafärbung erkennen. Bei den restlichen 17 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion. Anhand des Zahlencodes 2446430161 identifizierte die vom Hersteller mitgelieferte Software den untersuchten Stamm 33 (lfd. Nr.) als *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Somit wurden nur 3 der 34 untersuchten Bakterienstämme als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* korrekt identifiziert.

4.1.6 Ergebnisse des kommerziellen Schnelltestsystems BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter*

Mit diesem Testsystem konnten die 34 Stämme anhand von 30 Reaktionen untersucht werden. Die Tabelle 4b zeigt die Ergebnisse des BD BBL CRYSTAL™ - *Enteric/Nonfermenter* – Testsystems. Bei der Auswertung der Stämme ergaben sich 4 verschiedene Zahlencodes, die alle nach der computergestützten Auswertung zur Fehlidentifizierung *Pasteurella multocida* führten.
Der Zahlencode mit der Nummer 3400244000 errechnete sich durch eine positive Reaktion der untersuchten Stämme mit folgenden Substraten (s. Kpt. 3.6.4): Mannose (Panelposition 4B), Sorbit (Panelposition 4F), Mannitol (Panelposition 4G), P-n-p-Phosphat (Panelposition 2A), P-n-p-Biphosphat (Panelposition 2E) und γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid (Panelposition 1A). Hierbei kam es im Verlauf der positiven Reaktion zu einem goldgelben bzw. gelben Farbumschlag. Bei den restlichen 24 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion.
Der Zahlencode mit der Nummer 3400244400 errechte sich durch eine positive Reaktion der untersuchten Stämme mit folgenden Substraten (s. Kpt. 3.6.4): Mannose (Panelposition 4B), Sorbit (Panelposition 4F), Mannitol (Panelposition 4G), Adonit (4H), P-n-p-Phosphat (Panelposition 2A), P-n-p-Biphosphat (Panelposition 2E) und γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid (Panelposition 1A). Hierbei kam es im Verlauf der positiven Reaktion zu einem goldgelben bzw. gelben Farbumschlag. Bei den restlichen 23 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion.
Der Zahlencode mit der Nummer 3400200144 errechte sich durch eine positive Reaktion der untersuchten Stämme mit folgenden Substraten (s. Kpt. 3.6.4): Mannose (Panelposition 4B), Galaktose (Panelposition 4I), Inosit (Panelposition 4J), P-n-p-Phosphat (Panelposition 2A), P-n-p-Biphosphat (Panelposition 2E), γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid (Panelposition 1A) und Triphenyltetrazoliumchlorid (Panelposition 1H). Hierbei kam es im Verlauf der positiven Reaktion zu einem goldgelben bzw. gelben Farbumschlag und im Falle des Triphenyltetrazoliumchlorid zu einem rosa-roten Farbumschlag. Bei den restlichen 23 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion.
Der Zahlencode mit der Nummer 3400244004 errechnete sich durch eine positive Reaktion der untersuchten Stämme mit folgenden Substraten (s. Kpt. 3.6.4): Mannose (Panelposition 4B), Sorbit (Panelposition 4F), Mannitol (Panelposition 4G), Inosit (Panelposition 4J), P-n-p-Phosphat (Panel-position 2A), P-n-p-Biphosphat (Panelposition 2E) und γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid (Panelposition 1A). Hierbei kam es im Verlauf der positiven Reaktion zu einem goldgelben bzw. gelben Farbumschlag. Bei den restlichen 23 Substraten kam es zu einer negativen Reaktion.
Somit wurde mit diesem Schnelltestsystem keiner der 34 *A.a.* Stämme korrekt als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identifiziert.

4.2 Qualität der für die DNA – DNA Hybridisierung verwendeten DNA-Präparate

4.2.1 Spektrophotometrische Reinheit

Tabelle 5 zeigt die Werte der Quotienten $\Delta_{E260} : \Delta E_{234}$ und $\Delta E_{260} : \Delta E_{280}$ der DNA-Präparate. Sie sind ein Indikator für die Reinheit der DNA hinsichtlich des Protein- und RNA-Gehaltes. Die gemessenen Werte lagen in den von MARMUR & DOTY (1961), THOMAS & ABELSON (1967), OWEN et al. (1978) und HUSS et al. (1983) für reine DNA angegebenen Bereichen.

4.3 DNA-DNA Hybridisierung: Basensequenzhomologie zwischen den untersuchten Bakterienstämmen

Die Grundlage für das Erstellen der Hybridisierungsmatrix wurde durch die charakteristischen Merkmale der erfolgten Phänotypisierung (s. Tab. 3) gebildet.
Die phänotypischen Eigenschaften gestatteten eine Einteilung in 7 charakteristische Gruppen der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (s. Tab. 6a), aus welcher jeweils ein Repräsentant (Ausnahme: Gruppe 3 lieferte 2 charakteristische Vertreter) ausgewählt wurde (s. Tab. 6b).
Jeder der 8 ausgewählten *A.a.* Stämme wurde mit jedem anderen hybridisiert (s. Tab. 6c), um anhand der Basensequenzhomologie eine Aussage über die angenommene intraspezifische Genomhomogenität machen zu können.
Die so ermittelten DNA-DNA Bindungsraten (s. Tab. 7) wurden zum Vergleich der beiden Methoden DNA-DNA Hybridisierung mit DNA-Sequenzierung (s. Tab. 9b) herangezogen.

4.3.1 Intraspezifische Verwandschaftsbeziehungen zwischen den 8 repräsentativen Typstämmen nach DNA-DNA Hybridisierung

Die Hybridisierungsergebnisse errechneten sich aus den relativen Renaturierungsraten. Sie befinden sich im Bereich zwischen 73 bis 100 % DNA-DNA Bindung (s. Tab. 7). Von den hybridisierten Typstämmen zeigte sich bei 11 Messungen eine 100 %ige DNA-DNA Bindungsrate, während bei weiteren 6 Messungen das DNA-Bindungs-Niveau auf oder oberhalb von 90 %, jedoch unter 100 % lag. 8 Messungen lagen mit ihrer DNA-Bindungsrate zwischen 80 und 89 %, während die verbliebenen 3 Messungen eine Bindungsrate von 73, 74 und 76 % aufwiesen. Da bei den 8 repräsentativen Typstämmen von 28 DNA-DNA Hybridisierungen 17

Reassoziationsraten zwischen 90 und 100 % lagen, kann, wie angenommen, von einer genotypisch homogenen Spezies ausgegangen werden.

4.3.2 Präsentation der Hybridisierungsergebnisse

Zur Darstellung der genetischen Beziehungen der in dieser Arbeit untersuchten Stämme wurde das „single-linkage"-Verfahren angewandt. Die Darstellung der erstellten DNA-Bindungsdaten im „single-linkage"-Dendrogramm (s. Abb. 5) unterstrich die ermittelten intraspezifischen Verwandschaftsbeziehungen.

4.4 Qualität der für die DNA–Sequenzierung verwendeten DNA-Präparate

4.4.1 Absorptionsmessung doppelsträngiger DNA am Photometer

Der für die Reinheit von DNA repräsentative Absorptionsquotient $\Delta E_{260} : \Delta E_{280}$ wurde für alle 34 DNA-Proben gemessen (s. Tab. 8). Die gemessenen Werte lagen in den von MARMUR & DOTY (1961), THOMAS & ABELSON (1967), OWEN et al. (1978) und HUSS et al. (1983) für reine DNA angegebenen Bereichen. Mit dem Photometer wurden ebenso die in Tabelle 8 aufgelisteten DNA-Konzentrationen der 34 Proben gemessen.

4.5 Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion

Das Verfahren der PCR führte zur Vervielfältigung der zuvor auf Reinheit kontrollierten DNA. Die 34 DNA-Proben wurden über dieses Verfahren amplifiziert. Ob die PCR zum gewünschten Ergebnis geführt hatte, wurde über das Verfahren der Gelelektrophorese geprüft.

4.5.1 Ergebnisse der Qualitäts- und Quantitätskontrolle der amplifizierten DNA mittels Gelelektrophorese

Die resultierenden Banden nach erfolgter Gelelektrophorese sind auf der Abbildung 9b zu sehen.
Tabelle 9a zeigt die Ergebnisse der PCR, die sich durch die Ergebnisse der Gelelektrophorese (s. Abb. 9a) begründeten. Die Banden, die zu den Geltaschen Nr. 7, 15, 20 gehören, konnten im Vergleich zur positiven Kontrollbande nicht als positiv bewertet werden (s. Abb. 9b). Daraus resultierte die Schlussfolgerung, dass die in diesen Geltaschen enthaltenen DNA-Proben in

Hinblick auf Qualität und Quantität nicht der erforderlichen Voraussetzung für die anschließende Sequenzierung entsprachen.
Die Ergebnisse der PCR mussten somit bei 3 der 34 Proben als negativ bewertet werden.

4.6 Ergebnisse der datenbankgestützten Identifizierung der sequenzierten Stämme

In Tabelle 9a finden sich die Ergebnisse der Identifizierung der sequenzierten Stämme.
Das verwendete automatische Sequenziergerät war an einen PC angeschlossen, welcher die gemessenen Basensequenzen mit denen in einer Datenbank gespeicherten Sequenzen verglich und die in Tabelle 9a aufgelisteten Mikroorganismen als Identifizierungssresultate präsentierte.
Die Ergebnisse deckten sich weitgehend mit denen der phänotypischen Identifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Lediglich die Stämmen 5, 8, 24 und 27 (lfd. Nr.) wurden anstatt *Actinobacillus actinomycetemcomitans* als *Glacial ice bacterium* und *Uncultured bacterium* identifiziert; Stamm 20 (lfd. Nr.) konnte nicht identifiziert werden. Die Probe des Stammes 31 (lfd. Nr.) konnte vom Sequenziergerät nicht detektiert werden.

4.7 DNA-Sequenzierung: Basensequenzhomologie zwischen den untersuchten Bakterienstämmen

Die ermittelten Sequenzen wurden über ein Internetprogramm unter folgender Seite:
www.ebi.ac.uk/bioinformatics/sequenceanalysis/aligment verglichen. Hierbei wurden wie bei der DNA-DNA Hybridisierung (s. 4.3.1) 28 Untersuchungen zur Ermittlung einer Basensequenzhomologie vorgenommen, um einen genetischen Vergleich der 8 Repräsentanten phänotypischer Charakteristika (Gruppe 1-7, s. Tab. 3) zu erzielen. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle 9b. Sie sind in Prozent angegeben. Eine deutliche Aussage über die genetische Ähnlichkeit der untersuchten Stämme findet sich in der Spalte „Similarity“(%). Dort spiegelt sich die Anordnung der Basen und deren gleiche oder ungleiche Reihenfolge im Vergleich jeweils zweier Stämme bzw. deren DNA wider. Je höher die Prozentzahl, desto höher ist die Basensequenzhomologie. Die Ergebnisse der prozentualen Gleichheit der untersuchten DNA erstrecken sich in einem Bereich zwischen 15,3 und 90,5 %. Bei 6 von 28 Messungen ergaben sich folgende Höchstwerte [„Similarity“ (%), s. Tab. 9b]:

90,0 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] 19 : 25)
89,0 % (genetischer Vergleich der Stämme[a]19 : 29)
90,5 % (genetischer Vergleich der Stämme[a]19 : 34)

89,0 % (genetischer Vergleich der Stämme[a]25 : 29)
90,2 % (genetischer Vergleich der Stämme[a]25 : 34)
88,3 % (genetischer Vergleich der Stämme[a]29 : 34)

Hieraus wird ersichtlich, dass die Stämme 19, 25, 29, 34 (lfd. Nr.) von allen 8 untersuchten Stämmen die größten genetischen Ähnlichkeiten aufweisen.
Auffällig ist, dass die „Similarity"-Ergebnisse bei einem Sequenzvergleich des Stammes 31 (lfd. Nr.) mit den anderen Stämmen immer unter einem Wert von 25 % Ähnlichkeit zu liegen kommen:

24,7 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] 13 : **31**)
17,3 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] 19 : **31**)
16,7 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] 25 : **31**)
17,2 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] 29 : **31**)
16,4 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] **31** : 23)
15,7 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] **31** : 33)
15,3 % (genetischer Vergleich der Stämme[a] **31** : 34) [a] = laufende Stammnummern s. Tab. 1

Die verbliebenen 15 Vergleiche lagen prozentual im Bereich zwischen 58 % und 77 % Ähnlichkeit.

4.7.1 Präsentation der Ergebnisse nach Sequenzvergleich

Ebenso wie bei der Präsentation der Hybridisierungsergebnisse, (s. Kpt. 4.3.2) wurden die Ergebnisse des Sequenzvergleiches im Single-linkage-Verfahren als Ähnlichkeits-Dendrogramm dargestellt (s. Abb. 6).

5. DISKUSSION

5.1 Medizinische und molekularbiologische Begründung der Arbeit

5.1.1 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Bei etwa 45 % der über 35-Jährigen können Parodontalerkrankungen nachgewiesen werden, wobei verschiedene Erkrankungsformen mit unterschiedlichen mikrobiellen Assoziationen korrelieren. Für destruktive Parodontalerkrankungen gilt *A.a.* als eine der hauptsächlich pathogenen Spezies.
Circa 30–40 % der Erwachsenenparodontitiden weisen detektierbare Mengen an *A.a.* auf (NONNENMACHER et al., 2004). *A.a.* gilt zudem als Verursacher einer „Juvenilen Parodontitis“, die man nach der neuen Nomenklatur (seit 1999) als „aggressive Parodontitis“ bezeichnet. Man findet *A.a.* außerdem bei systemischen Infektionen wie Endokarditis und Abszessen, besonders im Gehirn (MUTTERS, 1998a). Dieses hohe pathogene Potential der Spezies und die nach wie vor hohe Präsenz bei den aufgeführten Erkrankungen rechtfertigen weitergehende intraspezifische Untersuchungen, die den phänotypischen und genotypischen Hintergrund näher beleuchten. Diese Untersuchungen können möglicherweise darüber Aufschluss geben, ob für die einzelnen Krankheitsbilder, hier im Wesentlichen die unterschiedlichen akuten und chronischen Infektionen, verschiedene Subspezies, Untergruppen oder biologische Varianten verantwortlich sind.

5.1.2 Voraussetzung für die molekularbiologische Analyse: Konventionelle, kulturelle Technik und Untersuchung biochemischer Charakteristika

Um vor der aufwendigen molekularbiologischen Untersuchung Zweifel an der Identität der untersuchten Stämme zu beseitigen, wurden über konventionelle Kulturverfahren Reinkulturen mit deutlich erkennbaren Einzelkolonien angezüchtet. Entsprachen diese Kulturen dem Erwartungsschema (s. Kpt. 5.3), wurde eine Untersuchung biochemischer Charakteristika vorgenommen. Die hinlänglich erforschten Eigenschaften einer typischen *A.a.* Kultur (MANNHEIM et al., 1980; MUTTERS et al., 1984; ZAMBON, 1985; MUTTERS, 1998a; VON GRAEVITZ et al., 2003; HENDERSON et al., 2003), sowie eventuelle Abweichungen davon gestatteten eine erste Entscheidung über die Weiterverwendung der herangezüchteten Kultur. Somit konnten ebenso, unter der Voraussetzung einer korrekten, sterilen Arbeitsweise, erste Rückschlüsse hinsichtlich der leichten Diskrepanz zwischen dem archivierten Bestand

verschiedener *A.a.* Stämme in der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Marburg und der tatsächlichen Bestandszahl von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gezogen werden.
Die anschließende Untersuchung biochemischer Charakteristika zielte darauf ab, den Keim anhand des Reaktionsschemas zu identifizieren. Auch hier liegen hinlänglich Untersuchungsprotokolle und Ergebnisse vor, die einen Großteil der biochemischen Varianzbreite des *A.a.* dokumentieren.

5.1.3 Molekularbiologische Methoden

Die Untersuchung der DNA eines pathogenen Keimes wie *A.a.* ist unerlässlich, um sowohl die verwandschaftliche/taxonomische Stellung zu definieren (MANNHEIM et al., 1980; PIECHULLA, 1985), als auch Rückschlüsse auf die Pathogenität ziehen zu können. Im Falle der hier verwendeten DNA-DNA Hybridisierungstechnik nach der optischen Renaturierungsmethode (DE LEY et al., 1970) konnte die intraspezifische, genetische Ähnlichkeit phänotypisch unterschiedlicher *A.a.* Stämme untersucht werden. Parallel wurde eine Sequenzierung (SANGER et al., 1977) unterschiedlicher *A.a.* Stämme und eine Vergleichsanalyse der ermittelten Sequenzen vorgenommen. Dieser Vergleich der Sequenzanalysen und der Hybridisierungsergebnisse präzisierte die taxonomischen Schlussfolgerungen.

5.2 Auswahlkriterien der untersuchten Bakterienstämme

5.2.1 Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie in Marburg

34 phänotypisch unterschiedliche Stämme der Spezies *A. actinomycetemcomitans* wurden in die Untersuchungen einbezogen, um ein Bild der genetischen Variationsbreite zu gewinnen. Zudem sollten anhand dieser phänotypisch unterschiedlichen Stämme zwei verschiedene molekularbiologische Untersuchungsmethoden: DNA–DNA Hybridisierung nach der optischen Renaturierungsmethode (DE LEY et al., 1970) und internetgestützter Basensequenzvergleich nach Sequenzierung (Didesoxynucleotid-Methode nach SANGER et al., 1977) miteinander verglichen werden.
Neben älteren Isolaten der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, wurden auch jüngere Isolate verwendet, um nicht eventuelle genetische Unterschiede zwischen heutigen Populationen und alten *A.a.* Repräsentanten zu übersehen. Da der Rahmen dieser Untersuchung weit überschritten worden wäre, wenn jeweils mehrere Stämme aus jeder repräsentativen Gruppe phänotypischer Merkmale genetisch miteinander verglichen worden wären, wurden insgesamt 8

Vertreter aus 7 phänotypisch/biochemisch verschiedenen Gruppen ausgewählt. Geringe Stammzahlen pro Spezies sind vertretbar, wenn bekannt ist, dass sie phänotypisch sehr homogene Gruppen repräsentieren. Untersuchungen von POHL, 1979; PIECHULLA, 1985; MANNHEIM et al., 1980; BURBACH, 1987 haben gezeigt, dass phänotypisch identische Stämme der *Pasteurellaceae* auch in ihrem Genotyp weitgehend übereinstimmen. Um einen Eindruck von der genetischen Varianz innerhalb einer Spezies zu gewinnen, wurden intraspezifische Vergleiche phänotypisch unterschiedlicher Repräsentanten verschiedener biochemischer Reaktionsgruppen (s. Tab. 6 a/b) vorgenommen.

5.2.2 Medizinischer Hintergrund

Die untersuchten Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie in Marburg entstammten verschiedenen menschlichen Erkrankungsquellen, wie z. B. aus Abszedierungen (Parodontal-, Mandibular- und Parotisabszess), verschiedenen Parodontitiden, Endokarditiden und aus zahlreichen Blutkulturen (s. Tab. 1). Außerdem wurden zur Probenentnahme sowohl Vertreter des männlichen als auch des weiblichen Geschlechtes herangezogen. Auch der Zeitraum von 1982 bis 1997, in welchem die Stämme isoliert wurden, sowie die unterschiedlichen Herkunftsorte (Marburg, Aachen, Heidelberg, Fulda, Würzburg, München, Hamburg – Deutschland; Göteborg – Schweden; Seattle, Denver – USA) entsprachen den Forderungen von GORDON (1978) nach einer innerhalb der Speziesgrenzen heterogenen und somit repräsentativen Population. Vor diesem Hintergrund war eine Varianz innerhalb der untersuchten Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* geboten, und es konnte sichergestellt werden, dass die untersuchten Stämme einen Großteil der mit *A.a.* in Verbindung gebrachten Krankheiten widerspiegelten. Dies wurde ebenso bei Untersuchungen von MANNHEIM et al. (1980), BURBACH (1987) und WEGENER (1992) berücksichtigt, deren Arbeiten auch mit Stammsammlungsstämmen des Institutes für Medizinische Mikrobiologie in Marburg durchgeführt worden waren. Nur so kann über die Methode der DNA-DNA Hybridisierung als auch der DNA-Sequenzierung eine Aussage über die Intraspezies-Homologie getroffen werden, und es kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Ergebnisse der Untersuchung phänotypischer Eigenschaften, als auch die der molekularbiologischen Untersuchung, repräsentativ für die fakultativ pathogene Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sind.

5.2.3 Bio- und Serotypen

Nach KING & TATUM (1962), PULVERER & KO (1970), SLOTS et al. (1980b), ZAMBON (1985) kann man zwischen 3-10 Biotypen unterscheiden, die biochemische Gruppen darstellen.

Der Unterschied liegt in der jeweils unterschiedlich auftretenden Verwertung sogenannter Schlüsselzucker, zu denen Dextrin, Galaktose, Maltose, Mannitol und Xylose zählen. Die meisten der untersuchten Stämme entsprachen dem Biotyp B (s. Tab. 1).
In der vorliegenden Versuchsreihe wurde keine Serotypisierung vorgenommen. Lediglich bei 5 Stämmen war der Serotyp schon vor der Versuchsreihe festgestellt und in der Datei der Stammsammlung festgehalten worden (s. Tab. 1). Nach KING & TATUM (1962) und ZAMBON et al. (1983, 1983b) können bei *A. actinomycetemcomitans* 3 Serotypen (a, b und c) bestimmt werden. Serotyp c findet man nur in 10 % der Fälle bei menschlichen Isolaten aus dem Mund (ZAMBON, 1985). Bei parodontal gesunden Menschen kommen die Serotypen a und b ungefähr gleich häufig vor, während Serotyp b bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis (*lokalisierter juveniler Parodontitis* - nach alter Nomenklatur vor 1999) erhöht ist. Vom Serotyp c Antigen ist bekannt, dass es sich um ein Mannose–Polymer handelt (ZAMBON et al., 1983). Alle Serotyp-Antigene haben ein hohes Molekulargewicht, sind hitzestabil und hauptsächlich Kohlenhydratderivate. Sie sind leicht über Immunfluoreszenz–Techniken, die an der Gesamt-Bakterienzelle angewandt werden, detektierbar. ZAMBON et al. (1985) gehen davon aus, dass die Serotyp-Antigene eine äußere Schicht der Zelloberfläche bilden, die möglicherweise als Kapsel betrachten werden kann. Die unterschiedlichen Serotypen spielen höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Ansiedlung und dem Umgehen entscheidender Wirtsabwehrmechanismen. HENDERSON et al. (2002) sprechen von 6 unterschiedlichen Serotypen a-f, von denen alle über pathogenes Potential verfügen. Das immundominante Antigen ist ein O-Polysaccharid (LPS) von hoher molekularer Masse, wobei die O-Polysaccharide der Serotypen b, c, e und f Ergebnisse homologer Gen-Cluster sind, die zwischen 10 (Serotyp e) und 16 (Serotyp b) Gene enthielten. Die Tatsache, dass die entsprechenden Gen-Cluster für die Synthese unterschiedlicher Serotypen kodieren und auch durch eine unterschiedliche Basenzusammensetzung gekennzeichnet sind, lässt die Wichtigkeit einer DNA-Analyse mit Aufschlüsselung des Genomes erkennen. Sie wird in dieser Arbeit durch Sequenzanalyse ermöglicht.

5.3 Phänotypie von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in der Kultur

5.3.1 Mikromorphologie, Koloniemorphologie und Gramreaktion

Bei den untersuchten Stämmen, die nach erfolgter Kultivierung für die nachfolgenden Versuchsreihen herangezogen wurden, handelte es sich um gramnegative, unbewegliche, nicht-sporenbildende 0,5 x 1,5 µm große kokkoide Stäbchenbakterien. Bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 37°C zeigten sich nach ungefähr 37 h Bebrütungszeit unter

mikroaerophilen Bedingungen 1-2 mm große, grau-weiße Kolonien. Von den 34 zu untersuchenden Stämmen wiesen 7 eine starke Adhärenz auf. 5 Stämme waren durch eine raue Oberflächenstruktur gekennzeichnet. Die bei Betrachtung gegen Licht auffällige, zentrale Sternstruktur (COLEBROOK, 1920) fand sich nur selten. Alle oben aufgeführten Charakteristika der *A.a.* Kulturen decken sich weitgehend mit denen anderer Publikationen (MANNHEIM et al., 1992; MUTTERS, 1998a). Die angegebene Größe einer typischen *A.a.* Kolonie variiert jedoch leicht zwischen 1-3 mm im Durchmesser bei MUTTERS (1998) oder 0,5-1 mm im Durchmesser (ZAMBON, 1985). MUTTERS (1998) gibt an, dass ältere Kolonien auf Serum-haltigem Agar die interne Sternstruktur aufweisen, die von HEINRICH & PULVERER (1959) mit „gekreuzten Zigarren" verglichen wurde.

Beim TSBV-Agar wird das Wachstum V- und X-Faktor abhängiger *Haemophilus*-Arten durch das fehlende Blut unterdrückt (SLOTS, 1982b). Somit wird gewährleistet, dass die Sternstruktur in diesem Fall ein Identifizierungsmerkmal von *A.a.* und nicht von *Haemophilus aphrophilus* oder einigen *Streptokokken*-Arten (MANNHEIM et al., 1992) ist, die diese Struktur auf geeigneten Nährböden durchaus auch bilden können. Diese Sternstruktur entsteht bei älteren Kolonien durch Pseudopodien und Fibrillen (BLIX et al., 1990) und geht einher mit einer ausgeprägten Adhärenz. HENDERSON et al. (2002) gibt als Grund für die Adhärenz das Vorhandensein von großen gebündelten Fasern auf der Bakterienoberfläche an. Die beschriebene Sternstruktur und die damit einhergehende Adhärenz verschwinden jedoch nach mehrfacher Subkultivierung, wobei noch herausgefunden werden muss, wodurch die von FINE et al. (1999) bei mehrfach subkultivierten Stämmen beobachtete verminderte Fibrillenanzahl, die herabgesetzte Adhärenz und die niedrigere Endotoxin- und Fibroblastentätigkeit hervorgerufen wird. Somit erklärt sich auch das nur selten erkennbare Sternmuster der in dieser Studie untersuchten Stämme. Die Kulturen wurden nach zwei Tagen, bzw. spätestens nach 3 Tagen überimpft und das Ganze nach der gleichen Zeitspanne wiederholt, um mögliche, nicht auf Anhieb ersichtliche Kontaminationen auszuschließen. Somit waren die Kulturen nie älter als 3 Tage und meistens mehrfach subkultiviert, was ebenso die zu 85 % auftretenden glatten Oberflächen der Kolonien, sowie die deutlich verminderte Adhärenz in 21 % der Fälle erklärte, wie dies auch bei SLOTS (1982a) beschrieben wurde.

In Thioglykolatbouillon war das Wachstum der meisten Stämme körnig, gelegentlich aber auch schleimbildend und beschränkte sich auf die mikroaerophile Zone des Bouillonröhrchens. Dies steht im Widerspruch zu Angaben von ZAMBON (1985), der nur in Zusammenhang mit der Anzucht von Frischisolaten von körnigem Wachstum am Röhrchenrand spricht. Bei mehrfach subkultivierten Stämmen beobachtete er eine einheitliche Trübung des Flüssigmediums. FINE et al. (1999) merken an, dass mehrfach subkultivierte Stämme verminderte Virulenzfaktoren aufweisen, als dies bei Frischisolaten der Fall ist. Da davon ausgegangen werden kann, dass die lyophilisierten *A.a.* Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie

in Marburg schon vor der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit mehrfach subkultiviert worden sind, muss dieser Nachteil in Kauf genommen werden.

5.3.2 Ansprüche an das Nährmedium

Die Ansprüche der 34 Stämme an das Nährmedium waren weitgehend identisch mit den Angaben vorheriger Veröffentlichungen (MANNHEIM et al., 1980; MANDELL & SOCRANSKY, 1981; ZAMBON, 1985; HENDERSON, 2003). MANDELL & SOCRANSKY (1981) entwickelten ein selektives Medium für *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, den „Malachite Green Bacitracin Agar" (MGB-Medium), um eine Kultivierung des anspruchsvollen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zu erleichtern. Insbesondere bei Entnahme subgingivaler Plaqueproben parodontal erkrankter Patienten erwies sich die selektive Anzucht von *A.a.* als problematisch, wobei die häufigste Kontaminante aus den Plaqueproben von *Haemophilus aphrophilus* gebildet wurde. In einer Zusammensetzung aus 40 gm/l Trypticase Soy Agar, 128 µg/ml Bacitracin, 8 µg/ml Malachite Green (antibakterieller Triphenyl Farbstoff) und 5 % defibriniertem Schafsblut, konnte eine 80 %ige Steigerung der Anzucht reiner *A.a*. Kulturen erzielt werden. Auch KRAUT et al. (1972) hatten ein vergleichbares selektives Medium entwickelt, in welchem sich jedoch 28 % niedrigere Bacitracin-Level befanden und kein Malachite Green. Der in dieser Arbeit verwendete Selektivagar für *A.a.* (SLOTS, 1982b) zum Ausschluss von Kontaminanten war TSBV-Agar, der zur Hemmung oraler *Streptokokken* (z.B. *Streptokokkus mitis*) führte, die ihrerseits das Wachstum von *A.a.* in vitro hemmen. In diesem Agar waren Antibiotika (Bacitracin und Vancomycin) enthalten, die das Wachstum anderer Mikroorganismen als *A.a.* unterdrücken sollten. All diese Bestrebungen, ein geeignetes Medium für *A.a.* zu finden, zeigen deutlich, dass es sich hier um ein sehr anspruchsvolles, nicht leicht anzüchtbares Bakterium handelt, dass in Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen steht, die wiederum eine Identifizierung von *A.a.* erschweren. Deshalb untersuchten HARPER-OWEN et al. (1999) im Falle unkultivierbarer Bakterien die Verlässlichkeit molekularbiologischer Methoden wie der PCR. Da in dieser Untersuchung jedoch nur Stämme aus der Stammsammlung untersucht wurden, die in den meisten Fällen ohne Kontaminanten vorlagen und somit leichter anzüchtbar waren, war es nur in Ausnahme- und Zweifelsfällen erforderlich, ein geeignetes Selektivmedium zur Anzucht von *A.a.* zu verwenden. Einigkeit herrscht über die Notwendigkeit von CO_2 (05-10 %) in der Atmosphäre, in welcher das Medium mit *A.a.* bebrütet wird, da es sonst zu erschwertem und verlangsamtem Wachstum kommt (HOLM, 1954; SLOTS, 1982a).

5.4 Biochemische Charakteristika von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Die phänotypischen Eigenschaften von *A.a.* sind in den vergangenen Jahren hinreichend untersucht worden. In nahezu allen Studien, die als repräsentativ für den Mikroorganismus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* angesehen werden können, fanden sich mehrere Übereinstimmungen. Trotz auch vorhandener widersprüchlicher Ergebnisse, lieferten sie einen orientierenden Leitfaden.
Zusammenfassend kann hinsichtlich der biochemischen Charakterisierung von *A.a* festgehalten werden:

1) Es liegt keine V-Faktor oder X-Faktor-Abhängigkeit vor.
2) Die Katalasereaktion ist positiv.
3) Die Oxidasereaktion kann sowohl positiv als auch negativ ausfallen.
4) Hämolyse wird nicht beobachtet.
5) Lysin- und Ornithin-Decarboxylase-Reaktion sowie die β-Galaktosidase (ONPG)-Reaktion fallen negativ aus.
6) Es findet keine Aeskulin-Hydrolyse statt.
7) Urease wird nicht gespalten.
8) Die Nitratreduktion ist positiv.
9) Die Zucker D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose und Maltose werden fermentiert. Selten findet sich bei Maltose und Mannose eine negative Reaktion.
10) Die Gasbildung aus D-Glukose ist ebenfalls variabel.
11) Die Galaktase-, Mannit- und D-Xylose-Reaktion fallen unterschiedlich aus.
12) Folgende Kohlenhydrate werden nicht verwertet: L-Arabinose, D-Laktose, Saccharose, Sorbitol, Salicin.

Bei der Aufstellung dieser biochemischen Charakteristika wurden Studien folgender Untersucher berücksichtigt: KING & TATUM (1962), PAGE & KING (1966), MANNHEIM et al. (1980), MANDELL & SOCRANSKY (1981), SLOTS (1982a), TANNER et al. (1982), MUTTERS (1984b), ZAMBON et al. (1983a), ZAMBON (1985), BURBACH (1987), BRISSEAU et al. (1988), WEGENER (1992), HOLMES et al. (1996), MUTTERS (1998a), ARVAND et al. (2005), VON GRAEVITZ et al.(2003), BAUM (2003), HENDERSON (2003).

5.4.1 Interpretation der Ergebnisse der „Bunten Reihe“

Bei allen untersuchten Bakterienstämmen fanden sich positive TMPD-Oxidase und Katalase-Reaktionen. SLOTS (1982a) gibt zwar ebenfalls positive Ergebnisse der Katalasereaktion an,

spricht aber von einer negativen Oxidasereaktion, ebenso TANNER et al. (1982). Im Gegensatz dazu beschreibt MANNHEIM et al. (1980) vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie, stark Oxidase-positive Reaktionen für die *A.a.* Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Marburg, was durch die mehrfach erfolgte Überimpfung dieser Stämme zu erklären ist. Da in der hier vorliegenden Arbeit keine Untersuchung von frisch isolierten *A.a.* vorgenommen wurde, erklärte sich daraus die positive Oxidase-Reaktion, die sich mit den Angaben von MUTTERS (1998a) deckt. Hämolyse konnte bei keinem der untersuchten Stämme nachgewiesen werden, was mit den Angaben von BURBACH (1987) und BAUM (2003) korreliert. MUTTERS et al. (1984b) und andere Autoren wie SLOTS (1982a) konnten nachweisen, dass Tests auf Lysin- und Ornithin–Decarboxylase, β-Galaktosidase (ONPG) negativ ausfielen, was ebenso in dieser Studie der Fall war. Aeskulin wurde von keinem der untersuchten Stämme hydrolysiert, und dies wurde auch in keinem der vorliegenden Artikel anders beschrieben. Eine positive Nitratreaktion wurde bei nahezu allen Stämmen erzielt, wenn auch bei den Stämmen 8, 18, 23 und 24 (lfd. Nr.) nur eine schwache Reduktionsreaktion registriert werden konnte. Lediglich Stamm 33 (lfd. Nr.) reagierte negativ, was sich nicht mit den Angaben von MUTTERS (1998a), MANNHEIM et al. (1980) und SLOTS (1982a) deckt. Nahezu alle untersuchten Stämme säuerten die angebotenen Zucker D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose und Maltose. Maltose wurde nicht vom Stamm 31 (lfd. Nr.) gesäuert, was den Angaben von MANNHEIM et al. (1980) entspricht, der mit den Marburger Stammsammlungsstämmen eine 93 %ige positive Maltosereaktion erzielte. Stamm 34 (lfd. Nr.) säuerte keinen der angebotenen Zucker und gibt Grund zu der Annahme, dass es sich bei diesem Stamm nicht um *A.a.* handelt, da sich alle bisherigen Untersucher in Hinblick auf die Säuerung von Glukose und Fruktose einig waren. Da verwundert ebenso die schwächere Säuerung der Stämme 11 und 31 (lfd. Nr.). MANNHEIM et al. (1980) fanden bei *A.a.* Stämmen der Stammsammlung eine 93 %ige Wahrscheinlichkeit, dass Mannose abgebaut wird. Übereinstimmend konnten in der vorliegenden Studie 33 von 34 Stämmen D-Mannose abbauen. Obwohl von PAGE & KING (1966) eine positive Galaktosereaktion ermittelt wurde, kam es in dieser Studie nur bei 4 von 34 Stämmen zu einer Galaktoseverwertung, die eher schwach oder verzögert ausfiel. Diese Angaben lassen sich eher mit den Angaben von MANNHEIM et al. (1980) vergleichen, der nur 24 % der Marburger Stammsammlungsstämme als positive Galaktoseverwerter ermittelte. Bei SLOTS (1982a) und TANNER et al. (1982) fand sich gar keine positive Galaktosereaktion. Übereinstimmend mit allen anderen Untersuchern fand keine positive Laktosereaktion statt. 31 der 34 untersuchten Stämme konnten D-Mannit verwerten, was für einen variablen, aber eher positiven Verwertungsmodus sprach und sich weitgehend mit den Angaben von SLOTS (1982a) und TANNER et al. (1982) deckt. 11 von 34 Stämmen verwerteten D-Xylose, wenn auch bei 3 Stämmen lediglich eine verzögerte bzw. schwache

Reaktion auftrat. ZAMBON et al. (1983a) teilt den Reaktionsmodus in Hinblick auf die Xylosevergärung auf folgende Art und Weise ein: Serotyp b +, Serotyp c +/−, Serotyp a − .
Da bei den untersuchten Stämmen keine Serotypisierung vorgenommen wurde, kann die Aussage ZAMBONS et al. (1983a) nicht überprüft werden. Andere Kohlenhydrate wie L-Arabinose, D-Laktose, Saccharose, Trehalose, Raffinose, Sorbitol und Salicin wurden zu 100 % nicht verwertet, was sich mit anderen Studien deckt.

5.4.2 Durch biochemische Varianz bedingte Gruppeneinteilung

Innerhalb der 34 untersuchten *A.a.* Stämme traten verschiedene Variationen der biochemischen Reaktionen auf. Dies führte zur Einteilung in verschiedene Gruppen (s. Tab. 3).
Innerhalb der Gruppe 1 fand sich die größte Anzahl der Stämme (1-13, lfd. Nr.) mit dem gleichen Reaktionsmodus. Eine positive Reaktion fand sich bei folgenden Tests: TMPD-Oxidase, Katalase, Nitratreduktion, D-Glukose Säure/Gas, D-Mannose, D-Fruktose, Maltose, D-Mannit.
Die Gruppe 2 (14-21, lfd. Nr.) stellte die zweitgrößte Gruppe dar. Die biochemischen Reaktionen waren identisch mit denen der Gruppe 1. Hinzu kam lediglich die positive Xylose-Reaktion, die bei allen zur Gruppe 2 gehörenden Stämmen beobachtet werden konnte. Innerhalb der Gruppe 3 befanden sich 5 Kandidaten (22–26, lfd. Nr.), die neben der fehlenden Xylose-Verwertung auch keine Gasbildung nach Säuerung von Glukose aufwiesen. Gruppe 4 setzte sich aus 4 Repräsentanten (27–30, lfd. Nr.) zusammen, die zwar wie in Gruppe 3 kein Gas während der Glukosesäuerung bildeten und auch keine Xylose verwerteten, dafür aber Galaktose säuerten, wenn auch schwach bzw. verzögert. Stamm 31 war der einzige Repräsentant der Gruppe 5, der durch das Ausbleiben der Maltose- und Mannitverwertung gekennzeichnet war. Gruppe 6 bestand aus 2 Stämmen (32 und 33, lfd. Nr.), die durch fehlende Gasbildung bei der Glukoseverwertung, eine schwache bzw. verzögerte Xylosereaktion und eine ausbleibende Galaktoseverwertung gekennzeichnet waren. Stamm 33 verwertete außerdem kein Mannit, und die Nitratreaktion war negativ, weshalb ihm eine eigene Gruppe hätte zugeteilt werden müssen. Da Stamm 33 aber als Repräsentant der Gruppe 6 für die weitergehende genetische Untersuchung ausgewählt wurde, und Stamm 32 bis auf die fehlende Gasbildung trotz prompter Säuerung von Glukose auch als guter Vertreter der Gruppe 2 angesehen werden kann, wiegt diese mögliche Fehlgruppierung in Hinblick auf die weiterführende genetische Untersuchung der einzelnen *A.a.* Gruppenvertreter nicht schwer.
Festzuhalten bleibt, dass die zwischen den genannten 6 Gruppen auftretenden Unterschiede im biochemischen Reaktionsmodus zweifellos im Rahmen dessen liegen, was von den im Kapitel 5.4 aufgeführten Untersuchern bislang gefordert wurde. Die propagierte Varianz innerhalb der

biochemischen Untersuchungen, die die Identität von *A.a.* gewährleisten, wurde von 6 der 7 untersuchten Gruppen bestätigt.
Gruppe 7 mit dem vertretenden Stamm 34 (lfd. Nr.) entsprach jedoch nicht den für *A.a.* geltenden biochemischen Erwartungen, obwohl die „Bunte Reihe“ unter den gleichen vorgeschriebenen Bedingungen stattfand. Da aber gerade dieser Stamm 34 durch die fehlende Verwertung von allen gebotenen Zuckern auffiel, wurde er genetisch untersucht, um eine eventuell nicht gegebene Verwandtschaft zu den anderen *A.a.* Stämmen zum Anlass zu nehmen, ihn weiter in Hinblick auf seine taxonomische Stellung zu analysieren und die möglicherweise zu Tage tretende Fehlidentifizierung zu revidieren.

5.5 Schnelltestsysteme zur Ermittlung biochemischer Charakteristika von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Schnelltestsysteme werden heute mehr und mehr im Rahmen der Routinediagnostik verwendet. In dieser Untersuchung fanden die Tests BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus* und BD BBL Crystal™- *Enteric/Nonfermenter* Anwendung. Der Test BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus* dient der Identifizierung häufig isolierter *Neisseria* und *Haemophilus* sowie anderer anspruchsvoller Bakterien aus klinischen Proben (BARON et al., 1994; ENRIQUEZ & HODINKA, 1983).
Die bereits im Jahre 1918 verwendeten Mikromethoden zur biochemischen Identifizierung bildeten die Grundlage der heute üblichen, kommerziellen Schnelltestsysteme, die als miniaturisierte Identifizierungssysteme Ende der 60er Jahre eingeführt wurden. Durch den geringen Platzbedarf, die längere Haltbarkeit und einfache Handhabung ergaben sich viele, die Untersuchung unbekannter Mikroorganismen erleichternde Vorteile. Die in den genannten BBL-CRYSTAL ID-Systemen verwendeten Tests zum Nachweis von Gärung, Oxidation, Abbau und Hydrolyse verschiedener Substrate bauen auf konventionellen und klassischen Methoden (s. Bunte Reihe, Kpt. 5.4.1) auf. Hinzu kommen chromogen- und fluorogengebundene Substrate zum Nachweis von Enzymen, die die Mikroorganismen zur Metabolisierung verschiedener Substrate nutzen (ENRIQUEZ & HODINKA, 1983; MADDOCKS & GREENAN, 1975; MANAFI et al., 1991). Die aufgelisteten, getrockneten und enzymatischen Substrate, sowie die Prinzipien der einzelnen Reaktionen finden sich im Kapitel 3.6.2 und 3.6.4.

5.5.1 Interpretation der Ergebnisse des kommerziellen Schnell-Testsystem BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*

Von den 34 untersuchten Stämmen der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* konnten nur 3 als solche identifiziert werden. Dies zeigt, dass entweder die Datenbasis als unzulänglich

angesehen werden muss oder aber die einzelnen Reaktionsergebnisse, die zur errechneten Profilnummer und somit zum falschen Ergebnis durch die datengestützte Identifizierung führten, als nicht repräsentativ für *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (s. Kpt. 5.4) betrachtet werden sollten. Weiterhin muss die Möglichkeit erwogen werden, dass die einzelnen 29 dehydrierten biochemischen und enzymatischen Substrate nicht den Anforderungen für eine 100 %ige Identifizierung des gesuchten Keimes *A.a.* genügen. Die hinlänglich bekannten Substrate und die entsprechenden Reaktionen nach Inkubation mit *A.a.*, wie im Kapitel 5.4 beschrieben, können als beweisend für das Vorliegen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* angesehen werden. Diese Substrate werden jedoch in dem vorliegenden Testsystem nur ungenügend berücksichtigt. Zusätzlich stellt sich bereits bei der Auswahl des Testsystems BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus*, welches zur Identifizierung von *Neisseria* und *Haemophilus*, sowie „einiger anderer anspruchsvoller Bakterien aus klinischen Proben" (s. Gebrauchsanweisung des Testsystems BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus*) die Frage, inwiefern *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei der Zusammenstellung der einzelnen Reaktionskomponenten berücksichtigt wurde. Die Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gehört zwar, wie auch die Gattung *Haemophilus*, der Familie der *Pasteurellacea* an, ist aber kein Mitglied der Gattung *Neisseria* oder *Haemophilus*. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* nimmt stattdessen die Position einer eigenständigen Spezies innerhalb der Gattung *Actinobacillus* ein, aufgrund genetischer Untersuchungen sogar eine eigenständige Spezies in einer neuen, noch zu beschreibenden Gattung und fällt daher laut Hersteller des Testsystems BD Crystal™-*Neisseria/Haemophilus* in die Identifizierungskategorie „einiger anderer anspruchsvoller Bakterien aus klinischen Proben" (s. o.). Auch, wenn *A. actinomycetemcomitans* sich gegenüber *H. aphrophilus* als phänotypisch sehr ähnliche Spezies erwiesen hat (WEGENER, 1992; MANNHEIM et al., 1980) und daraus geschlossen werden könnte, dass eine sichere Identifizierung von *A.a.* trotz seiner Zugehörigkeit zur Gattung *Actinobacillus* gewährleistet ist, informiert der Hersteller nicht deutlich genug über die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *A.a.* findet sich zwar innerhalb der im BBL CRYSTAL N/H ID-System gespeicherten Taxa, scheint aber mit diesem Testsystem als vollkommen unzulänglich identifizierbar zu sein. Hinzu kommt, dass die untersuchten Stämme der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie in Marburg entstammen und schon mehrfach subkultiviert worden sind, bevor sie zur Untersuchung herangezogen wurden. Es handelt sich also nicht um Frischisolate klinischer Proben, die nachweislich (MANNHEIM et al., 1980; SLOTS, 1982a) andere biochemische Reaktionen aufweisen können, als mehrfach subkultivierte Stammsammlungsstämme. Ob dies vom Hersteller mit dem genannten Verwendungszweck: „Das Testsystem dient zur Identifizierung […] einiger anspruchsvoller Bakterien *aus klinischen Proben***.**" gemeint war, wird nicht deutlich. Die Bilanz der Testergebnisse für 34 untersuchte *A.a.* Stämme fällt mit nur 3 richtig identifizierten

Stämmen nicht zufriedenstellend aus. Und auch bei diesen 3 richtig identifizierten *A.a.* Stämmen stellt sich die Frage, wie es zu den 3 unterschiedlichen Zahlencodes kommen konnte, die die richtige Identifizierung ermöglichten.
Der sich ergebende Zahlencode 2446410060 bei erfolgter Inkubation mit dem Stamm 18 zeigt beispielsweise eine positive Reaktion für L-Arginin-AMC, die nach den vorliegenden Ergebnissen der Bunten Reihe so nicht erwartet worden wäre. Hier zeigt sich unter Umständen auch eine mögliche Unterschiedlichkeit von konventionellen Systemen und Schnelltest-systemen.
Der den Zahlencode 2656420161 hervorrufende Stamm 23 zeigt eine unerwartete Reaktion bei dem Substrat Ornithin, nachdem Einigkeit über eine negative Ornithin-Decarboxylase-Reaktion (MANNHEIM et al., 1980; MUTTERS et al., 1984b; WEGENER, 1992; BAUM, 2003) herrscht.
Der ebenfalls zur richtigen Identifizierung von *A.a.* führende Zahlencode 2446430161 des Stammes 33 weist diese untypische positive Ornithinreaktion ebenfalls auf.
Neben den genannten 3 unterschiedlichen Zahlencodes, die dennoch die Identifizierung von *A.a.* ermöglichten, gab es sowohl den Zahlencode 2004000060, der dazu führte, dass 18 der 34 untersuchten Stämme fehlidentifiziert wurden, sowie den Zahlencode 2446400060, der zur Fehl-Identifizierung von 13 Stämmen führte.
Gründe für die differenten Codes, rsp. Reaktionsmuster von Schnelltestsystemen und konventionellen Systemen, können in den unterschiedlichen Bedingungen (Volumen) und in biochemischen Unterschieden der lyophilisierten Substrate im Gegensatz zu den primär gelösten Substraten im konventionellen System (Bunte Reihe) liegen. In jedem Fall sind die Ergebnisse beider Methoden nicht einfach gleichzusetzen.

5.5.2 Interpretation der Ergebnisse des kommerziellen Schnell-Testsystem BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter*

Alle der 34 untersuchten *A.a.* Stämme wurden mit dem Testsystem BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter* als *Pasteurella multocida* fehlidentifiziert. Auch hier kann wie bei dem im Kapitel 5.5.1 beschriebenen Testsystem BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus* die unzulängliche Datenbasis als ein Grund für die Fehlidentifizierung angesehen werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die einzelnen Reaktionsergebnisse, die zu den errechneten Profilnummern führten, als nicht repräsentativ für *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (s. Kpt. 5.4) angesehen werden sollten, da die einzelnen 30 Reagenzien in Form dehydrierter biochemischer/enzymatischer Substrate nicht den Anforderungen für eine gesicherte Identifizierung des gesuchten Keimes *A.a.* genügten. Nicht alle der Substrate, die das biochemische Reaktionsmuster von *A.a.* wiedergeben und auch schon in ausreichendem Maße

untersucht worden sind (s. Kpt. 5.4), wurden berücksichtigt. Auch hier stellt sich, wie schon bei den Testergebnissen des Testsystemes BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus* die Frage, ob der Hersteller *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei der Zusammenstellung der einzelnen Reaktionskomponenten berücksichtigt hat. Im Gegensatz zu dem Testsystem BD BBL Crystal™- *Neisseria/Haemophilus* bleibt *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei den aufgelisteten Taxa des BBL CRYSTAL *E/NF* ID System gänzlich unberücksichtigt. Trotzdem wird vom Hersteller angegeben, dass dieses Testsystem zur „Identifizierung klinisch wichtiger, aerober gramnegativer Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* sowie einiger der häufiger *beim Menschen isolierten gramnegativen Bakterien, die Glukose sowohl fermentieren* als auch nicht fermentieren“ (s. Gebrauchsanweisung des Testsystems BD BBL Crystal™ -*Enteric/Non-fermenter*), herangezogen werden kann. Da das Testsystem *A.a.* aber innerhalb der Taxa nicht erwähnte, konnte dennoch nicht von richtigen Identifizierungsergebnissen ausgegangen werden. Der Sinn der Untersuchung der 34 einzelnen *A.a.* Stämme bestand in diesem Fall weniger in der Zielsetzung einer richtigen Identifizierung, als vielmehr darin, bestimmte biochemische Reaktionen, die zuvor anhand der Bunten Reihe (s. Kpt. 5.4) untersucht worden waren, den Testergebnissen des BBL CRYSTAL *E/NF* ID Systems gegenüber zu stellen. Die Testergebnisse für die 34 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Stämme führten zwar insgesamt zur Fehlidentifizierung dieser als *Pasteurella multocida*, wiesen aber 4 unterschiedliche Zahlencodes auf, was nicht bei allen Stämmen auf ein einheitliches Reaktionsmuster schließen ließ. Die 4 verschiedenen, sich ergebenden Zahlencodes 3400244000, 3400244400, 3400200144 und 3400244004 kamen durch Unterschiede der Reaktionen auf die Substrate Sorbit, Adonit, Inosit und Triphenyltetrazoliumchlorid zustande. Die anderen Reaktionen waren bei allen Stämmen identisch (s. Kpt. 4.1.6). Da die Reaktionen der Bunten Reihe auf das Substrat Adonitol durchweg negativ waren, weichen diese Ergebnisse von denen der positiven Adonitreaktion des Schnelltestsystemes ab, die sich bei 5 Stämmen (7, 8, 13, 20, 25, lfd. Nr.) ergaben. Übereinstimmend mit der Bunten Reihe kam es zu positiven Ergebnissen im Schnelltestsystem bei der Galaktoseverwertung der Stämme 27 und 29 (lfd. Nr.). Die in der Bunten Reihe schwach bzw. verzögert Galaktoseverwertenden Stämme 28 und 30 (lfd. Nr.), zeigten im Schnelltestsystem BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter* lediglich eine negative Reaktion. Allerdings reagierten zusätzlich die Stämme 16 und 17 (lfd. Nr.) positiv auf Verwertung von Galaktose im Schnelltestsystem, was durch die entsprechenden Ergebnisse der Bunten Reihe nicht bestätigt werden konnte. Widersprüchliche Reaktionen traten auch in Zusammenhang mit dem Substrat Mannitol auf. Die vier Stämme (16, 17, 27, 29, lfd. Nr.), die eine positive Galaktosereaktion im Schnelltestsystem aufwiesen, waren die einzigen mit einer negativen Mannitolreaktion. Eine negative Mannitreaktion fand sich in der Bunten Reihe jedoch bei den Stämmen 31, 33 und 34 (lfd. Nr.). Somit werden die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Bunten Reihe und dem Schnelltestsystem BD BBL CRYSTAL™-

Enteric/Nonfermenter deutlich, ohne, dass eine Identifizierung des untersuchten Mikroorganismus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* durch das verwendete Schnelltestsystem gewährleistet wurde. Auch hier sind die Ergebnisse beider Methoden (konventionelles System und Schnelltestsystem) nicht einfach gleichzusetzen, da die Gründe für die differenten Codes, wie schon unter 5.5.1 beschrieben, in den unterschiedlichen Bedingungen (Volumen) und in biochemischen Unterschieden der lyophilisierten Substrate im Gegensatz zu den primär gelösten Substraten im konventionellen System (Bunte Reihe) liegen.

5.6 Vergleich zweier Untersuchungsmethoden biochemischer Charakteristika: Bunte Reihe und Schnelltestsysteme

Die Bunte Reihe (COWAN, 1974) ist ein altbewährtes, konventionelles Verfahren zur Bestimmung biochemischer Charakteristika von Mikroorganismen. Die von MAC FADDIN et al. (2000) gelieferte Beschreibung der einzelnen Testprinzipien liefert die Grundlage für die Auswahl der einzelnen Reagenzien. Diese können zum größten Teil in der Nährbodenküche hergestellt werden, was eine Kostenersparnis im Vergleich zu den sehr teuren Schnelltestsystemen darstellt, die außerdem die Anschaffung von Zusatzgeräten, wie beispielsweise den Panelbetrachter, erforderlich machen. Allerdings nimmt die Zusammenstellung der zahlreichen Substratröhrchen sowie das Procedere des Beimpfens einer vollständigen Bunten Reihe wesentlich mehr Zeit in Anspruch, als dies bei der Verwendung eines Schnelltestsytems der Fall ist. Die Inkubationszeit, bzw. der Beobachtungszeitraum der Bunten Reihe sind auch länger als bei der Schnelltestinkubation (z. B. BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus* = 4 h Inkubationszeit).

Die Bunte Reihe wird nach 24, 48 und 72 Stunden, sowie nach einer Woche abgelesen. Sie vermittelt somit einen genaueren, da über einen längeren Zeitraum beobachteten Eindruck über den biochemischen Reaktionsmodus des untersuchten Mikroorganismus. Veränderungen können auf diese Weise besser wahrgenommen werden. Alle der unter 5.4 aufgeführten Untersuchungen, die den biochemischen Hintergrund des *A.a.* bisher beleuchtet haben, berufen sich auf konventionelle Methoden. Die verwendeten Schnelltestsysteme BD BBL CRYSTAL™- *Enteric/Nonfermenter* und BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus* weisen laut Hersteller die folgenden Vorteile auf: geringer Platzbedarf, längere Haltbarkeit, standardisierte Qualitätskontrolle, einfache Handhabung. Diesen Vorteilen stehen jedoch etliche Nachteile gegenüber, die nicht zuletzt in der mangelnden Identifizierungswahrscheinlichkeit von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* resultieren. Die Nachteile entstanden unter anderem aus der zwar propagierten leichten Anwendung, die aber trotzdem mehrere Quellen für Flüchtigkeitsfehler in sich barg: So sollten die Deckel der Kits im Kühlschrank bei einer Temperatur von 2–8°C gelagert werden, jedoch vor dem Gebrauch unbedingt auf Raum-

temperatur gebracht werden. Letzteres lag meist im eigenen Ermessen und wurde durch äußeres Befühlen der Verpackung, anstatt exakt mit dem Thermometer bestimmt. Weiterhin sollte nach dem Suspendieren mehrerer morphologisch gleicher Kolonien in der Inokulumsflüssigkeit eine Trübung des McFarland Standard Nr. 3 vorliegen, was der Einfachheit wegen ebenso der subjektiven Einschätzung oblag. Die als Testisolate verwendeten Reinkulturen sollten, wenn möglich nicht älter als 24 h sein, was ein nicht zu unterschätzendes Hindernis bei einem langsam wachsenden Keim wie *A.a.* darstellte. Der größte Unsicherheitsfaktor ergab sich jedoch nach der Inkubationszeit, wenn die Panels aus dem Inkubator genommen und abgelesen werden sollten. Mit Hilfe der Farbreaktionstabelle konnten die entsprechenden Vertiefungen unter der regulären Lampe (weißes Licht) nicht immer 100 %ig mit einem Minus für ein negatives Reaktionsergebnis oder einem Plus für ein positives Reaktionsergebnis bezeichnet und auf dem Vordruck vermerkt werden. Das Gleiche zeigte sich bei der Auswertung der Vertiefungen mit fluoreszierenden Substraten im Testsystem BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*, die unter der UV-Lampe betrachtet wurden. Auch hier konnte man nicht immer anhand der negativen Kontrolle an Panelposition 4A einen exakten Vergleich hinsichtlich einer stärkeren oder schwächeren Fluoreszenz ziehen. Der Hersteller der Testsysteme empfiehlt selbst, auf konventionelle Methoden zurückzugreifen, wenn es zu Problemen bei der Identifizierung gekommen ist und Fehler seitens des Anwenders ausgeschlossen werden konnten. Da sich allein schon bei der Auswertung der Panelvertiefungen Unsicherheiten und damit verbundene Fehler einschleichen, die die korrekte Identifizierung in Frage stellen, sollte eventuell von vornherein auf die zwar langwierigere, aber dennoch sichere Methode der altbewährten, konventionellen Bunten Reihe zurückgegriffen werden. Denn gerade der Fall *Actinobacillus actinomycetem-comitans* hat gezeigt, dass die Identifizierung auch bei einem Testsystem wie dem BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus,* welches den Keim innerhalb der Taxa führt, nicht sicher gewährleistet ist. Zwar ist die Idee des Prinzips im Rahmen der klinischen Diagnostik sehr gut, dennoch müssen gerade im Falle des *A.a.* noch sehr viel umfangreichere Studien erfolgen, die die Datenbasis des Herstellers dahingehend erweitern, dass ein so anspruchsvolles Bakterium wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mit seinem ausgesprochenen pathogenen Potential zuverlässig identifiziert werden kann. Dies deckt sich mit den Angaben von BAUM (2003), die zwar andere Schnelltestsysteme verwendete, aber auch in diesem Fall keine zuverlässige Identifizierung von *A.a.* erzielte. Lediglich DOGAN et al. (1999) konnten mit Hilfe des API ZYM-Systems alle der von ihm untersuchten *A.a.* Stämme korrekt identifizieren.

5.7 Molekularbiologische Methode: DNA-DNA Hybridisierung

5.7.1 Verfahren

Die Methode der DNA-DNA Hybridisierung nach der optischen Renaturierungsmethode ist mehrfach zur Bestimmung taxonomischer Verhältnisse herangezogen worden (MANNHEIM et al., 1980; MUTTERS et al., 1985b; BURBACH, 1987; WEGENER, 1992). Es hat sich gezeigt, dass diese von DE LEY et al. (1970) vorgeschlagene spektrophotometrische Methode geeignet ist, um Beziehungen zwischen phylogenetisch einander nahe stehenden Bakterien aufzuklären (CROMBACH, 1972; POHL, 1979). Im Unterschied zu anderen Hybridisierungsverfahren (s. 5.7.5), die radioaktiv-markierte DNA benötigen, ist bei der optischen Renaturierungsmethode nur native DNA erforderlich. DE LEY et al. (1970) geben eine Reproduzierbarkeit der Methode von 4,7 % an, während es bei Untersuchungen von HUSS et al. (1983) zu einem Wert von 2,4 % kam. Da davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Stämme der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* aufgrund ihrer engen Verwandschaftsbeziehungen genetisch homolog sind, kann die Methode der optischen Renaturierung bedenkenlos angewandt werden, weil sie nur im Bereich geringer DNA–Homologien als ungenau gilt (DE LEY et al., 1970). Grundlegende Untersuchungen zur Reassoziationskinetik von DNA durch MARMUR & DOTY (1961) und WETMUR & DAVIDSON (1968) führten zur Definition der Bedingungen, unter denen eine optimale Renaturierung von Einzelstrang-DNA möglich ist. MARMUR & DOTY (1961) gaben als optimale Renaturierungstemperatur einen Wert von ungefähr 25°C unterhalb des Schmelzpunktes der DNA an und konnten außerdem nachweisen, dass bei intakter genomischer DNA die Reassoziation mit höherem Molekulargewicht zunimmt. Die Renaturierungsreaktion kann nur dann gut ablaufen, wenn die Konzentration der DNA bei 30–40 µg/ml (HUSS et al., 1983) liegt, während DE LEY et al. (1970) eine optimale Konzentration von 75-80 µg/ml angeben. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer langsameren und unvollständigeren Einzelstrang-Renaturierung, die HUSS et al. (1983) in einer sterischen Behinderung der DNA-Duplexbildung begründet sehen. JOHNSON (1985b) fand heraus, dass die Renaturierungsgeschwindigkeit mit Zunahme der Ionenstärke im Reaktionsmilieu ansteigt, und dass bestimmte organische Lösungsmittel wie Formamid, Ethylenglycol und Glycerol zur Abnahme der thermischen Stabilität der DNA führen.

5.7.2 Größe der DNA-Fragmente

DE LEY et al. (1970) geben eine DNA-Fragmentgröße zwischen 0,15 und 0,65 x 10^6 Dalton an, während GILLIS et al. (1970) DNA-Fragmente von 0,4 x 10^6 Dalton Größe verwendeten.

POHL (1979) erzielte in ihrer Arbeit über die Familie der *Pasteurellaceae* DNA-Fragmentgrößen von ca. 1,0 x 10^6 Dalton, die mit denen von DE LEY et al. (1970) vergleichbar sind. Auch HUSS et al. (1983) bestätigen, dass Unterschiede in dieser Größenordnung keinen Einfluss auf die Reassoziationsreaktion haben. Generell sollte die Fragmentgröße der DNA in einem Bereich liegen, in welchem der Ablauf des Reassoziationsvorganges als eine Kinetik 2. Ordnung nicht beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragmentierungsmethode nach POHL (1979) übernommen.

5.7.3 Qualität der DNA-Präparate

Für die DNA-DNA Hybridisierung wurde nur hochgradig reine DNA verwendet, die möglichst frei von Kontaminationen durch RNA, Proteine, Polysaccharide und Lipide sein sollte, um eine Beeinflussung der Reassoziationsreaktion zu verhindern.
Durch die von DE LEY et al. (1970) entwickelte Präparationsmethode konnte der erforderliche Reinheitsgrad der DNA gewährleistet werden, was auch in den Untersuchungen von MUTTERS (1985) bestätigt werden konnte. Überprüft wurde die Reinheit spektrophotometrisch anhand der Quotienten $\Delta_{E\,260} : \Delta_{E\,280}$ für Protein-Verunreinigungen und $\Delta_{E\,260} : \Delta_{E\,234}$ für RNA-Verunreinigungen, wobei die Werte in den von MARMUR (1961), THOMAS & ABELSON (1967), OWEN et al. (1978) und HUSS et al. (1983) angegebenen Bereichen lagen.

5.7.4 Auswertung und Präsentation der Hybridisierungsergebnisse

Bei der taxometrischen Auswertung der DNA–DNA Hybridisierungsergebnisse kam das statistische Verfahren des „single-linkage-clustering“ (SKERMAN, 1967; SNEATH & SOKAL, 1973) zur Anwendung. Neu isolierte Bakterienstämme können nach wenigen Hybridisierungen mit Bakterienstämmen, deren Position bekannt ist, in das bestehende taxonomische Gebäude eingegliedert und graphisch in Gestalt eines Dendrogrammes eingefügt werden. Die 8 miteinander hybridisierten Typstämme spiegeln nach Verwertung der Ergebnisse der 28 Bindungsraten im „single-linkage“ Verfahren ein Dendrogramm wider, welches aus einem Ast besteht. Auf diesem Ast kommen alle 8 hybridisierten Stämme bei einer 100 %igen Bindungsrate zu liegen. Vergleicht man dieses statistische Darstellungsverfahren mit den taxonomischen Verhältnissen, die sich durch den Vergleich der tabellarisch aufgeführten Bindungsraten (s. Tab. 7) ergeben, wird der Nachteil dieses Verfahrens deutlich: Es kommt zu einer tendenziell zu hohen Ermittlung des Ähnlichkeitsgrades.

5.7.5 Andere Hybridisierungsmethoden in der Bakterientaxonomie

Auf dem Gebiet der Bakterientaxonomie finden neben dem in dieser Arbeit angewandten Hybridisierungsverfahren der optischen Renaturierungsmethode nach DE LEY et al. (1970) auch andere Verfahren Anwendung. Es gibt die Hydroxyapatit-Methode (BRENNER & COWIE, 1968; BRENNER et al., 1969), die Membranfiltermethode (GILLESPIE & SPIEGELMAN, 1965) und die S_1-Nuclease-Methode (CROSA et al., 1973). Die optische Renaturierungsmethode wurde in Kapitel 3.11 beschrieben, während die anderen Methoden von JOHNSON (1985b) zusammenfassend dargestellt wurden. Es konnte in verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden, dass die genannten Verfahren zu vergleichbaren Resultaten führten (DE LEY et al., 1970; HUSS et al., 1983). Lediglich bei der Hydroxylapatit-Methode konnten höhere Bindungsgrade als bei anderen Verfahren gemessen werden (MUTTERS, 1985), da auch überlappende Einzelstränge oder unspezifisch gebildetet DNA-loops die Messung beeinflussen (BURBACH, 1987; WEGENER, 1992).

5.7.6 Interpretation der Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung: DNA-Basensequenzhomologie innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* im Vergleich zum pathogenen Potential der Stämme

Da bei 8 repräsentativen Typstämmen von 28 DNA–DNA Hybridisierungen 11 Messungen eine Reassoziationsrate von 100 % aufwiesen, kann bei diesen Stämmen von einer sehr hohen genetischen Homologie ausgegangen werden, und es ergibt sich die Frage, ob diese Stämme dann auch in Bezug auf die Erkrankungen, an welchen sie maßgeblich mitbeteiligt sind, derart einheitlich ihr pathogenes Potential entfalten, wie es die genetische Analyse vermuten lässt. Eine 100 %ige Bindungsrate findet sich zwischen der DNA des Stammes 13 (lfd. Nr.) mit der jeweiligen DNA der Stämme 19, 25, 23 und 33 (lfd. Nr.). Werden diese Stämme hinsichtlich ihres Entnahmeortes untersucht, ergibt sich folgendes Bild: Sowohl Stamm 13, als auch Stamm 19 (lfd. Nr.) wurden aus einer menschlichen Blutkultur angezüchtet, wobei der Wirt des Stammes 19 an einer Endokarditis erkrankt war. Stamm 25 und Stamm 33 (lfd. Nr.) resultieren jeweils aus einer menschlichen Parodontitisläsion. Über den Herkunftsort des Stammes 23 (lfd. Nr.) ist nichts bekannt, er entstammt aber genauso wie Stamm 25 der phänotypischen Merkmalsgruppe 3. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Wirt des Stammes 13 einen genetisch sehr ähnlichen Stamm wie der Wirt des Stammes 19 in sich trug und somit womöglich ebenfalls hätte an einer Endokarditis erkranken können, was die Blutkulturen beider Personen bestätigten. Womöglich resultiert die Präsenz des Stammes 13 im Blut von einer Parodontitisläsion des Wirtes, was wiederum die hohe genetische Ähnlichkeit

des Stammes 13 mit den Stämmen 25 und 33 erklären dürfte, da auch diese Stämme aus einer Parodontitisläsion entstammten. Ein Zusammenhang zwischen Parodontitisläsionen und infektiöser Endokarditis wird schon seit Jahren diskutiert; ebenso wird ein Zusammenhang zwischen Parodontitis und renaler Infektion (Dialyse-Patienten), apoplektischem Insult, Myokardinfarkt, respiratorischen Erkrankungen (akute/chronische Bronchitis, Emphysem, Pneumonie), chronischer Gastritis und Diabetes mellitus gesehen. Endokarditis ist eine Entzündung der Herzklappen und/oder der Herzinnenhaut, die von Mikroorganismen verursacht wird, die sich im Bereich des vorgeschädigten Endokards ansiedeln. Im Blut von Patienten, die an Endokarditits erkrankt sind, lassen sich Parodontopathogene wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens* und *Fusobacterium nucleatum* nachweisen (FLORES-DE-JACOBY & MENGEL, 2004). Auch GRAVES et al. (2000) fanden heraus, dass verschiedene orale Bakterien imstande sind die Morbidität und Mortalität bakterieller Endokarditis signifikant zu erhöhen. GOULD et al. (1985) dokumentierten einen Endokarditisfall, der von *A.a.* hervorgerufen worden war, nachdem der betroffene Herzklappenpatient zuvor eine professionelle Zahnreinigung hatte vornehmen lassen. In diesem Falle war die durch die Zahnreinigung verursachtet Bakteriämie der Grund für die Endokarditis, denn auch im Blut ließ sich *Actinobacillus actinomycetemcomitans* nachweisen. Die genannten Untersuchungen unterstreichen, dass ein Zusammenhang zwischen den Stämmen 25 und 33 (lfd. Nr.), die aus einer Parodontitisläsion isoliert wurden und den Stämmen 13 und 19 (lfd. Nr.), die aus einer Blutkultur/Endokarditis gezüchtet wurden, bestehen kann, der sich ebenso deutlich in der 100 %igen Reassoziationsrate der DNA des Stammes 13 (lfd. Nr.) mit der jeweiligen DNA der Stämme 19, 25, 23 und 33 (lfd. Nr.) widerspiegelt.

Die DNA des Stammes 19 (lfd. Nr.)weist zudem eine 100 %ige Reassoziationsrate zur DNA der Stämme 31 und 34 auf (lfd. Nr.). Alle drei Stämme entstammen einer Blutkultur, was die hohe genetische Homologie erklären könnte.

Die DNA des Stammes 25 (lfd. Nr.) weist eine 100 %ige Bindungsrate zur DNA der Stämme 23 und 33 (lfd. Nr.) auf, wobei hier der pathogene Ursprung identisch ist, da zumindest die Stämme 25 und 33 einer Parodontitisläsion entstammen und auch hier die ausgesprochen große genetische Ähnlichkeit erklärt werden kann. Der Stamm 23, dessen Ursprung nicht bekannt ist, fällt aufgrund dieser hohen Bindungsrate seiner DNA zur DNA des Stammes 25 wahrscheinlich nicht aus dem Pathogenitätsmuster seines genetisch homologen Verwandten. Ähnlich könnte man dies bei Stamm 29 (lfd. Nr.) interpretieren, dessen Herkunft ebenfalls nicht vermerkt wurde, und der sich genetisch betrachtet höchst homolog zu Stamm 31 (lfd.Nr.) verhält, der aus einer Blutkultur isoliert wurde.

Die DNA der Stämme 31 und 34 (lfd. Nr.) weisen eine 100 %ige Bindungsrate auf, genauso wie die DNA der Stämme 33 und 23 (lfd. Nr.), was durch ihre Herkunftsquelle Blutkultur und Parodontitisläsion bestätigt wird.

Da sich die Herkunftsquellen der 8 hybridisierten Bakterienstämme auf Blutkulturen, Endokarditis und Parodontitiden beschränken und alle diese Krankheitsbilder miteinander in Zusammenhang gebracht werden können, lässt sich dadurch die durchschnittlich hohe Bindungsrate von 91 % erklären, wobei der niedrigste Wert bei 73 % DNA-Bindungsrate zwischen der DNA des Stammes 25 (lfd. Nr.) und der DNA des Stammes 31 (lfd. Nr.) liegt. In diesem Fall betrug die Standardabweichung aber auch 12,7 %, was die Aussagefähigkeit dieses Wertes ein wenig in Frage stellt.

5.8 Molekularbiologische Methode: DNA-Sequenzierung

5.8.1 Verfahren

Die Kenntnis der DNA-Sequenz eines Organismus ist eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der genetischen Informationsübertragung und der Genexpression, was im Falle des *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in seinem pathogenen Potential resultiert. Mittels der DNA-Sequenz lassen sich Primärstrukturen von Proteinen entschlüsseln und damit Rückschlüsse auf die Wirkungsweise des Organismus treffen. Die Sequenz ist die Folge der Mononucleotideinheiten einer Nukleinsäure und wird vom 5'- zum 3'-Ende gelesen. Die Sequenzanalyse findet in vielen Bereichen Anwendung, u. a. bei der Untersuchung von Gendefekten, die zu Erbkrankheiten führen, in der Rechtsmedizin, im Rahmen von Vaterschaftsnachweisen und bei der Identifizierung genmanipulierter Lebensmittel (SCHOTT, 1998). Die DNA-Sequenzanalyse dient der Bestimmung der Reihenfolge, in der die Monomereinheiten der DNA miteinander verknüpft sind, und wird heutzutage standardmäßig nach der enzymatischen Didesoxynucleotid-Methode nach SANGER et al. (1977) mit T7- oder Taq-Polymerase angewandt. Bei diesem Verfahren wird die enzymatische DNA-Replikation zur Herstellung einer Polynucleotidpopulation genutzt (SCHOTT, 1998). Nachdem ATKINSON et al. (1969) die hemmende Wirkung von 2', 3'-Didesoxythymidin- Triphosphat (ddTTP) auf die DNA-Polymerase I herausgefunden hatten, nachdem es anstatt des natürlichen 2'-Desoxy-thymidin-triphosphat (dTTP) eingebaut worden war, entwickelten SANGER et al.(1977) die „Kettenabbruchmethode", indem sie analoge Kettenabbruchnukleotide für die anderen Basen A, G und C in ihre Untersuchungen einbauten und sich dabei nach Versuchen von TENER et al.(1959), TENER (1966) und HOARD & OTT (1965) richteten. SANGER et al. (1977) geben eine mögliche Leseweite von bis zu 300 Nukleotiden an. Auftretende Artefakte ließen sich zumeist Kontaminanten in den DNA-Fragmenten zuschreiben. Ernsthafte Schwierigkeiten verursachen sogenannte „Basenpaar-Schleifen", die sich während der Acrylamid-Gel-elektrophorese bilden und als breite Banden an gleicher Position manifestieren. Sie sind nur bedingt ablesbar. Dennoch hat sich die Methode als geeignet erwiesen, die DNA-Sequenz eines

Organismus zu ermitteln, wobei es verschiedene Modifikationen gibt, die im Kapitel 5.8.5 diskutiert werden. Bei den hier angewendeten Verfahren wurde keine radioaktive Sequenzierung vorgenommen, sondern die DNA mit Fluoreszenfarbstoffen markiert. Nach MÜHLHARDT (2002) werden die Fluoreszenzfarbstoffe während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und können anschließend vom Gerät gemessen werden, was zu Standardleseweiten von 500 bis 1000 Nucleotiden führt, und somit deutlich längere Leseweiten als beim „Hand-Sequenzieren" ermöglicht. Die Fluoreszenzmarkierung sitzt entweder im Primer oder an den Didesoxynucleotiden, wobei MÜHLHARDT (2002) in den markierten Didesoxynucleotiden einen Vorteil sieht. Sie können mit verschiedenen Farbstoffen markiert werden, so dass die Sequenzierreaktion einer DNA-Probe nur ein einziges Gefäß beansprucht und pro Sequenz lediglich eine einzige Spur auf dem Gel benötigt wird. MÜHLHARDT (2002) weist auch darauf hin, dass nach Verwendung des *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems, wie es in dieser Arbeit zum Einsatz kam, Probleme bei der Detektion zahlreicher G-Basen auftreten können und nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Nucleotide bzw. Primer möglicherweise zu einem starken Hintergrund mit erschwertem Lesen der ersten 100 Basen führen. Er verweist auf die Angaben des Herstellers, der eine Ethanol-Fällung zur Reinigung des Ansatzes empfiehlt, wie auch in dieser Arbeit geschehen.

5.8.2 Aufreinigung der DNA

Zur Aufreinigung der DNA wurde, wie im Kapitel 3.13 beschrieben das kommerziell erhältliche QIAamp® DNA Mini Kit verwendet, was laut Herstellerangaben (09/2001) eine schnelle und leichte Methode zur Reinigung der gesamten DNA für verlässliche PCR und Southern Blot darstellt. Das Produkt wurde schon vor dieser Untersuchung mehrfach in den Laboratorien des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Marburg angewandt und gilt als verlässlich, was der Hersteller QIAGEN® bestätigt. Der ATL-Puffer bietet beste Voraussetzungen dafür, dass die DNA schon vor dem ersten Zentrifugationsschritt an der Silika-Gel-Membran fest haftet und während des Zentrifugierens auf diese adsorbiert wird. Ebenso werden durch einen geeigneten Salzgehalt und entsprechende pH-Bedingungen die Chancen reduziert, dass störende Proteinanteile oder andere Kontaminanten ebenfalls von dieser Membran zurückgehalten werden und Verunreinigungen der DNA verursachen. Dies soll durch zweimaliges Waschen mit unterschiedlichen Waschpuffern gewährleistet werden. Ein großer Vorteil dieses Verfahren ist außerdem, dass zur Aufreinigung weder eine Phenol/Chloroform-Extraktion noch eine Alkohol-Präzipitation erforderlich ist wie bei KIRBY et al. (1967) beschrieben. Dadurch fielen die durch Phenol bedingten, nicht unbedenklichen gesundheitlichen Risiken weg. Da die aufgereinigte DNA im AE-Puffer des Kits oder in Wasser gelöst vorliegt, kann sie direkt für die anschließende PCR verwendet werden. Sie soll laut

Herstellerangaben frei von Proteinen, Nukleasen und anderen Kontaminanten und Inhibitoren sein.

5.8.3 Qualität der DNA-Präparate

Die Konzentrationsbestimmung der enthaltenen DNA über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ist eine schnelle und einfach zu handhabende Methode (MÜLHARDT, 2002). Durch die Aufreinigung mit dem QIAamp® DNA Mini Kit konnte, wie auch nach der von DE LEY (1970) entwickelten Präparationsmethode (s. Kpt. 5.7.3), der erforderliche Reinheitsgrad gewährleistet werden, der im Falle des spektrophotometrisch ermittelten Quotienten $\Delta_{E\,260} : \Delta_{E\,280}$ außerdem eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung gibt. Wichtig ist hierbei, dass man eine Nukleinsäurekonzentration von 5-50 µg/ml vorzuweisen hat, da das Photometer nur in einem Bereich zwischen 0,1 und 1 OD zuverlässig misst (MÜLHARDT, 2002). Es herrscht Einigkeit darüber (THOMAS & ABELSON, 1967), dass der Wert zwischen 1,6 und 2,0 für eine reine, proteinfreie Nukleinsäurelösung liegen sollte. Zahlreiche Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass selbst hochreine Präparationen nicht über einen Wert von 1,5 kommen, wie dies auch in der vorliegenden Arbeit (s. Tabelle 8) zu sehen ist. WILFINGER et al. (1997) fanden heraus, dass diese Abweichungen vom pH und Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers abhängig sind. Um reproduzierbare und damit aussagekräftige Werte zu erhalten, wird die Verwendung von 1-3 mM Na_2HPO_4-Puffer (pH 8,5) für die Messung des Quotienten $\Delta_{E\,260} : \Delta_{E\,280}$ empfohlen.

5.8.4 Ermittlung der Basensequenz und Identifizierung der Stämme

Die Basensequenz wurde, wie in Kapitel 3.14.5 genannt, mit Hilfe des automatisierten Sequenziergerätes ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ermittelt. Es handelt sich hierbei um ein „Einzel-Kapillar"-Analysegerät, welches den großen Vorteil der nicht erforderlichen Gel-Präparation bietet und somit zu Zeit- und Kostenersparnissen führt. Er gilt als der verlässlichste und vielseitigste Kapillar-Elektrophorese-Gen-Analyseapparat der Industrie, der Anwendung in zahlreichen Untersuchungen fand (TURENNE et al., 1999; LAZARUK et al., 1998; GEORGE et al., 1997).

Nach der Sequenzierung wurden die mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ermittelten Sequenzen (mittels der integrierten Sequencing Analysis Software und der MicroSeq® Software) über die Homepage **www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi** den zugehörigen Mikroorganismen zugeordnet. Die Resultate des BLAST finden sich in Tabelle 9a. Das NCBI (National Center for Biotechnology Information) wurde 1988 als nationale Quelle für molekularbiologische Informationen ins Leben gerufen und beinhaltet unter anderem zahlreiche

öffentliche Genom-Datenbestände. Es ist ebenso für die Entwicklung von Software zur Analyse von Genomdaten zuständig. Das NCBI arbeitete bei der Identifizierung der Stämme anhand der jeweiligen DNA-Sequenzen mit folgenden Datenbeständen: EMBL, DDBJ und GenBank. Die EMBL Nucleotide Sequence Database ist das europäische Mitglied der dreigeteilten Internationalen Nucleotide Sequence Database Collaboration von EMBL/GenBank/DDBJ. Somit ist ein direkter Zugriff auf hunderte von kompletten Genomsequencen über den EBI's (European Bioinformatics Institute) Genom Server möglich. Die EMBL Nucleotide Sequence Database stellt somit Europas wesentliche Nucleotidsequenz-Quelle dar.
Die DDBJ Database ist die DNA-Daten-Bank Japans und somit das japanische Mitglied der dreigeteilten Internationalen Nucleotide Sequenz Database Collaboration. Die GenBank®Database ist das US-amerikanische Mitglied der dreigeteilten Internationalen Nucleotide Sequence Database Collaboration und beinhaltet eine kommentierte Sammlung aller öffentlich erhältlichen DNA Sequenzen, wobei von einer Zahl von 37.893.844.733 Basen in 32.549.400 Sequenzen ausgegangen werden kann (Stand: Februar 2004). BENSON et al. (2004) geben an, dass es sich hierbei um eine umfassende Datenbank mit öffentlich erhältlichen DNA Sequenzen von mehr als 140 000 bekannten Organismen handelt. Ein täglicher Datenaustausch mit der EMBL-Daten-Bibliothek in England und der DNA-Datenbank in Japan hilft, die weltweite DNA-Sequenz Informationsdeckung zu sichern. Hierbei ermöglicht BLAST die Suche nach ähnlichen Sequenzen mittels GenBank® und den anderen genannten Datenbanken. Um die verschiedenen DNA Analysenservice-Möglichkeiten zu nutzen, verweisen BENSON et al. (2004) auf die Homepage http://www.ncbi.nlm.nhi.gov. ALTSCHUL et al. (1997) veröffentlichten Informationen zur Suche nach in Datenbanken gespeicherten Sequenzen mit Hilfe von Database-Suchprogrammen. Die über **www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi** identifizierten Stämme konnten im Internet auf der folgenden Seite verglichen werden: **www.ebi.ac.uk/bioinformatics/sequenceanalysis/alignment** .

5.8.5 Auswertung und Präsentation nach Sequenzvergleich

Bei der taxometrischen Auswertung der Ergebnisse der 28 Sequenzvergleiche (s. Tab. 9b) kam, ebenso wie bei der Auswertung der DNA-DNA Hybridisierungsergebnisse, das Verfahren des „single-linkage-clustering" (SKERMAN, 1967; SNEATH & SOKAL, 1973) zur Anwendung (s. Kpt. 5.7.3).
Im Vergleich zur Darstellung der Hybridisierungsergebnisse im „single-linkage"-Dendrogramm (s. Abb. 5), ergeben die statistisch im Dendrogramm eingefügten Ergebnisse der Sequenzvergleiche (s. Abb. 6) unterschiedliche Gruppen.
Die anhand phänotypischer Merkmale ermittelten Gruppen 7, 3, 2 und 4 mit ihren repräsentativen Stämmen 34, 25, 19 und 29 (lfd. Nr.) kommen im Bereich von 89-90 %

Ähnlichkeit zu liegen. Somit wäre zu erwarten, dass sich diese Gruppen auch in ihrem biochemischen Reaktionsmuster ähnlich verhalten. Das ist nicht der Fall. Gruppe 7 (Stamm 34, lfd. Nr.) unterscheidet sich durch mangelnde Verwertung der angebotenen Zucker deutlich von den anderen Gruppen.

Ebenso sollte hervorgehoben werden, dass die Gruppe 3 mit ihren Vertretern 25 und 23 (lfd. Nr.) in zwei verschiedenen Ästen des Dendrogrammes auftaucht, obwohl die beiden Stämme dieselben phänotypischen Eigenschaften aufwiesen. Gruppe 5 mit ihrem Vertreter 31 (lfd. Nr.) fällt durch den deutlichen „similarity"-Wert von 25 % im Vergleich zu den anderen Gruppen auf (s. Kpt. 5.8.7).

Trotzdem wird deutlich, dass das Dendrogramm nach erfolgtem Sequenzvergleich verschiedene Entitäten von *A.a.* widerspiegelt, was im Dendrogramm nach erfolgter DNA-DNA Hybridisierung nicht der Fall war. Weshalb die unterschiedlichen Äste allerdings nicht die verschiedenen Herkunftsquellen/Pathogenitäten und biochemischen Reaktionsmechanismen reflektieren, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.8.6 Andere Sequenziermethoden

Neben der von SANGER et al. (1977) entwickelten enzymatischen Didesoxynukleotidmethode, lässt sich die Sequenz langkettiger DNA-Fragmente auch nach dem von MAXAM & GILBERT (1977) entwickelten chemischen Abbauverfahren bestimmen. Bei diesem Verfahren erhält man die Polynucleotidpopulation aufgrund eines partiellen chemischen Abbaus des zu sequenzierenden DNA-Fragments. Und aus den Sequenzen der Polynucleotide kann die Gesamtsequenz ermittelt werden (SCHOTT, 1998). MAXAM & GILBERT (1977) geben an, dass diese chemische Sequenzierungsmethode leicht zu kontrollieren ist. Da dieses Verfahren nicht ohne radioaktive Markierung einhergeht, ergibt sich daraus der Nachteil, dass neben der radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente auch alle Verunreinigungen in Form von DNA-Fragmenten mitmarkiert werden und beim anschließenden chemischen Abbau ebenso mit abgebaut werden, was zu merkwürdigen Bandenmustern im Autoradiogramm führt (SCHOTT, 1998). Weiterhin weist diese Methode den Nachteil auf, dass die chemische Derivatisierung der Nucleobase bezüglich der Selektivität salzempfindlich ist und die DNA nur unter Salzfreiheit präpariert werden sollte.

Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der Tatsache, dass die Elimination der modifizierten Basen einhergehend mit Kettenbruch vom pH-Wert abhängig ist und unvollständig ablaufen kann.

Die Methode nach MAXAM & GILBERT (1977) wird heutzutage nicht mehr verwendet (LÖFFLER, 1998; MÜHLHARDT, 2002).

5.8.7 Interpretation der Ergebnisse des Basensequenzvergleiches: Basensequenzhomologie innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Bunten Reihe und der DNA-DNA Hybridisierung

Die über das Internetprogramm **www.ebi.ac.uk/bioinformatics/sequenceanalysis/alignment** ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 9b zu sehen. Von den 28 Sequenzvergleichen fanden sich bei 6 von 28 Messungen Werte über 88 % Sequenzähnlichkeit. Diese Werte ergaben sich bei den DNA-Vergleichen der Stämme 19, 25, 29 und 34 (lfd. Nr.), die somit die größte genetische Ähnlichkeit aufwiesen. Vergleicht man diese prozentualen Werte mit den prozentualen DNA-DNA Bindungsraten, die bei der DNA–DNA Hybridisierung dieser Stämme ermittelt wurden, ergibt sich folgendes Bild: Die durch die DNA-Sequenzierung mit anschließendem Sequenzvergleich ermittelten Ähnlichkeits (Similarity)-Höchstwerte, die im Bereich von 88,3 % bis 90,5% zu liegen kommen, entsprechen nicht den Höchstwerten, die bei der DNA–DNA Hybridisierung während des DNA-Vergleiches der gleichen Stämme ermittelt wurden. Lediglich der DNA-Vergleich der Stämme 19 und 34 ergab sowohl den Höchstwert von 90,5 % Basensequenzhomologie im Falle des internetgestützten Basensequenzvergleiches, als auch 100 % DNA-Bindungsrate im Falle der DNA–DNA Hybridisierung. Dennoch lässt sich feststellen, dass insgesamt die Ähnlichkeit zwischen diesen Stämmen bei beiden Versuchsreihen verhältnismäßig hoch ist. Beim Sequenzvergleich der DNA des Stammes 31 (lfd. Nr.) mit der DNA der anderen 7 repräsentativen Stämme zeigt sich, dass die Basensequenzhomologie ausgesprochen niedrig und immer unterhalb von 25 % zu beobachten ist. Dies unterscheidet sich deutlich von den Ergebnissen der DNA–DNA Hybridisierung, bei welcher die DNA des Stammes 31 mit der DNA der Stämme 19, 29 und 34 (lfd. Nr.) eine 100 %ige Bindungsrate einging und somit eine extrem hohe Basensequenzhomolgie nahe legte, ebenso von den Werten, die sich nach DNA–DNA Hybridisierung zwischen der DNA des Stammes 31 mit jeweils der DNA der Stämme 13, 23 und der DNA des Stammes 33 (lfd. Nr.) bildete. Sie lag bei 84 %. Lediglich die 73 %ige Bindungsrate zwischen der DNA des Stammes 31 und der DNA des Stammes 25 (lfd. Nr.) stellte auch bei der DNA–DNA Hybridisierung den niedrigsten Wert dar, der jedoch bei einer Standardabweichung von 12,7 % unter Vorbehalt betrachtet werden muss.
Das Sequenziergerät war trotz direktem Internetgestützten Vergleich der Sequenz des Stammes 31 mit entsprechenden Sequenzen in anerkannten Datenbanken (s. Kpt. 5.8.4) nicht imstande, einen Identifikationshinweis zu geben. Die DNA des als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* vermuteten und untersuchten Mikroorganismus, wurde nach DNA-Datenbankvergleich einem „unidentified bacterium“ zugeordnet. Hinzu kommt, dass schon bei Messung der Reinheit und der Bestimmung der Konzentration der DNA kein Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} gemessen werden konnte und die gemessene Konzentration 0 µg/ml entsprach. Außerdem war die vom

Sequenziergerät ermittelte Sequenz wesentlich länger im Vergleich zu den Sequenzen anderer Stämme. Unter Berücksichtigung dieser Nachteile, ist es fragwürdig, ob die niedrigen Werte, nach dem Vergleich der Sequenz des Stammes 31 mit der DNA-Sequenz der anderen Stämme als aussagekräftig angesehen werden können.

Betrachtet man die restlichen „Similarity"-Werte, die die Basensequenzhomologie zwischen den einzelnen Stämmen widerspiegeln sollen, so bewegen sich die Werte in einem Bereich zwischen 58 % und 77 %. Das stellt einen deutlichen Unterschied zu den hohen Werten aus der Versuchsreihe der DNA–DNA Hybridisierung dar und liefert kein einheitliches Bild in Hinblick auf die Basensequenzhomologie. Es wäre jedoch denkbar, dass intraspezifische genetische Unterschiede existieren, da die verglichenen 8 Stämme aus phänotypisch verschiedenen Gruppen stammten. Weder die Ergebnisse mit der DNA-DNA Hybridisierung, noch die Ergebnisse des Basensequenzvergleiches spiegeln die Erwartungen nach der vorangegangenen phänotypischen Untersuchung wider. Demnach hätten sich die genetischen Unterschiede gemäß den Ergebnissen der Bunten Reihe zwischen den Stämmen 13 und 19 manifestieren müssen, da hier die Verwertung von Xylose von den phänotypischen Gruppenvertretern unterschiedlich ausfiel. Die DNA der Stämme 13 und 19 zeigten bei der DNA-DNA Hybridisierung jedoch eine 100 %ige DNA Bindungsrate, was ein Hinweis auf eine extrem hohe Basensequenzhomologie ist und so nicht erwartet wurde. Hierbei spiegelt der ermittelte DNA-Basensequenz-Vergleichswert von 70,9 % nach Sequenzierung eher die Erwartungen wider.

Phänotypisch besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Stämmen, die Galaktose verwerten können und denen, die dies nicht können. Trotzdem ergeben sich hohe DNA-Bindungsraten zwischen der DNA des Galaktose-verwertenden Stammes 29 (lfd. Nr.) und der DNA der anderen Repräsentanten, die sich zwischen 90 % und 100 % bewegen. Lediglich Stamm 34 (lfd. Nr.) erfüllt im Vergleich zu Stamm 29 die genetischen Erwartungen. Die DNA-Bindungsrate liegt bei 86 % und repräsentiert somit erwartungsgemäß den Unterschied zwischen einem fermentativen Stamm wie dem Stamm 29 und einem wenig fermentativen Stamm wie Stamm 34, der trotzdem der Gattung *Actinobacillus actinomycetemcomitans* anzugehören scheint. Im Unterschied dazu liegen die Basensequenz-Vergleichswerte des Galaktose-verwertenden Stammes 29 mit den anderen Stämmen zwischen 69 % und 88 %, wenn der extrem niedrige Wert, der sich aus dem Vergleich mit der Sequenz des Stammes 31 (lfd. Nr.) ergab, außer Acht gelassen wird. Mit diesen Werten ließe sich die phänotypische Eigenart sicher besser bestätigen. Da aber die anderen Werte des internetgestützten Basensequenzvergleiches auch in diesem Bereich liegen, kann dies nicht als Bestätigung dieser phänotypischen Besonderheit angesehen werden.

Bei Analyse des aus phänotypischer Sicht eher untypischen *A.a.* Stammes 34 (lfd. Nr.), zeigt sich, dass er bei der DNA–DNA Hybridisierung mit der DNA der Stämme 19 und 31 (lfd. Nr.) eine Bindungsrate von 100 % aufweist, was nicht erwartet wurde. Dieser Stamm 34, der keinen

der ihm gebotenen Zucker verwerten konnte, scheint mit Stamm 19, der im Vergleich fast alle der für *A.a.* üblichen Zucker umsetzte, genetisch nahezu identisch zu sein. Selbst bei der DNA-Sequenz-Vergleichsanalyse zeigt sich der höchste Wert für „Similarity“ in dieser Untersuchung. Mit diesen unerwarteten Ergebnissen konnte deutlich gemacht werden, dass selbst bei ausgeprägten phänotypischen Unterschieden innerhalb einer Spezies kein ausgeprägter genetischer Unterschied vorliegen muss.

Ebenso deutlich sind die Unterschiede in der Basensequenzhomologie, die mit den beiden genannten molekularbiologischen Methoden ermittelt werden konnten. Die DNA-Hybridisierung führte zu verhältnismäßig hohen Ergebnissen in Hinblick auf die DNA-Bindungsrate (D %), die wiederum in keinem nachvollziehbaren Verhältnis zu den ermittelten Resultaten nach dem Vergleich der DNA-Basensequenz der repräsentativen Stämme stehen.

Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben von VAN STEENBERGEN et al. (1994), die im Rahmen der Restriktionsendonukleasen Analyse (REA) der gesamten chromosomalen DNA verwirrende Resultate ermittelten, die eine beachtliche Heterogenität innerhalb der Spezies im Rahmen einer Untersuchung von 32 *A.a.* Stämmen darstellten. Während ZAMBON et al. (1990) nur drei DNA-Hauptmuster fanden, ergaben sich bei den Untersuchungen von VAN STEENBERGEN et al. (1994) ein DNA-Typ beim Serotyp a und c und drei wiederum innerhalb der Serotyp b Stämme, neben denen aber auch zusätzlich noch 24 Subtypen gefunden wurden. Da in der vorliegenden Arbeit keine Serotypisierung vorgenommen wurde, können die Ergebnisse nicht mit denen von VAN STEENBERGEN et al. (1994) verglichen werden. Es wird jedoch deutlich, dass innerhalb der Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans* eine ausgeprägte genetische Varianz vorliegt, die insbesondere durch den hier durchgeführten Basensequenzvergleich verdeutlicht werden konnte.

5.8.7 Die Ergebnisse des Basensequenzvergleiches in Hinblick auf die Pathogenität von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Bei Betrachtung der Höchstwerte, die sich bei den Basensequenz-Vergleichen der Stämme 19, 25, 29 und 34 (lfd. Nr.) ergaben, zeigt sich, dass die Stämme die größte genetische Ähnlichkeit aufweisen. Demnach ließe sich auch eine entsprechende Ähnlichkeit bezüglich der pathologischen Eigenschaften vermuten. Im Falle der genannten Stämme 19, 25, 29 und 34 entstammen die Stämme 19 und 34 einer Blutkultur/Endokarditis, während der Stamm 25 einer Parodontitis entstammt und die Herkunftsquelle des Stammes 29 nicht angegeben war. Da ein Zusammenhang zwischen *A.a.* Kulturen im Blut, auf den Herzklappen/Herzinnenhaut und im Parodont gesehen werden kann (FLORES-DE-JACOBY & MENGEL, 2004; OTTEN et al., 1998; KAPLAN et al., 1989; GOULD et al., 1985), ist eine Korrelation möglich. Es konnte nachgewiesen werden, dass bereits bei Tätigkeiten des Alltags wie Kaugummikauen

(LINZENMEIER & LAUTENBACH, 1959) oder Zahnpflege (RAHN, 1989), sowie bei zahnärztlichen Behandlungsmaßnahmen wie beispielsweise einer endodontischen Behandlung (HEIMDAHL & NORD, 1990), Zahnsteinentfernung (CHOW et al., 1978) oder Lokalanästhesie (OTTEN et al., 1987; RAHN et al., 1986) Bakteriämien auftreten können. Im Falle von zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen kann immer dann eine Bakteriämie auftreten, wenn das Parodont der Zähne traumatisiert wird (OTTEN et al., 1998), weshalb im marginalen Parodont der Ausgangspunkt für Bakteriämien gesehen werden kann.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der anderen Stämme lassen sich keine Rückschlüsse bezüglich unterschiedlicher oder gleicher Erkrankungsquellen machen. Sowohl Stämme der gleichen Erkrankungsquelle, als auch Stämme aus unterschiedlichen Entnahmeorten zeigen deutliche genetische Differenzen, indem ausgesprochen niedrige „Similarity"-Werte bei der Gensequenz-Vergleichsanalyse erzielt wurden.

Nachfolgende Studien sollten sich nicht nur nach der Gensequenz-Analyse orientieren, um Rückschlüsse auf pathogene Wirkungsmechanismen von Mikroorganismen zu gewinnen, sondern auch andere Methoden benutzen, die sich als geeignet erwiesen haben, einen Keim wie *A.a.* bezüglich seiner pathogenen Wirkungsunterschiede zu differenzieren.

Untersuchungen von VAN STEENBERGEN et al. (1994) haben ergeben, dass verschiedene Typisierungsmethoden erforderlich sind, um im Rahmen epidemiologischer Studien die Verbreitung bestimmter pathogener Klone des *Actinobacillus actinomycetemcomitans* evaluieren zu können. VAN STEENBERGEN et al. (1994) fanden heraus, dass die klassischen Methoden wie Serotypisierung und Biotypisierung zur Differenzierung nur weniger, deutlicher Typen führen, während Methoden, die DNA-Analysen einbeziehen, eine größere Heterogenität aufdecken.

Da Patienten gewöhnlich nur mit einer Serotyp-Variante von *A.a.* infiziert sind (ASIKAINEN et al., 1991) und sich dadurch Unterschiede hinsichtlich der Virulenz des Mikroorganismus manifestieren, entwickelten SUZUKI et al. (2001) eine Methode, mit welcher die verschiedenen *A.a.* Serotypen (a–e) mittels Multiplex PCR direkt aus klinischen Proben identifiziert werden konnten.

Die unspezifische Adhärenz von *A.a.,* die durch die Anwesenheit langer Fibrillen gewährleistet wird, deren Vorhandensein wiederum von der Anwesenheit des *tadABCDEFG* Genes abhängt (KACHLANY et al., 2000), demonstriert deutlich die innerhalb des Genoms verankerten Pathogenitätsmechanismen von *A. actinomycetemcomitans.* In der vorliegenden Arbeit ließ sich weder durch die DNA–DNA Hybridisierung, noch durch die vergleichende Sequenzanalyse dieser Genbereich ausmachen, so dass auch keine Rückschlüsse auf bestimmte Pathogenitätsfaktoren der untersuchten Stämme möglich waren.

VI. TABELLEN

Tabelle 1 : **Liste der untersuchten Bakterienstämme**

Lfd. Nr.	Erstbeschreiber Stamm-Nr.	Sammlungs-Nr.	Species, Subspecies, Biotyp	Quelle	Ort, Jahr
1	S.Pohl B 10374	HIM 967-8	*A. actinomycetemcomitans*	Mensch, Zahntaschenabszeß	Heidelberg, 1985
2	Dr.Gebhardt J.Lambrecht K.H.Portheine, Rotter 1	MCCM 00251	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Blutkultur	München, 1989
3	H.Reynolds SUNY ab 75	MCCM 02639	*A.actinomycetemcomitans*, Serotyp a	Mensch, subgingivale Plaque	USA, 1987
4	Schwandt 9 W 2	MCCM 00085	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Zahnhalsabstrich, Parodontitis	Marburg, 1982
5	Dr.Gebhardt J.Lambrecht K.H.Portheine, Rotter 2	MCCM 00276	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Blutkultur	München,1989

Tabelle 1 (Fortsetzung) :

6	H.Krüpe 6	MCCM 02823	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Hirnabszess	Fulda, 1985
7	Dr.Dr.A.Podbidski Va I 5930 / 89 Aachen	MCCM 00335	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Parotisabszeß	Aachen, 1989
8	G.Schröter 18 / 3859	MCCM 02179	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	----------
9	----------	MCCM 02730	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	Göteborg, 1982
10	M.Baum Ki 1	MCCM 03163	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, subgingivale Plaque	Marburg, 1997
11	W.Mannheim MCC 3	MCCM 02180	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Gingivaltasche	Marburg, 1983
12	B 4 0315 / 12	MCCM 02292	*A.actinomycetemcomitans*, fastidious, B	Mensch, Blutkultur	München, 1994
13	CDC A 1916	MCCM 02727	*A.actinomycetemcomitans*, B, Serotyp a	Mensch,Blutkultur	Denver,Colorado
14	----------	MCCM 03247	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	----------
15	M.Baum MC 10	MCCM 03164	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, subgingivale Plaque	Marburg, 1997

Tabelle 1 (Fortsetzung) :

16	CCOG 1210 (10-6-71)	MCCM 02729	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	Göteborg, 1983
17	CDC B 5386	MCCM 02728	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, chest aspirate, child	Seattle, USA
18	M.Baum Z 12 a	MCCM 03097	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, weibl., Parodontitis	Marburg, 1996
19	H.Hof B 658	MCCM 02808	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, Blutkultur, Endocarditis	Würzburg, 1982
20	H.Reynolds 44	MCCM 02638	*A.actinomycetemcomitans*, Serotyp b	----------	USA, 1987
21	M.Baum St 11	MCCM 03165	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, subgingivale Plaque	Marburg, 1997
22	Stuttgart 18 / 3859	MCCM 02474	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch	Stuttgart, 1987
23	21 C	MCCM 00135	*A.actinomycetemcomitans*	----------	Marburg, 1982
24	M I G 3	MCCM 00213	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, Gingivaltasche	Marburg, 1987

Tabelle 1 (Fortsetzung) :

25	21 A-I Schwandt	MCCM 02809	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, Parodontitis	Marburg, 1982
26	22 A	MCCM 02811	*A.actinomycetemcomitans*	----------	Marburg, 1982
27	----------	MCCM 02731	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	Göteborg, 1983
28	79 / 2 / 86	MCCM 02183	*A.actinomycetemcomitans*, B	----------	----------
29	P. Holm NCTC 9710T	MCCM 00145	*A.actinomycetemcomitans*, B, Serotyp c	----------	----------
30	M.Baum EXYZ 1	MCCM 03162	*A.actinomycetemcomitans*	Mensch, subgingivale Plaque	Marburg, 1997
31	BLK 1040	MCCM 01089	*A.actinomycetemcomitans*, B, mannitol-negativ	Mensch, Blutkultur	Zürich, 1991
32	CDC B 5279	MCCM 02810	*A.actinomycetemcomitans*, B, Serotyp b	Mensch, Mandibularabszeß	----------
33	M.Baum 24	MCCM 03098	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, weibl., 24 J., Parodontitis	Marburg, 1996
34	A.Katz 1612	MCCM 02174	*A.actinomycetemcomitans*, B	Mensch, Blutkultur	Hamburg, 1993

Tabelle 2: **Kulturmedien für Massenkulturen**

Stämme	Basalmedium	Glukose	Hefeextrakt	Rinderserum	Vitox®
Lfd. Nr.		0,2 % (v/v)	0,4 % (v/v)	0,5 % (v/v)	1 % (v/v)
13	PP	-	+	-	+
19	PP	+	+	+	-
23	PP	-	+	-	+
25	PP	+	+	+	-
29	PP	+	+	+	-
31	PP	-	+	-	+
33	PP	-	+	-	+
34	PP	-	+	-	+

Tabelle 3 : Biochemische Leistungen der untersuchten Bakterienstämme

GRUPPE	1							
Lfd. Nr.[a]	1	2	3	4	5	6	7	8
Wuchsform	s	s	s	s	s	s	s	s
Pigment (gelb)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adhaerenz	-	-	-	-	-	-	-	-
Hämolyse (Schaf)	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD-Bedürftigkeit	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2-Abhängigkeit	+	+	+	+	+	+	+	+
TMPD-Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	+	+	+	+	+	+	+	w
Arginin-Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indolbildung	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose (Säure)	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose (Gas)	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbit	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcit	-	-	-	-	-	-	-	-
m-Inosit	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-Glucose/Ktr.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.

Tabelle 3 (Forsetzung) :

GRUPPE	1					2		
Lfd. Nr.[a]	9	10	11	12	13	14	15	16
Wuchsform	s	s	s	s	s	r	s	s
Pigment (gelb)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adhaerenz	-	+	-	-	-	-	-	+
Hämolyse (Schaf)	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD-Bedürftigkeit	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2-Abhängigkeit	+	+	+	+	+	+	+	+
TMPD-Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginin-Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indolbildung	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose (Säure)	+	+	w	+	+	+	+	+
D-Glucose (Gas)	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbit	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcit	-	-	-	-	-	-	-	-
m-Inosit	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-Glucose/Ktr.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.

Tabelle 3 (Fortsetzung) :

GRUPPE	2					3		
Lfd. Nr.[a]	17	18	19	20	21	22	23	24
Wuchsform	s	s	r	s	s	s	s	r
Pigment (gelb)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adhaerenz	-	-	-	-	-	-	+	+
Hämolyse (Schaf)	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD-Bedürftigkeit	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2-Abhängigkeit	+	+	+	+	+	+	+	+
TMPD-Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	+	w	+	+	+	+	w	w
Arginin-Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indolbildung	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose (Säure)	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose (Gas)	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+)	+	w	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbit	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcit	-	-	-	-	-	-	-	-
m-Inosit	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-Glucose/Ktr.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.

Tabelle 3 (Fortsetzung) :

GRUPPE	3		4				5	6
Lfd. Nr.[a]	25	26	27	28	29	30	31	32
Wuchsform	s	r	s	s	s	s	s	s
Pigment (gelb)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adhaerenz	-	-	-	-	-	-	+	-
Hämolyse (Schaf)	-	-	-	-	-	-	-	-
NAD-Bedürftigkeit	-	-	-	-	-	-	-	-
CO2-Abhängigkeit	+	+	+	+	+	+	+	+
TMPD-Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratreduktion	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginin-Dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indolbildung	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
ß-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose (Säure)	+	+	+	+	+	+	+)	+
D-Glucose (Gas)	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Galactose	-	-	w	w	w	+)	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	w	+)
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Sorbit	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcit	-	-	-	-	-	-	-	-
m-Inosit	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-Glucose/Ktr.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f.	l.f

.

Tabelle 3 (Fortsetzung) :

GRUPPE	6	7
Lfd. Nr.[a]	33	34
Wuchsform	s	r
Pigment (gelb)	-	-
Adhaerenz	+	+
Hämolyse (Schaf)	-	-
NAD-Bedürftigkeit	-	-
CO2-Abhängigkeit	+	+
TMPD-Oxidase	+	+
Katalase	+	+
Nitratreduktion	-	+
Arginin-Dihydrolase	-	-
L-Sorbose	-	-
Adonitol	-	-
Gelatinase	-	-
Lysin-Decarboxylase	-	-
Ornithin-Decarboxylase	-	-
Indolbildung	-	-
Urease	-	-
ß-Galactosidase (ONPG)	-	-
D-Glucose (Säure)	+	-
D-Glucose (Gas)	-	-
D-Galactose	-	-
D-Mannose	+	-
D-Fructose	+	-
L-Rhamnose	-	-
D-Xylose	w	-
L-Arabinose	-	-
D-Saccharose	-	-
Trehalose	-	-
Maltose	+	-
D-Lactose	-	-
Raffinose	-	-
Stärke	-	-
D-Mannit	-	-
D-Sorbit	-	-
Dulcit	-	-
m-Inosit	-	-
Salicin	-	-
Aesculin	-	-
OF-Glucose/Ktr.	l.f.	n. f.

+ : positiv innerhalb 48 h; − : negativ im Sinne des Tests; (+) : verzögert positiv (mehr als 48 h); w : schwach positiv; s: glatte Kolonieform; r: raue Kolonieform

[a] **= Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1**

Tabelle 4a : **Ergebnisse des BD BBL CRYSTAL™- *Neisseria/Haemophilus*-Testsystem**

Stämme/ Lfd. Nr.[a]	Errechnete Profilnummer	Identifizierung des Mikroorganismus
5, 9,10,12-14, 16,17,20-22, 24,28-31,32,34	2004000060	*Moraxella osloensis*
1-4,6-8,11, 15,19,25-27	2446400060	*Kingella kingae*
18 23 33	2446410060 2656420161 2446430161	***Actinobacillus actino-mycetemcomitans***

Tabelle 4b : **Ergebnisse des BD BBL CRYSTAL™- Enteric/Nonfermenter-Testsystem**

Stämme/ Lfd. Nr.[a]	Errechnete Profilnummer	Identifizierung des Mikroorganismus
1-34	3400244000 3400244400 3400200144 3400244004	*Pasteurella multocida*

[a] **= Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1**

Tabelle 5 : Reinheitsbestimmung der DNA-Präparate anhand der Extinktionskoeffizienten

Lfd. Nr.[a]	Sammlungsnummer MCCM	$\frac{\Delta E_{260}}{\Delta E_{234}}$	$\frac{\Delta E_{260}}{\Delta E_{280}}$
13	02727	2,1	1,9
19	02808	1,9	1,9
25	02809	2,1	1,9
23	00135	2,1	1,9
29	00145	2,3 *	1,9*
31	01089	2,1	1,9
33	03098	2,1	1,9
34	02174	1,9	1,9

[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

* = Werte nach S. BURBACH (1987)

Tabelle 6a : Gruppeneinteilung anhand biochemischer/phänotypischer Charakterisierung (siehe Bunte Reihe, Tabelle 3)

Gruppennummerierung	Laufende Stammnummern[a]
Gr. 1	1 - 13
Gr. 2	14 - 21
Gr. 3	22 - 26
Gr. 4	27 - 30
Gr. 5	31
Gr. 6	32 - 33
Gr. 7	34

Tabelle 6b : Ausgewählte Repräsentanten der 7 Gruppen

Gruppennummer	Laufende Stammnummer[a]	MCCM-Nummer (Sammlungsnummer)
Gr.1	13	02727
Gr.2	19	02808
Gr.3	25 und 23	02809 und 00135
Gr.4	29	00145
Gr.5	31	01089
Gr.6	33	03098
Gr.7	34	02174

Tabelle 6c : Zu hybridisierende Gruppen

Gruppe 1/ Laufende Stammnummer[a]	mit	Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]
13	mit	Gr. 2 / 19
13	mit	Gr. 3 / 25
13	mit	Gr. 3 / 23
13	mit	Gr. 4 / 29
13	mit	Gr. 5 / 31
13	mit	Gr. 6 / 33
13	mit	Gr. 7 / 34

Tabelle 6c (Fortsetzung) :

Gruppe 2/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
19	mit	Gr. 3 / 25
19	mit	Gr. 3 / 23
19	mit	Gr. 4 / 29
19	mit	Gr. 5 / 31
19	mit	Gr. 6 / 33
19	mit	Gr. 7 / 34

Gruppe 3/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
25	mit	Gr. 3 / 23
25	mit	Gr. 4 / 29
25	mit	Gr. 5 / 31
25	mit	Gr. 6 / 33
25	mit	Gr. 7 / 34

Gruppe 4/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
29	mit	Gr. 3 / 23
29	mit	Gr. 5 / 31
29	mit	Gr. 6 / 33
29	mit	Gr. 7 / 34

Gruppe 5/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
31	mit	Gr. 3 / 23
31	mit	Gr. 6 / 33
31	mit	Gr. 7 / 34

Tabelle 6c (Fortsetzung) :

Gruppe 6/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
33	mit	Gr. 3 / 23
33	mit	Gr. 7 / 34

Gruppe 7/ Laufende Stammnummer[a]	**mit**	**Gruppennummer/ Laufende Stammnummer[a]**
34	mit	Gr. 3 / 23

[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Tabelle 7 : **DNA – DNA Bindungsrate (D %) und Standardabweichung (s %) der untersuchten Bakterienstämme**

Gruppennummer/ Referenzstamm[a]	Gruppennummer/ Stamm[a]	D (%)	s (%)
Gr. 1 / 13	Gr. 2 / 19	100	5,0
13	Gr. 3 / 25	100	11,8
13	Gr. 3 / 23	100	5,6
13	Gr. 4 / 29	83	4,2
13	Gr. 5 / 31	84	8,2
13	Gr. 6 / 33	100	9,3
13	Gr. 7 / 34	76	5,7
Gr. 2 / 19	Gr. 3 / 25	85	4,7
19	Gr. 3 / 23	88	9,3
19	Gr. 4 / 29	91	9,3
19	Gr. 5 / 31	100	8,5
19	Gr. 6 / 33	74	12,0
19	Gr. 7 / 34	100	8,6
Gr. 3 / 25	Gr. 3 / 23	100	9,9
25	Gr. 4 / 29	93	10,0
25	Gr. 5 / 31	73	12,7
25	Gr. 6 / 33	100	9,9
25	Gr. 7 / 34	85	7,0
Gr. 4 / 29	Gr. 3 / 23	90	5,5
29	Gr. 5 / 31	100	9,1
29	Gr. 6 / 33	91	3,3
29	Gr. 7 / 34	86	7,7
Gr. 5 / 31	Gr. 3 / 23	92	6,2
31	Gr. 6 / 33	81	12,8
31	Gr. 7 / 34	100	8,3
Gr. 6 / 33	Gr. 3 / 23	100	3,3
33	Gr. 7 / 34	87	8,8
Gr. 7 / 34	Gr. 3 / 23	90	11,8

[a] **= Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1**

Tabelle 8 : Ergebnisse der Reinheitskontrolle der aufgereinigten DNA

Laufende Stammnummer[a]	MCCM-Sammlungsnummer	Gemessene Konzentration	Absorptionsquotient A_{260}/A_{280}
22	02474	297 µg/ml	1,71
33	03098	302 µg/ml	1,47
05	00276	792 µg/ml	1,46
16	02729	373 µg/ml	1,12
06	02823	259 µg/ml	1,86
01	HIM 967-8	246 µg/ml	1,91
03	02639	92 µg/ml	2,89
08	02179	710 µg/ml	1,45
09	02730	868 µg/ml	1,94
32	02810	632 µg/ml	1,81
28	02183	446 µg/ml	1,75
34	02174	344 µg/ml	1,94
30	03162	106 µg/ml	2,52
23	00135	154 µg/ml	1,83
11	02180	189 µg/ml	1,49
25	02809	72 µg/ml	2,27
17	02728	207 µg/ml	1,80
15	03164	31 µg/ml	1,47
02	00251	10 µg/ml	1,47
07	00335	10 µg/ml	1,47
24	00213	41 µg/ml	1,95
21	03165	21 µg/ml	0,99
14	03247	211 µg/ml	1,32
18	03097	69 µg/ml	1,95
29	00145	310 µg/ml	1,68
31	01089	0 µg/ml	/
04	00085	239 µg/ml	1,61
10	03163	10 µg/ml	/
12	02292	131 µg/ml	1,79
19	02808	10 µg/ml	/
20	02638	208 µg/ml	1,62
27	02731	248 µg/ml	1,83
26	02811	51 µg/ml	1,63
13	02727	82 µg/ml	1,95

[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Tabelle 9a : Ergebnisse der Gelelektrophorese nach der PCR + Ergebnisse der internetgestützten Auswertung nach dem Sequenziervorgang (s. auch Abb. 9a/b).

Geltaschen-nummer	Laufende Stammnummer[a]	MCCM-SammlungsNr.	PCR	Sequenzer-Identifikation
1	22	02474	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
2	33	03098	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
3	05	00276	Positiv	*Glacial ice bacterium*
4	16	02729	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
5	06	02823	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
6	01	HIM 967-8	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
7	03	02639	Negativ	----------
8	08	02179	Positiv	*Glacial ice bacterium*
9	09	02730	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
10	32	02810	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
11	28	02183	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
12	34	02174	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
13	30	03162	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
14	23	00135	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
15	11	02180	Negativ	----------
16	25	02809	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
17	17	02728	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
18	15	03164	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
19	02	00251	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
20	07	00335	Negativ	----------
21	24	00213	Positiv	*Glacial ice bacterium*
22	21	03165	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
23	14	03247	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
24	18	03097	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
25	29	00145	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
26	31	01089	Positiv	*Nicht gelaufen*
27	04	00085	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
28	10	03163	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
29	12	02292	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
30	19	02808	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
31	20	02638	Positiv	*Unidentified bacterium gene for 16S rRNA*
32	27	02731	Positiv	*Uncultured bacterim*
33	26	02811	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*
34	13	02727	Positiv	*A.actinomycetemcomitans*

[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Tabelle 9b : Ergebnisse des internetgestützten Sequenzvergleiches

Gruppennr./ Referenzstamm[a]	Gruppennr./ Stamm[a]	Length	Identity (%)	Similarity (%)	Gaps (%)	Score
Gr. 1 / 13	Gr. 2 / 19	1090	71,2	70,9	21,6	2932,5
13	Gr. 3 / 25	1087	71,6	71,3	20,7	2958,5
13	Gr. 3 / 23	1098	61,7	61,2	25,1	2181,0
13	Gr. 4 / 29	1091	68,7	68,6	22,8	2778,5
13	Gr. 5 / 31	1552	25,1	24,7	61,3	237,0
13	Gr. 6 / 33	1136	68,2	67,5	18,2	2639,0
13	Gr. 7 / 34	1087	71,6	71,1	19,9	2975,0
Gr. 2 / 19	Gr. 3 / 25	900	90,3	90,0	3,6	3629,5
19	Gr. 3 / 23	929	75,5	75,0	12,8	2574,5
19	Gr. 4 / 29	894	89,5	89,0	4,0	3550,5
19	Gr. 5 / 31	2407	17,5	17,3	74,2	295,5
19	Gr. 6 / 33	1033	72,6	72,5	17,6	2775,5
19	Gr. 7 / 34	907	91,2	90,5	4,1	3674,5
Gr. 3 / 25	Gr. 3 / 23	917	76,9	76,3	9,9	2618,0
25	Gr. 4 / 29	901	89,3	89,0	5,1	3582,5
25	Gr. 5 / 31	2431	16,9	16,7	75,3	278,5
25	Gr. 6 / 33	1036	72,9	72,5	17,8	2832,0
25	Gr. 7 / 34	910	90,4	90,2	4,3	3728,5
Gr. 4 / 29	Gr. 3 / 23	927	74,6	74,0	13,7	2481,5
29	Gr. 5 / 31	2407	17,2	17,2	74,7	285,0
29	Gr. 6 / 33	1046	69,8	69,7	21,0	2678,5
29	Gr. 7 / 34	906	88,4	88,3	5,2	3521,0
Gr. 5 / 31	Gr. 3 / 23	2390	16,8	16,4	74,4	288,5
31	Gr. 6 / 33	2510	16,5	15,7	74,6	227,0
31	Gr. 7 / 34	2456	15,7	15,3	76,2	293,0
Gr. 6 / 33	Gr. 3 / 23	1091	59,2	58,7	29,6	2140,5
33	Gr. 7 / 34	1030	74,3	73,8	15,8	2897,5
Gr. 7 / 34	Gr. 3 / 23	936	75,2	74,6	12,8	2624,0

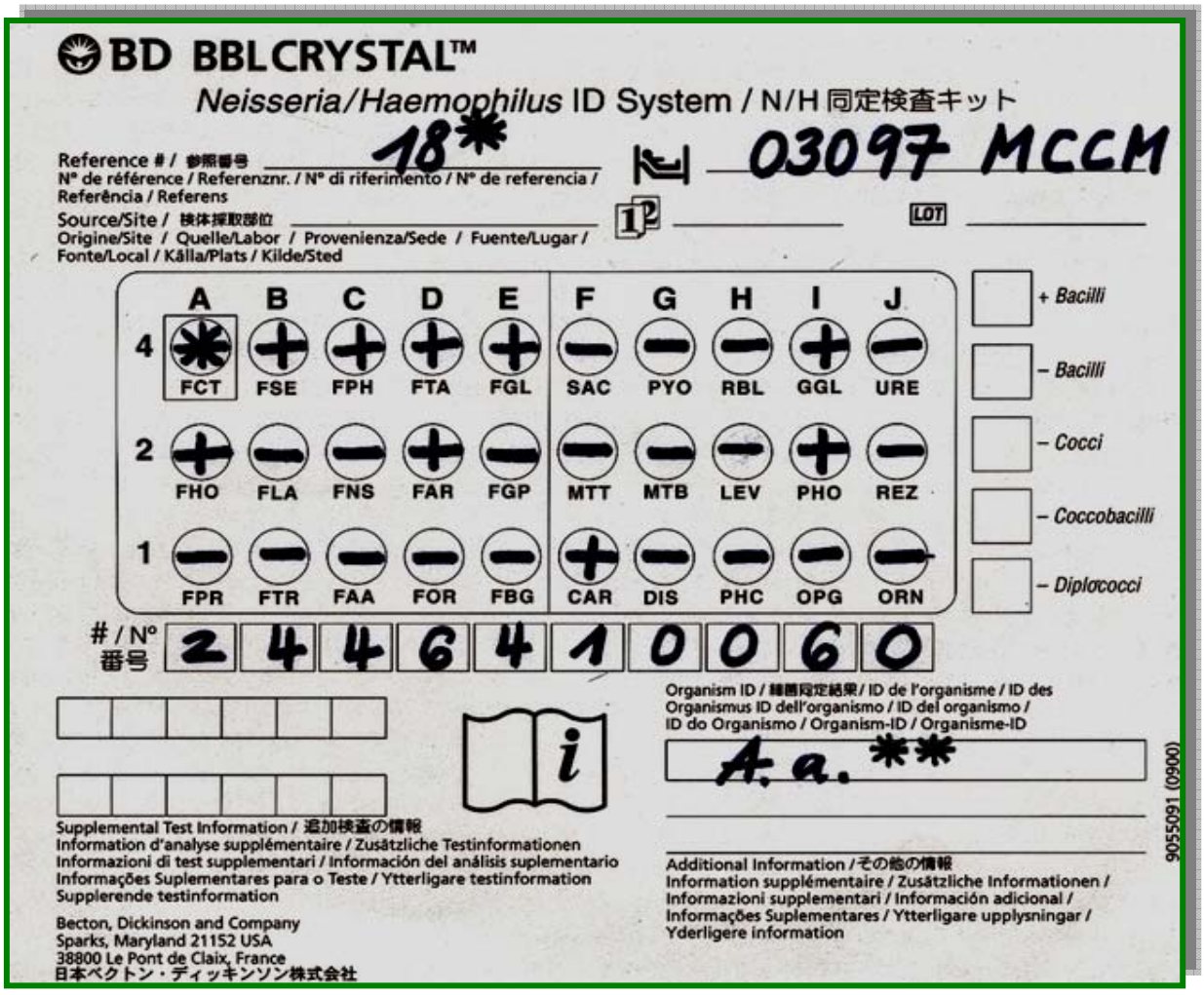
[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

VII. ABBILDUNGEN

Abbildung 0 (nach M. Baum, 2003) :

Actinobacillus actinomycetemcomitans Kolonie auf TSBV-Agar

Abbildung 1: **BD BBL CRYSTAL *Neisseria/Haemophilus* ID System**
Eingetragenes Muster der 29 Reaktionen auf dem kommerziell erhältlichen Vordruck mit errechneter 10stelliger Profilnummer (N°) und Identifikationsergebnis; Reaktionsfeld 4A* dient nur der negativen Fluoreszenzkontrolle und wird nicht bei der Berechnung berücksichtigt.



*** = laufende Stammnummer siehe Tabelle 1**

**** = *Actinobacillus actinomycetemcomitans***

Abbildung 2: **BD BBL CRYSTAL *Enteric/Nonfermenter* ID System**
Eingetragenes Muster der 30 Reaktionen auf einem kommerziell erhältlichen Vordruck mit errechneter 10stelliger Profilnummer

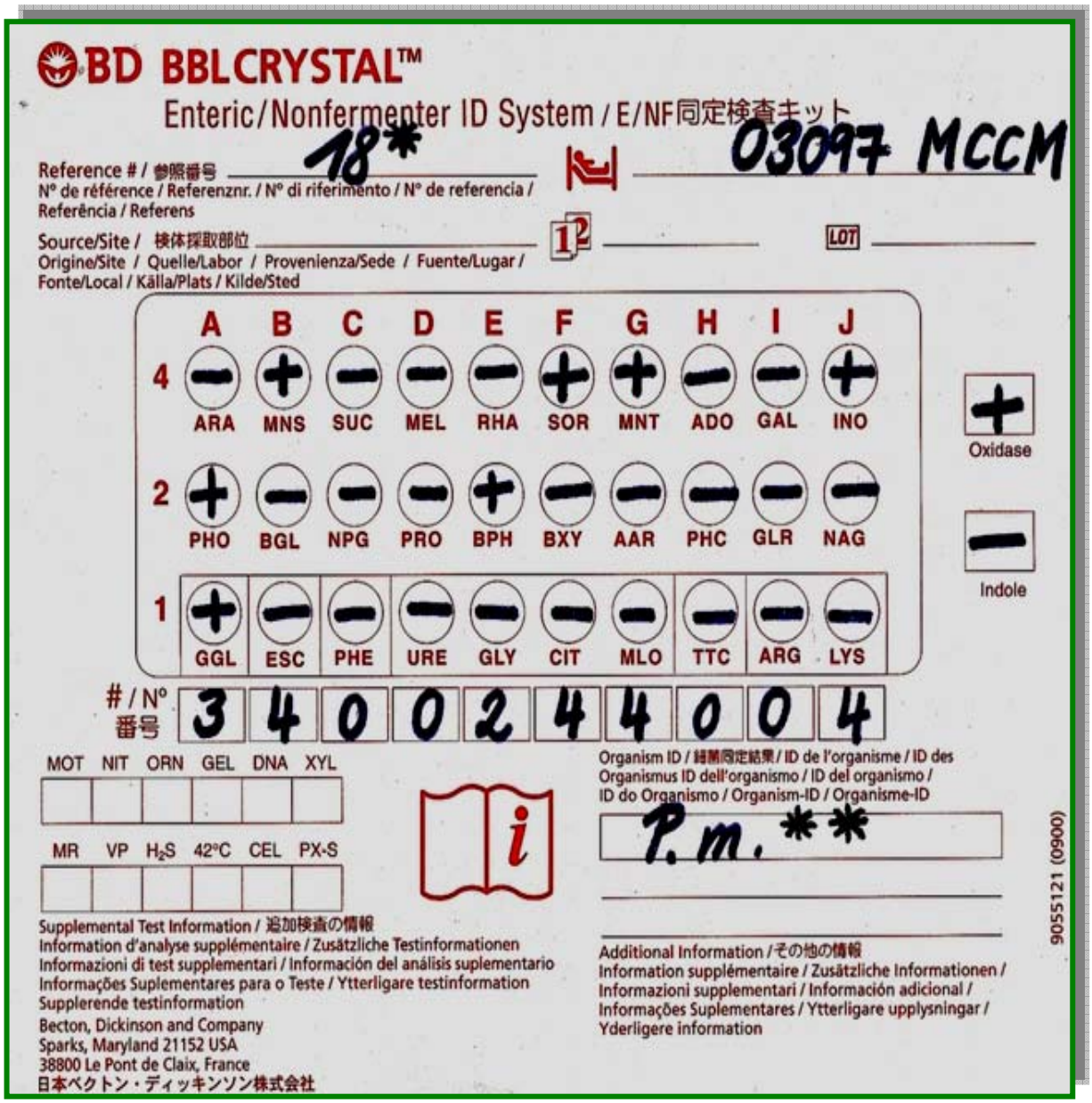


Abbildung 3 (nach PIECHULLA, K., 1985):

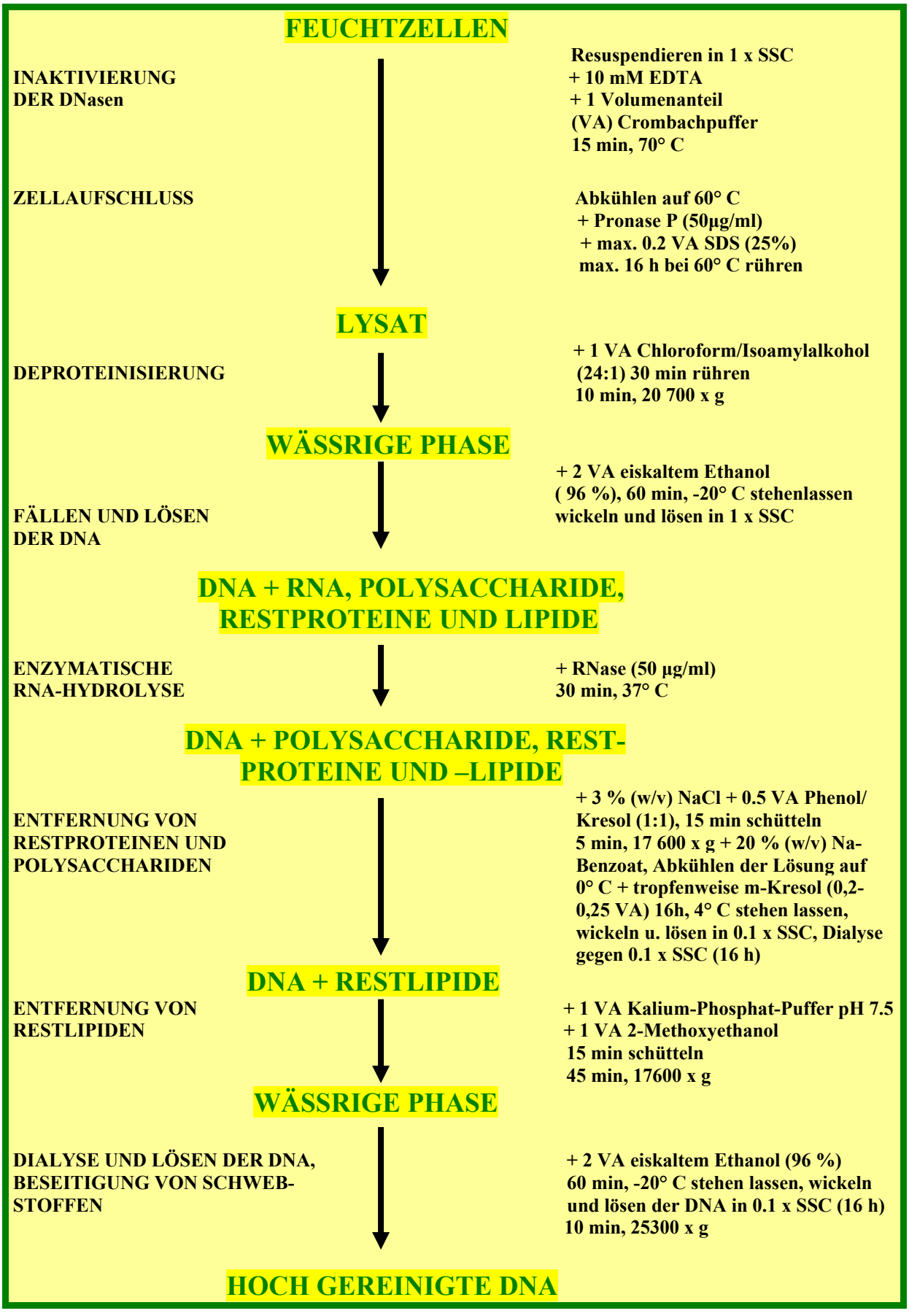


Abbildung 4 (nach PIECHULLA, K., 1985):

Natrium-Natrium-Citrat-Puffer (SSC, 20-fach):

3.0 M NaCl
0.3 M Na_3 – Citrat

SSC/EDTA – Puffer:

0.15 M NaCl
0.15 M Na_3 – Citrat
0.1 M Ethylendiamintetra – Acetat (EDTA), pH 7.2

Crombach-Puffer:

2.0 M NaCl
33 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)
1.0 mM EDTA, mit NaOH ad pH 8.0

TRIS-HCl/EDTA-Puffer:

10 mM TRIS
1 mM EDTA, mit HCL ad pH 7.2

Kalium-Phosphat-Puffer:

2.5 M Di-Kaliumhydrogenphosphat mit 33 % (v/v) Orthophosphorsäure ad pH 7.5

Phenol/m-Kresol:

0.5 g 8-Hydroxychinolin
500 g krist. Phenol, gelöst in
55 ml Aqua dest
70 ml m-Kresol

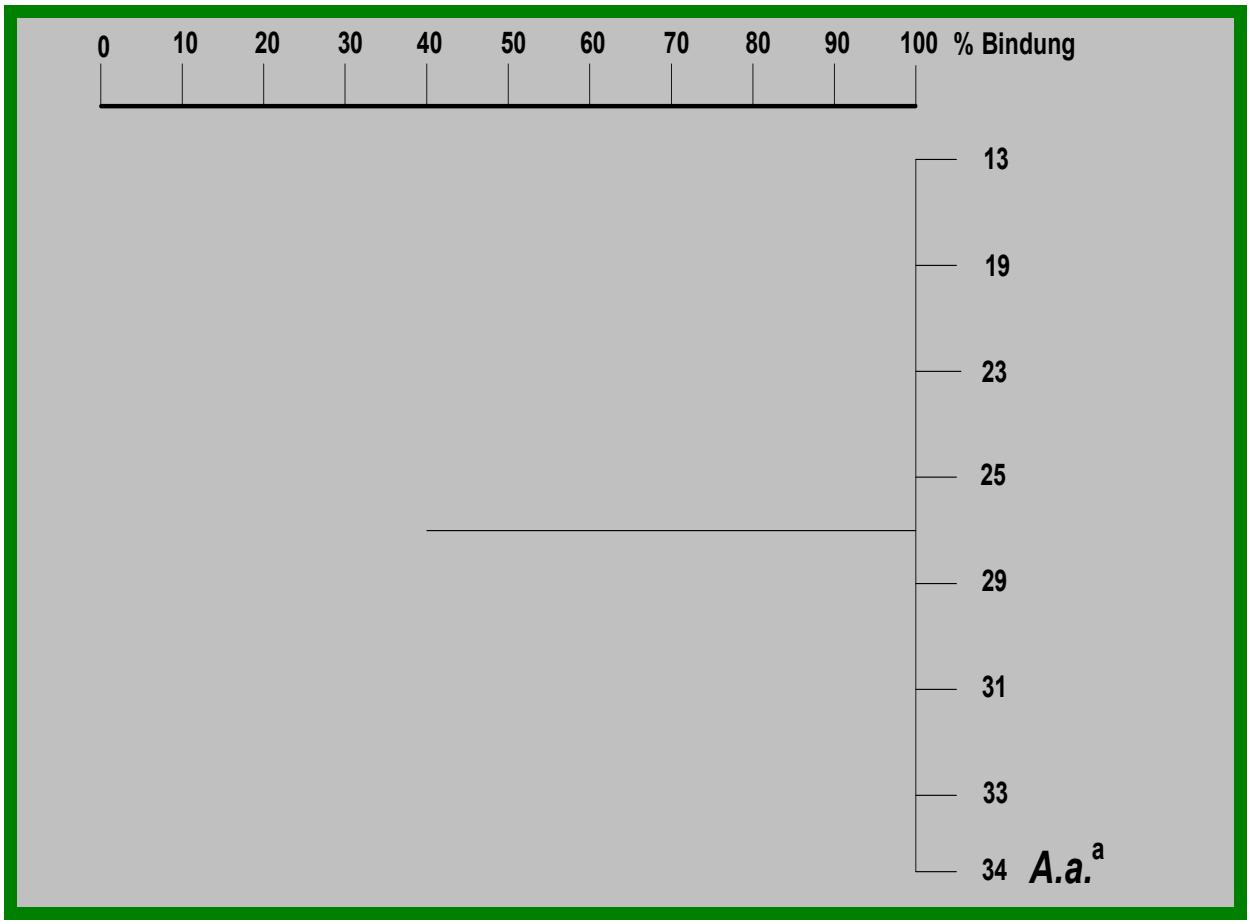
Sodium-Dodecylsulfat (SDS):

25 % SDS gelöst in Aqua dest.

Chloroform/Isoamylalkohol:

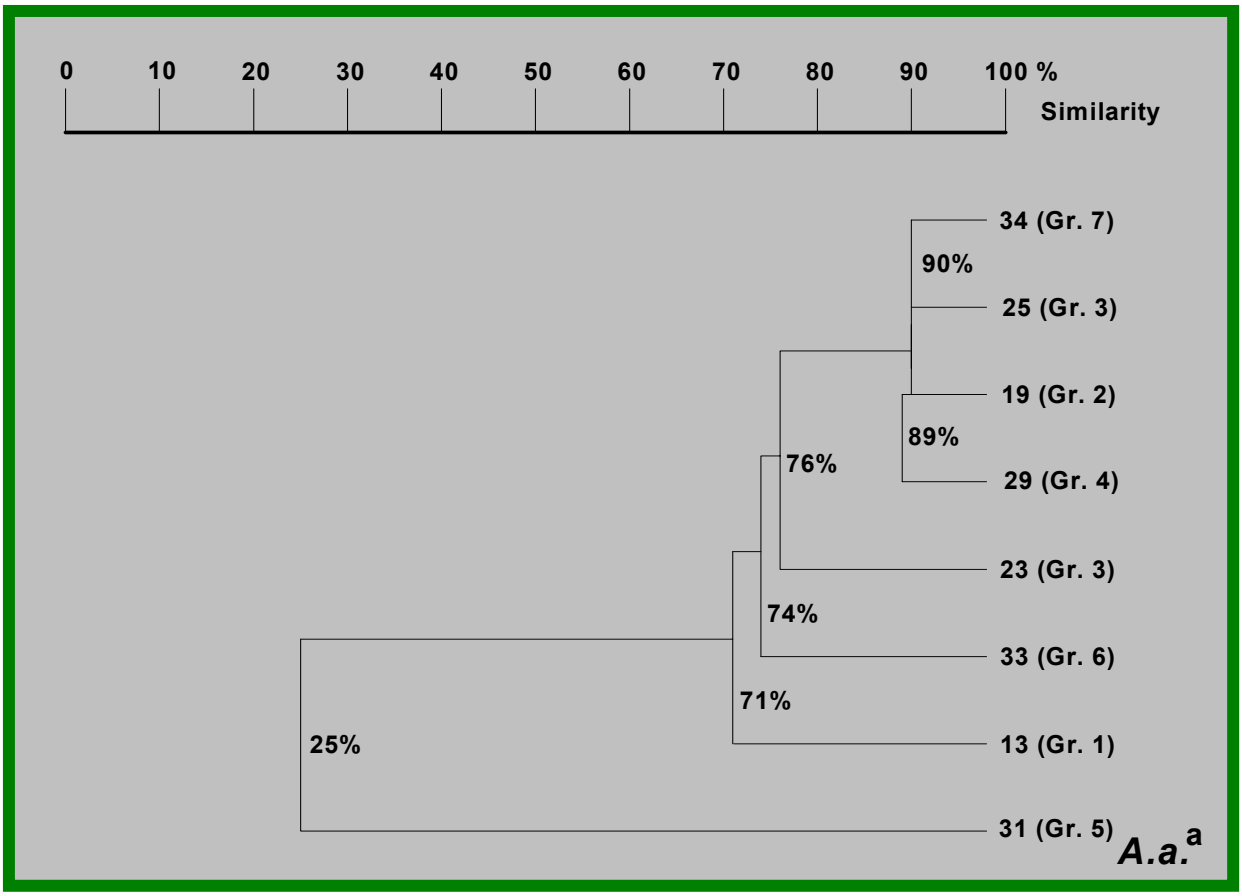
24 : 1 (v/v)

Abb. 5: **„Single-linkage“-Dendrogramm der Genomverwandschaften nach DNA-DNA Hybridisierung** der Repräsentanten biochemischer Gruppen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*



a = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Abb. 6: „Single-linkage“-Dendrogramm der Genomverwandschaften nach Sequenzvergleich der Repräsentanten biochemischer Gruppen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*



[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Abbildung 7 (nach Mühlhardt, C., 2002): **Zyklus der PCR** bestehend aus drei Temperatur-Schritten, die in einem frei programmierbaren Thermo-Cycler eingestellt werden können

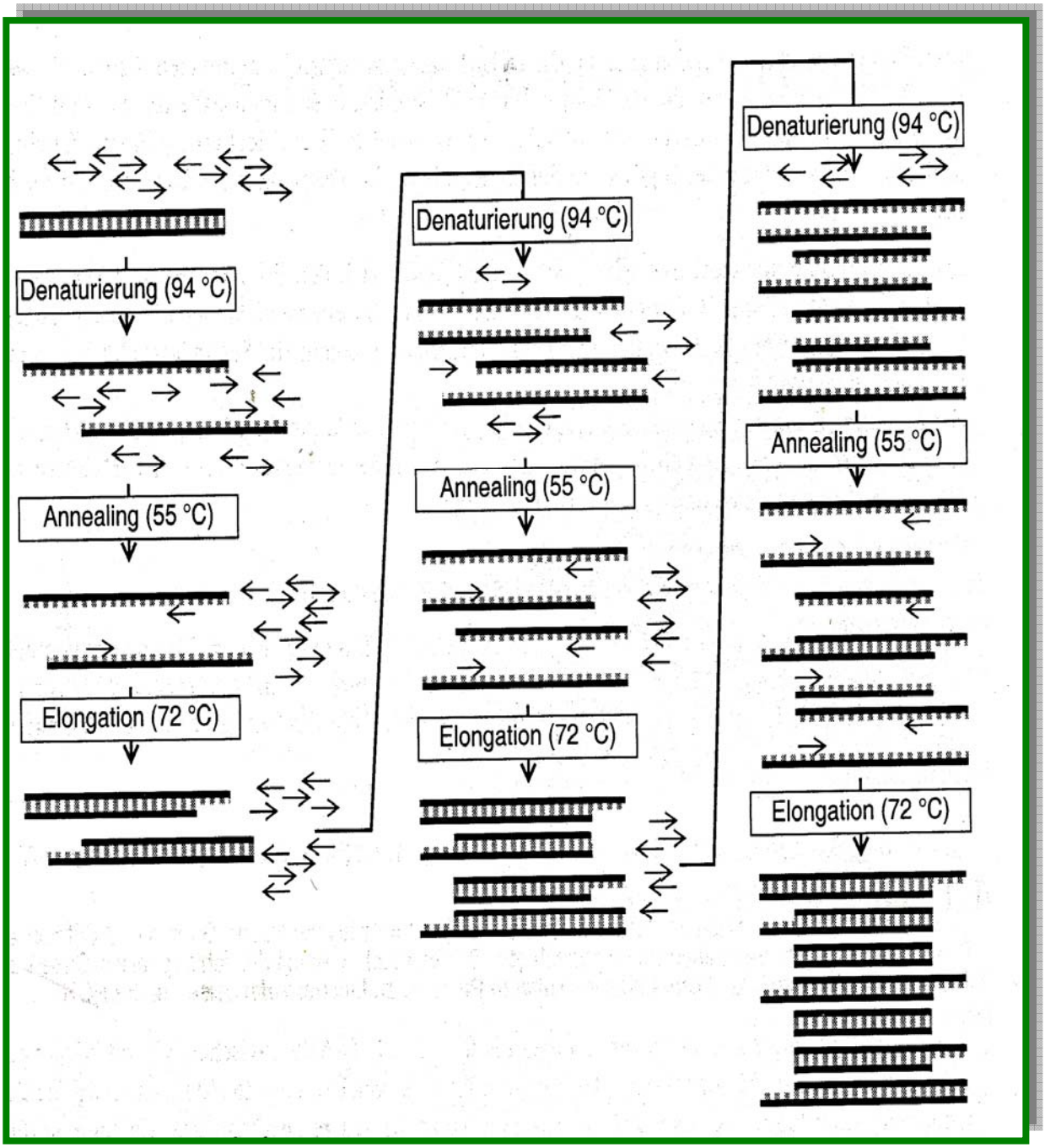


Abbildung 8 (nach Opper, S. 2002) : Durchführung der PCR im Thermo-Cycler,
Ablauf des Programmes „Big Dye“

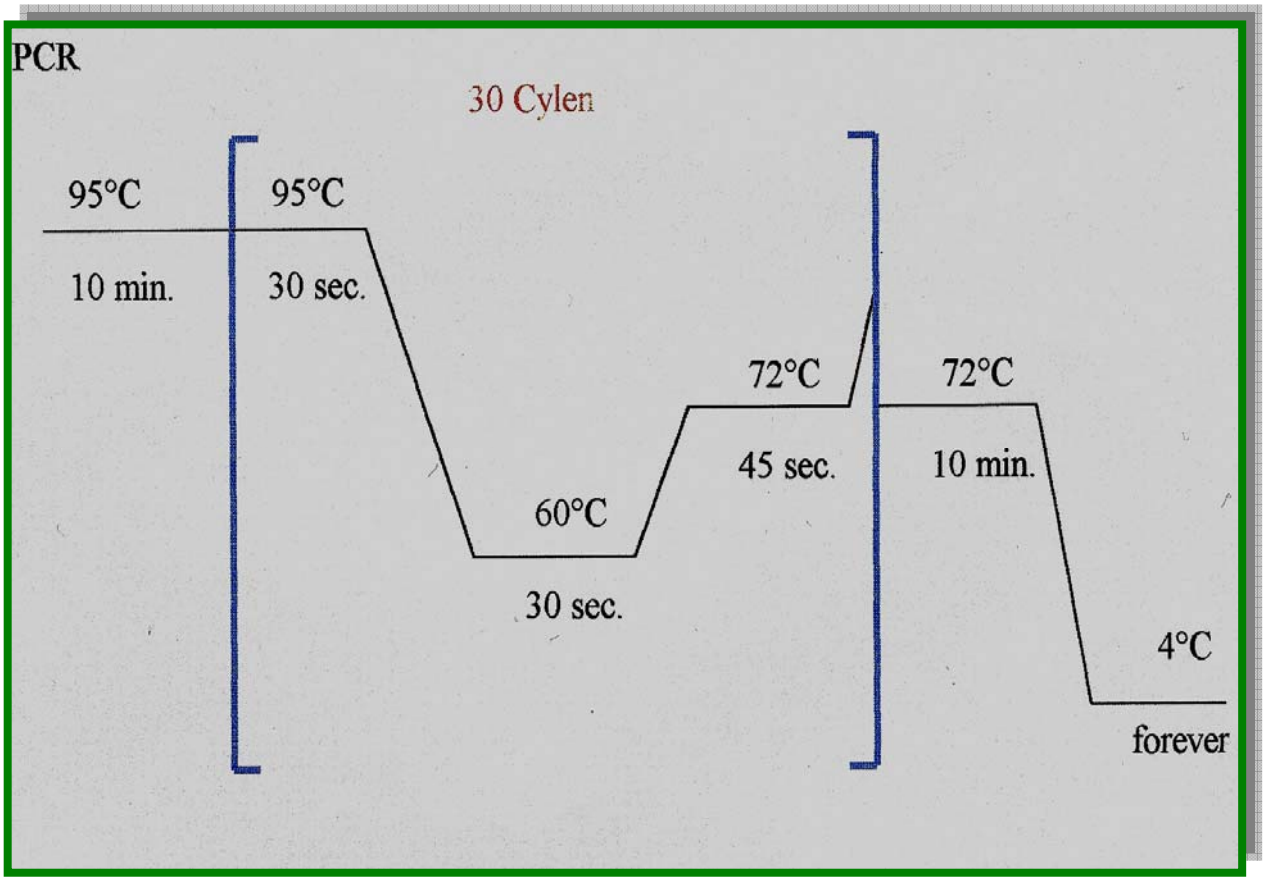


Abbildung 9a: **Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben** der 34 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Stämme nach der PCR.

Geltaschen-Nummer	Laufende Stammnummer[a]	MCCM-Stammnummer	Ergebnis der Gelelektrophorese
Positivkontr. +	----------	----------	***positiv***
Negativkontr. −	----------	----------	***negativ***
1	22	02474	positiv
2	33	03098	positiv
3	05	00276	positiv
4	16	02729	positiv
5	06	02823	positiv
6	01	HIM 967-8	positiv
7	03	02639	negativ
8	08	02179	positiv
9	09	02730	positiv
10	32	02810	positiv
11	28	02183	positiv
12	34	02174	positiv
13	30	03162	positiv
14	23	00135	positiv
15	11	02180	negativ
16	25	02809	positiv
17	17	02728	positiv
18	15	03164	positiv
19	02	00251	positiv
20	07	00335	negativ
21	24	00213	positiv
22	21	03165	positiv
23	14	03247	positiv
24	18	03097	positiv
25	29	00145	positiv
26	31	01089	positiv
27	04	00085	positiv
28	10	03163	positiv
29	12	02292	positiv
30	19	02808	positiv
31	20	02638	positiv

32	27	02731	positiv
33	26	02811	positiv
34	13	02727	positiv

[a] = Laufende Stammnummern siehe Tabelle 1

Abbildung 9b: **Originalfoto der gelelektrophoretischen Auftrennung**

Die Positivkontrolle ist mit einem Plus und die Negativkontrolle mit einem Minus bezeichnet.
Die Geltaschen wurden ab Ziffer 1 bis Ziffer 34 mit den Proben befüllt. Für die Sequenzierung kamen nur die Stämme in Frage, bei welchen die Banden eindeutig mit Positiv bewertet werden konnten.
Negative Ergebnisse lieferten die Banden der Geltaschen 7, 15 und 20.
Die mit einem ─ markierte Geltasche 27 wurde fehlerhaft befüllt und blieb bei der Auswertung unberücksichtigt. Die entsprechende DNA-Probe wurde daraufhin erneut (unter korrekter Ausführung) in die unmittelbar darunter gelegene Geltasche gefüllt, so dass insgesamt 34 Geltaschen mit unterschiedlichen DNA-Proben befüllt wurden.

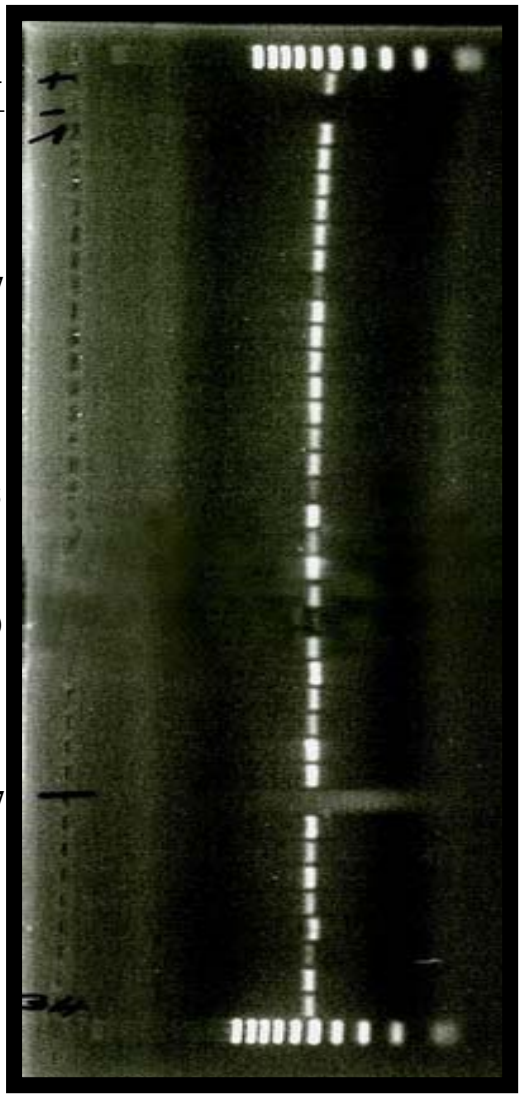


Abbildung 10a (nach Opper, S. 2002): **Grundprinzip der Sequenzierung**

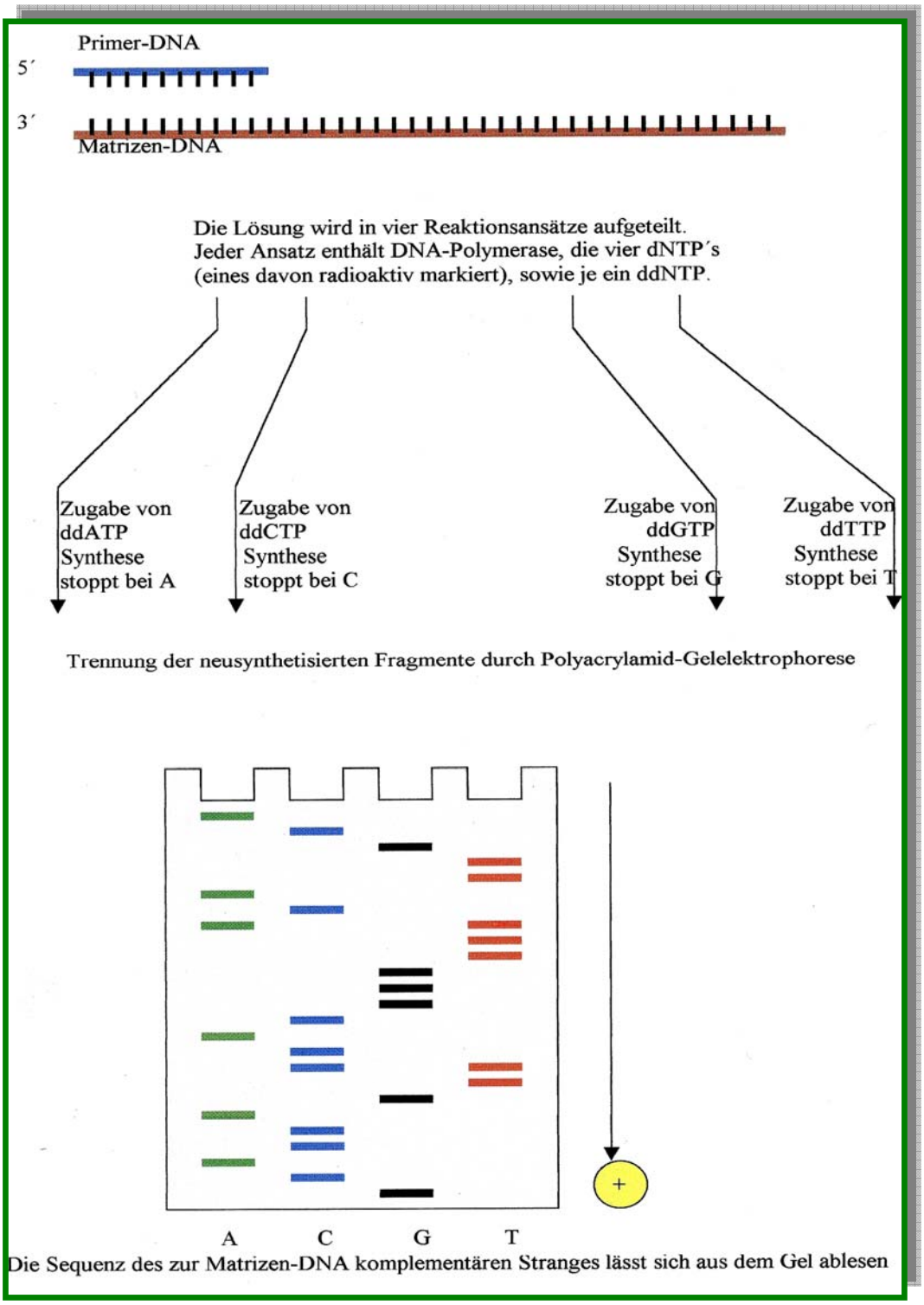


Abbildung 10b (nach Opper, S. 2002):

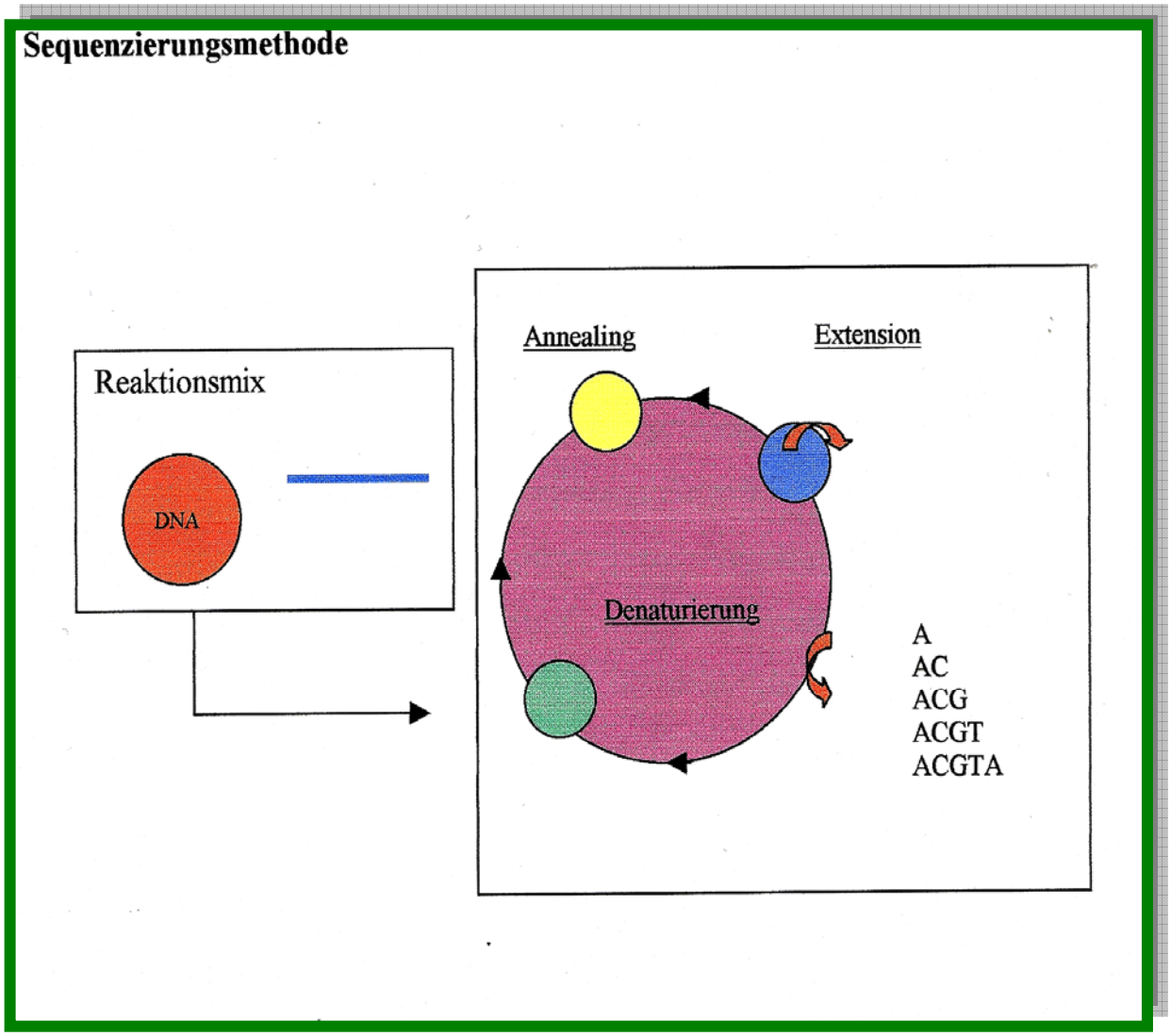
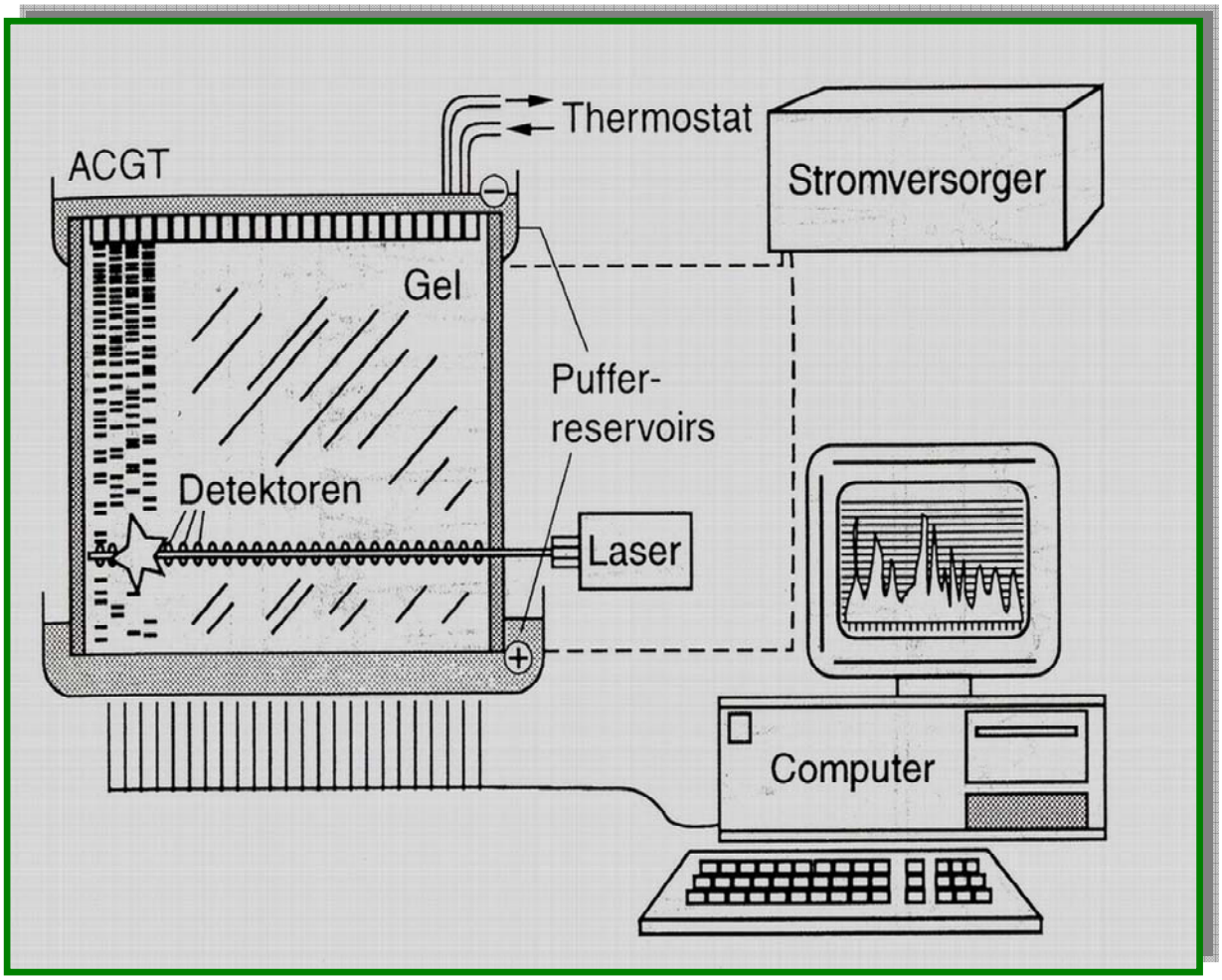
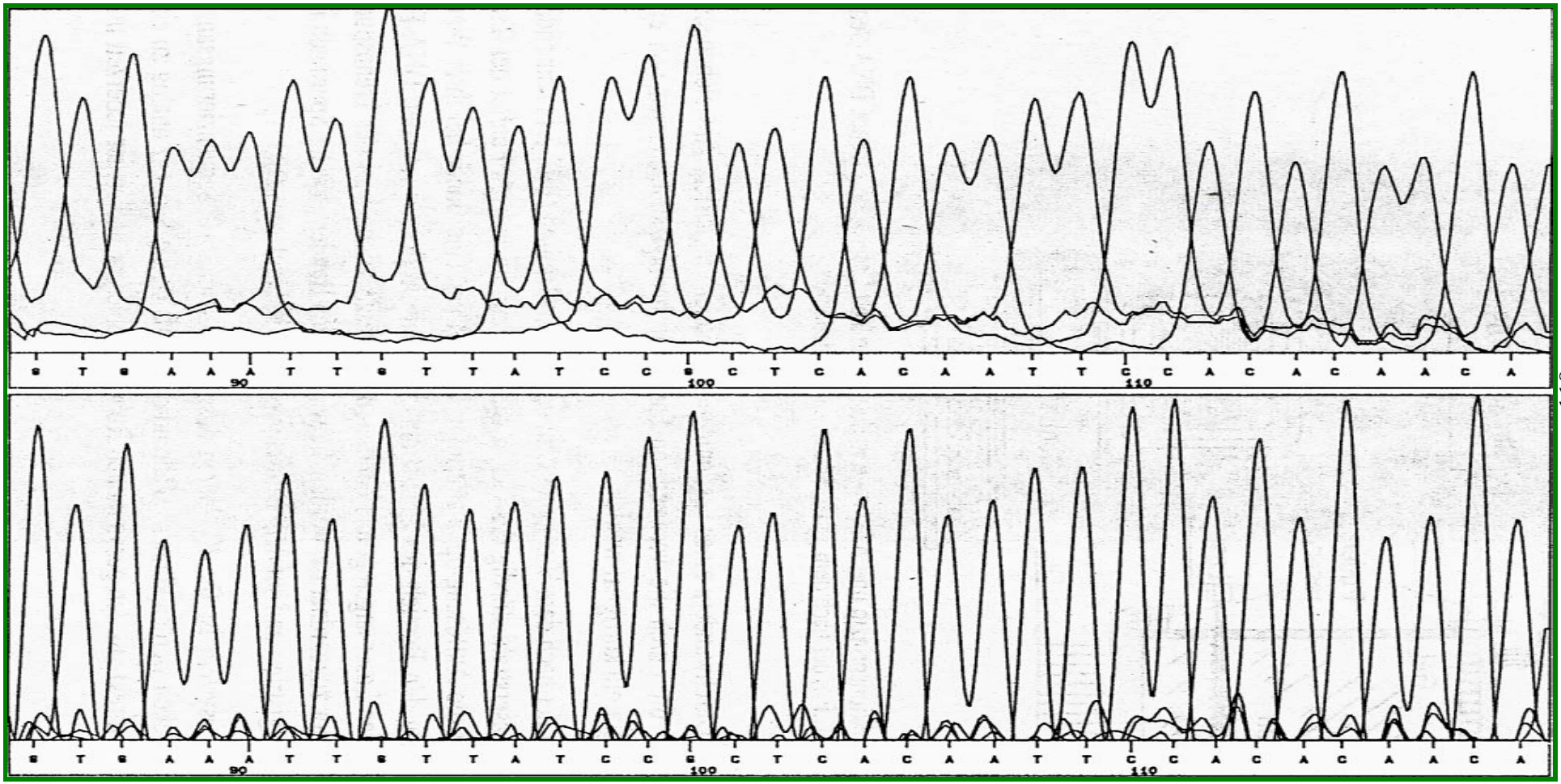


Abbildung 11 (nach Geckeler,K.-E. und H. Eckstein, 1998) : **Aufbau und Funktionsweise eines Sequenziergerätes**



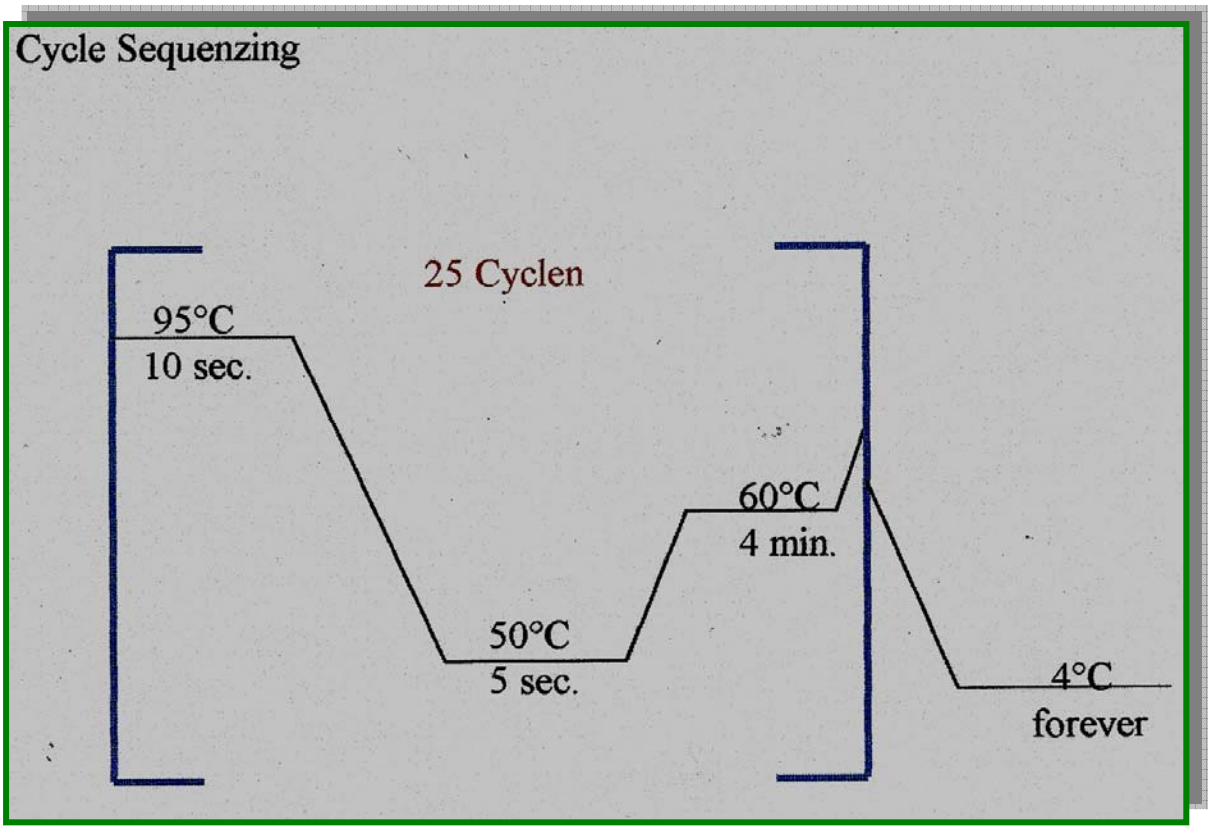
Konstruktionsprinzip und Arbeitsweise des **Automated Laser Fluorescence DNA-Sequencers (A.L.F.)** , der nach dem „Vier-Spur-System“ detektiert.

Abbildung 12 (nach Geckeler, K.-E. und H. Eckstein, 1998):



Obere Abbildung: Registrierte Fluoreszenzsignale (Rohdaten) und Sequenzangaben bei der automatischen Auswertung von Sequenziergelen. Die Peaks geben den 3'-terminalen Baustein an, der bei der Didesoxynucleotidmethode in den jeweiligen Sets eingebaut wird.
Untere Abbildung: Prozessierte Daten

Abbildung 13 (nach Opper, S., 2002): Durchführung des Cycle-Sequencenzing im Thermo-Cycler, Ablauf des Programmes „Big Dye 1“



8. Literaturverzeichnis

ALTMAN, L. C., R. C. PAGE, G. E. VANDESTEN, L. I. DIXON und C. BRANDFORD:
Abnormalities of leucocytes chemotaxis in patients with various forms of periodontitis.
J. Periodont. Res. 20, 553 – 563 (1985)

ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, W. MILLER, D. J. LIPMAN:
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs
Nucleic Acids Res. 25 (17), 3389 – 3402 (1997)

ARMITAGE, G. C. :
Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions.
Ann. Periodontol. 4, 1 – 6 (1999)

ARVAND, M., H. HAHN und K. MIKSITS:
HACEK-Gruppe.
In: (Hahn H., Falke D., Kaufmann S. H. E., Ullmann U., Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 5. Ausgabe, 437 – 446 (2005)

ASIKAINEN, S., H. JOUSIMIES-SOMER, A. KANERVO und P. SUMMANEN:
Certain bacterial species and morphotypes in Localized Juvenile Periodontitis and in matched controls.
J. Periodontol. 58 (4), 224 – 230 (1987)

ASIKAINEN, S., S. ALALUUSUA und L. SAXEN:
Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue and saliva.
J. Periodontol. 62, 203 – 206 (1991)

ASIKAINEN, S. und C. CHEN:
Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis.*
Periodontol. 2000 20, 65 – 81 (1999)

ATKINSON, M. R., M. P. DEUTSCHER, A. KORNBERG, A. F. RUSSELL und J. G. MOFFAT:
Enzymatic synthesis of desoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by a 2', 3'-dideoxyribonucleotide.
Biochemistry 8, 4897 – 4904 (1969)

BAER, P. N.:
The case for periodontosis as a clinical entity.
J. Periodontol 42; 516 – 520 (1971)

BANSKY, G. und E. RUSSI:
Actinobacillus actinomycetemcomitans endocarditis. A case report and literature review.
Schweiz. Med. Wochenschr. 111 (30), 1136 – 1138 (1981)

BARON, E. J., L. R. PETERSON und S. M. FINEGOLD
Baileys and Scott's diagnostic microbiology, 9th edition, Mosby-Year-Book, Inc., St. Louis (1994)

BATES, R.:
Actinomycosis.
Lancet 1, 571 – 573 (1933)

BAUM, M.:
Mikrobiologische Analyse von Parodontopathien: Vergleich ausgewählter kultureller, cytochemischer und molekularbiologischer Methoden unter besonderer Berücksichtigung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Thesis, Marburg (2003)

BAYNE-JONES, S.:
Club-formation by *Actinomyces hominis* in glucose broth with a note on *B. actinomycetum-comitans.*
Journal of Bacteriology 10, 569 – 577 (1925)

BENSON, D. A., I. KARSCH-MIZRACHI, D. J. LIPMAN, J. OSTELL und D. L. WHEELER:
GenBank: update.
Nucleic Acids Res. 32, 23 – 26 (2004)

BERNS, K. J. und C. A. THOMAS:
A study of single polynucleotide chains derived from T_2 und T_4 bacteriophage.
J. Molec. Biol. 3, 289 – 300 (1961)

BHATTACHARJEE, M. K., S. C. KACHLANY, D. H. FINE und D. H. FIGURSKI:
Nonspecific adherence and fibril biogenesis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: TadA Protein Is and ATPase.
Journal of Bacteriology 183 (20), 5927 – 5936 (2001)

BLIX , I. J. S., H. R. PREUS und I. OLSEN:
Invasive growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on solid medium (TSBV).
Acta Odontol. Scand. 48, 313 – 318 (1990)

BRAGD, L., G. DAHLEN, M. WIKSTRÖM und J. SLOTS:
The capability of *A.a., B.g.* and *B.i.* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study.
J. Clin. Periodontol. 14, 95 – 99 (1987)

BRENNER, D. J. und D. B., COWIE:
Thermal stability of *Escherichia coli – Salmonella typhimurium* desoxyribonucleic acid duplexes.
J. Bacteriol. 95, 2258 – 2262 (1968)

BRENNER, D. J., G. R. FANNING, A. V. RAKE und K. E. JOHNSON:
Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite.
Anal. Biochem. 28, 447 – 459 (1969)

BRISSEAU, J. M., M. DERRIENNIC, A. FRITZ, D. LEVEILLER, A. L. COURTIEU und J. H. BARRIER:
Septicaemia due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with endocarditis and spinal epidural abscess.
Journal of Infection 17, 131 – 134 (1988)

BURBACH, S.:
Reklassifizierung der Gattung *Haemophilus* Winslow et al. 1917 auf Grund der DNA-Basensequenzhomologie.
Thesis, Marburg (1987)

BURGHER, L.W., G. W. LOOMIS und F. WARE:
Systemic infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Am. J. Clin. Pathol. 60 (3), 412 - 415 (1973)

CASEY CHEN, C. K., R. G. DUNFORD, H. S. REYNOLDS und J. J. ZAMBON:
Eikenella corrodens in the human oral cavity.
J. Periodontol. 60 (11), 611 – 616 (1989)

CHARGRAFF, E.:
Isolation and composition of the deoxypentose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins.
In: (Chargraff E., Davidson J. N., eds.) The Nucleic Acids, Bd. I, Academic Press, New York, 307 -407 (1955)

CHOW, A. W., S. M. ROSER und F. A. BRADY:
Orofacial odontogenic infections.
Ann Intern Med. 88 (3), 392 – 402 (1978)

CHRISTERSSON, L. A., J. SLOTS, B. G. ROSLING und R. J. GENCO:
Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis.
J. Clin. Periodontol. 12, 465 – 476 (1985)

CHRISTERSSON, L. A., B. ALBINI, J. J. ZAMBON, U. M. E. WIKESJÖ und R. J. GENCO:
Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscope studies.
J. Periodontol. 58, 529 – 539 (1987a)

CHRISTERSSON, L. A. und J. J. ZAMBON:
Suppression of subgingival *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline.
J. Clin. Periodontol. 20 (6), 395 – 401 (1993)

CHUNG, C. P., Y. K. LEE, S. M. CHOI und R. J. NISENGARD:
Antibodies to *A.a.* in a Korean population.
J. Periodontol. 75, 510 – 515 (1986)

CIANCIOLA, L. J., R. J. GENCO, M. R. PATTERS, J. MCKENNA und C. J. VAN OSS:
Defective polymorphonuklear leucocyte function in human periodontal disease.
Nature 256, 445 – 447 (1977)

COLEBROOK, L.:
The mycelial and other microorganisms associated with human actinomycosis.
British Journal of Experimental Pathology 1, 197 – 212 (1920)

COURTOIS, G. J., C. M. COBB, W. J. KILLROY:
Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A transmission electron microscopy study.
J. Clin. Periodontol. 54, 671 – 679 (1983)

COWAN, S. T.:
Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria, 2nd edition, University Press, Cambridge (1974)

CROMBACH, W. H.:
DNA base composition of soil arthrobacters and other coryneforms from cheese and sea fish.
A. v. Leeuwenhoek 38, 105 – 120 (1972)

CROSA, J. H., D. J. BRENNER und S. FALKOW:
Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes.
J. Bacteriol. 115, 904 – 911 (1973)

CRYER, D. R., R. ECCLESDALL und J. MARMUR:
Isolation of yeast DNA.
Methods in Cell Biology 12, 39 – 44 (1975)

DE LEY, J., H. CATTOIR und A. REYNAERTS:
The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates.
Eur. J. Biochem. 12, 2 (1970)

DE LEY, J.:
Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid.
J. Bacteriol. 101, 738 – 754 (1970)

DE LEY, J.:
Hybridization of DNA.
In: (Norris J. E., Ribbons D. W. eds): Methods in Microbiology 5 A, Academic Press, London , 311 – 329 (1971)

DOAN, N., A. CONTRERAS, J. FLYNN, J. MORRISON und J. SLOTS:
Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria.
J. Clin. Microbiol. 37 (1), 171 – 174 (1999)

DOGAN, B., M. H. SAARELA, H. JOUSIMIES-SOMER, S. ALALUUSUA und S. ASIKAINEN :
Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype e – biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status.
Oral Microbiol. Immunol. 14, 98 – 103 (1999)

DZINK, J. L., A. C. R. TANNER, A. D. HAFFAJEE und S. S. SOCRANSKY:
Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions.
J. Clin. Periodontol. 12, 648 – 659 (1985)

DZINK, J. L., S .S. SOCRANSKY und A. D. HAFFAJEE:
The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease.
J. Clin. Periodontol. 15, 316 – 323 (1988)

EBERHARD, J., J. OZA und N. O. REICH:
Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the DNA adenine-(N6) methyltransferase from the human pathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans.
FEMS Microbiology Letters 195, 223 – 229 (2001)

EKE, P. I., L. BRASWELL, R. ARNOLD und M. FRITZ:
Sub-gingival microflora in *Macaca mulatta* species of rhesus monkey.
J. Periodontolal. Res. 28, 72 – 80 (1993)

ENRIQUEZ, L. A. und N. E. HODINKA:
The development of a test system for the rapid differentiation of *Neisseria* and *Haemophilus.*
J. Clin. Microbiol. 18, 1032 – 1039 (1983)

ESCANDE, F., F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT und H. BERCOVIER:
Desoxyribonucleic acid relatedness among strains of *Actinobacillus* spp. and *Pasteurella ureae*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 309 – 315 (1984)

FELTHAM, R. K. A., A. K. POWER, P. A. PELL und P. H. A. SNEATH:
A simple method for storage of bacteria at -76°C.
J. appl. Bacterial. 44, 313 – 316 (1978)

FINE, D. H., D. FURGANG, H. C. SCHREINER, P. GONCHAROFF, J. CHARLESWORTH, G. GHAZWAN, P. FITZGERALD-BOCARSLY und D. H. FIGURSKY:
Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence.
Microbiology 145, 1335 – 1347 (1999)

FIVES-TAYLOR, P., D. MEYER und K. MINTZ:
Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
J. Periodontol. 67, 291 – 297 (1996)

FLORES-DE-JACOBY, L.:
Die Mikrobiologie als Parameter für Diagnose und Verlauf von Parodontalerkrankungen.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 42, 398 – 404 (1987)

FLORES-DE-JACOBY, L., L. TSALIKIS und A. VOGANATSI:
Atlas der parodontalen Mikrobiologie.
Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin (1996)

FLORES-DE-JACOBY, L. und R. MENGEL:
Mikroorganismen, Wirtsfaktoren und Genetik spielen große Rolle bei Entstehung von Parodontitis.
Parodontologie Nachrichten, Wissenschaft & Praxis 3/4, 2 – 3 (2004)

FORBES, B. A., D. F. SAHM und A. S. WEISSFELD:
In: Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 10th edition, Mosby Inc., St. Louis (1998)

FRANK, R. M. und J. C.VÖGEL:
Bacterial bone resorption in advanced cases of human periodontitis.
J. Periodont. Res. 13, 251 – 261 (1978)

FRANK, R. M.:
Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis.
J. Periodont. Res. 15, 563 – 573 (1980)

FRIEBER, W.:
[Indole formation].
Zentralbl. Bakteriol. [Orig.] 155 (8), 368 – 375 (1950)

GALLI, D. M. und D. J. LE BLANC:
Characterization of pVT736-1, a rolling-circle plasmid from the Gram-negative bacterium *Actino-bacillus actinomycetemcomitans*.
Plasmid 31, 148 – 157 (1994)

GEHRING, F.:
Der Mund als ökologische Nische für Mikroorganismen.
Forum Mikrobiologie 5, 262 – 266 (1986)

GENCO, R. J. und J. SLOTS:
Host responses in periodontal diseases.
J. Dent. Res. 63, 441 – 451 (1984)

GECKELER , K. E. und H. ECKSTEIN:
Bioanalytische und biochemische Labormethoden.
Vieweg Verlags-GmbH, Braunschweig/Wiesbaden (1998)

GEORGE, K. S., X. ZHAO und D. GALLAHAN:
Capillary electrophoresis methodology for identification of cancer related gene expression patterns of fluorescent differential display polymerase chain reaction.
J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 694 (1), 93 – 102 (1997)

GILLIS, M., J. DE LEY und M. DE CLEENE:
The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates.
Europ. J. Biochem. 12, 143 – 153 (1970)

GILLESPIE, D. und S. SPIEGELMANN:
A quantitative assay for DNA/RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane.
J. Mol. Biol. 12, 829 – 842 (1965)

GONCHAROFF, P., D. H. FIGURSKI, R. H. STEVENS und D. H. FINE:
Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of lkt A-specific sequences.
Oral. Mikrobiol. Immunol. 8 (2), 105 – 110 (1993)

GORDON, R. E.:
A species definition.
Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 605 – 607 (1978)

GOULD L., C. GOPALASWAMY, B. S. KIM, C. PATEL und K. FREIBERG:
Infectious endocarditis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
Journal of Vascular Diseases, 64 – 70 (1985)

GRAVES, D. T., Y. JIANG und C. GENCO:
Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health.
Curr. Opin. Infect. Dis. 13, 227 – 232 (2000)

HARPER-OWEN, R., D. DYMOCK, V. BOOTH, A. J. WEIGHTMAN und W. G. WADE:
Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR.
J. Clin. Microbiol. 37 (5), 1469 – 1473 (1999)

HAUSSMANN, E., N. WEINFELD und W. A. MILLER:
Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture.
Calc Tissue Res 9, 272 – 282 (1972)

HEIMDAHL, A. und C. E. NORD:
Antimicrobial prophylaxis in oral surgery.
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 70, 91 – 101 (1990)

HEINRICH, S. und G. PULVERER:
Zur Aetiologie und Mikrobiologie der Aktinomykose. Die pathogene Bedeutung des *Actinobacillus actinomycetemcomitans* unter den „Begleitbakterien“ des *Actinomyces israelii*.
Zentralblatt für Bakteriologie 176, 91 – 101 (1959)

HENDERSON, B., M. WILSON, L. SHARP und J. M. WARD:
Actinobacillus actinomycetemcomitans.
J. Med. Microbiol. 51, 1013 - 1020 (2002)

HENDERSON, B., S. P. NAIR, J. M. WARD und M. WILSON:
Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
Annu. Rev. Microbiol. 57, 29 – 55 (2003)

HINZ, K.-H. und C. KUNJARA:
Haemophilus avium, a new species from chickens.
Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 324 – 329 (1977)

HOARD, D. E. und D. G. OTT :
Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-Triphosphates.
J. Am. Chem. Soc. 87, 1785 - 1788 (1965)

HOLM, P.:
Studies on the etiology of human actinomycosis. The "other microbes" of actinomycosis and their importance.
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 27, 736 – 750 (1951)

HOLM, P.:
Influence of carbon-dioxide on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans (Bacterium actinomycetemcomitans)* (KLINGER, 1912).
Acta path. et microbiol. Scandinav. 34, 235 – 248 (1954)

HOLMES, B., M. J. PICKETT und D. G. HOLLIS:
Unusual Gram-negative bacteria, including *Capnocytophaga, Eikenella, Pasteurella* and *Strepto-bacillus*.
In: (P. R. Murray, E. j. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Fenover, R. H. Yolken, eds.) Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, 499 – 508 (1996)

HOLTTA , P., S. ALALUUSUA, M. SAARELA und S. ASIKAINEN:
Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children.
Scand. J. Dent.Res. 102, 113 – 119 (1994)

HUSS, V. A. R., H. FESTL und K. H. SCHLEIFER:
Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates.
Syst. Appl. Microbiol. 4, 184 – 192 (1983)

INOUE, T., H. OHTA, S. KOKEGUCHI , K. FUKUI und K. KATO:
Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
FEMS Microbiol. Lett. 57, 13 – 17 (1990)

JOHNSON, J. L.:
Genetic characterization.
In: (Gerhardt P. eds.), Manual Methods for General Bacteriology, ASM, 450 – 472 (1981)

JOHNSON, J.L.:
DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acid.
In: (G. Gottschalk, eds.) Methods in Microbiology, 18, 33 – 74 Academic Press, London (1985b)

KACHLANY, S. C., D. H. FINE und D. H. FIGURSKI:
Secretion of RTX Leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Infection and Immunity 68 (11), 6094 – 6100 (2000)

KAPLAN, A. H., D. J. WEBER, E. Z. ODDONE und J. R. PERFECT:
Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review.
Reviews of Infectious Diseases 2 (1), 46 – 63 (1989)

KAYSER, F. H.:
Verschiedene, gramnegative Stäbchenbakterien.
In: (Eckert J., Zinkernagel R. M., Kayser F. H., Bienz K. A., Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie, 10. Auflage, 316 – 317 (2001)

KING , O. E. und H. W. TATUM:
Actinobacillus actinomycetemcomitans and *Haemophilus aphrophilus*.
J. Infect. Dis. 111, 85 – 94 (1962)

KILIAN, M. und C. R. SCHIOTT:
Haemophili and related bacteria in the human oral cavity.
Archives of Oral Biology 20, 791 – 796 (1975)

KIRBY, K. S., E. FOX-CARTER und M. GUEST:
Isolation of desoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria.
Biochem. J. 104, 258 – 262 (1967)

KLINGER, R:
Untersuchungen über die menschliche Aktinomykose.
Zentralbl. Bact. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg, I Abt. Originale, 62, 191 – 202 (1912)

KOVACS, N.:
Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien.
Zeitschrift Immunitätsforsch. 55: 311 – 315 (1928)

KRAUT, M. S., H. R. ATTEBERY, S. M. FINEGOLD und V. L. SUTTER:
Detection of *Haemophilus aphrophilus* in the human oral flora with a selective medium.
J. Infect. Dis. 126, 189 – 192 (1972)

LAUTROP, H.:
Laboratory Diagnosis of whooping-cough or *Bortadella* infections.
Bull. WHO 23: 15 – 31 (1960)

LAZARUK, K., P. S. WALSH und F. OAKS:
Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument.
Electrophoresis 19, 86 – 93 (1998)

LE BLANC, D. J., L. N. LEE, A. R. ABU-AL-JAIBAT, P. K. SCREENIVASAN und P.M. FIVES-TAYLOR:
Identification of plasmids in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and construction of intergeneric shuttle plasmids.
Oral. Microbiol. Immunol. 8, 94 – 99 (1993)

LILJENBERG, B. und J. LINDHE:
Juvenile periodontitis. Some microbiological and clinical characteristics.
J. Clin. Periodontol. 7, 48 – 61 (1980)

LIN, C. Y., M.Y.WONG, J. H. JENG, W. K. CHANG und M.Y. KUO:
Rapid and specific detection of the leukotoxin sequences of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets by the polymerase chain reaction.
J. Formos Med. Assoc. 93 (4), 289 – 293 (1994)

LINZENMEIER, G. und E. LAUTENBACH:
Bakteriämie nach zahnärztlichen Eingriffen, insbesondere am Parodontium.
Schweiz. Mschr. Zahnheilkd. 69, 787 – 799 (1959)

LÖFFLER, G.:
Nucleotide und Nucleinsäuren.
In: (G.Löffer, P. E. Petrides, Hrsg.) Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, 148 – 173, Springer Verlags GmbH, Berlin (1998)

MAC FADDIN, J. F.:
Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.
3rd edition, Williams & Wilkins Company, Baltimore (2000)

MADDOCKS, J. L. und M.GREENAN:
Rapid method for identifying bacterial enzymes.
J. Clin. Pathol. 28, 686 – 687 (1975)

MANAFI, M., W. KNEIFEL und S. BASCOMB:
Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics.
Microbiol. Rev. 55, 335 – 348 (1991)

MANDELL, R. L. und S. S. SOCRANSKY:
A selective Medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the Incidence of this Organism in Juvenile Periodontitis.
J. Periodontol. 52, 593 – 598 (1981)

MANNHEIM, W., S. POHL und R. HOLLÄNDER:
On the taxonomy of *Actinobacillus, Haemophilus,* and *Pasteurella*: DNA base composition, respiratory quinones, and biochemical reactions of representative collection cultures (author's transl.).
Zentralbl. Bakteriol. A 246 (4), 512 – 540 (1980)

MANNHEIM, W.:
Addendum.
In: (Flores-de-Jacoby L., Mannheim W. eds.) Mikrobiologie und Immunologie der parodontalen Erkrankungen, Quintessence Verlags-GmbH, Berlin, 321 – 325 (1991)

MANNHEIM, W., W. FREDERIKSEN und R. MUTTERS:
Pasteurellacea, Gattung *Actinobacillus.*
In: (F. Burghardt, Hrsg.) Mikrobiologische Diagnostik, 172 – 173 (1992)

MARMUR, J.:
A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms.
J. Molec. Biol. 3, 208 – 218 (1961)

MARMUR, J. und P. DOTY:
Thermal renaturation of desoxyribonucleic acids.
J. Molec. Biol. 3, 585 – 594 (1961)

MARMUR, J. und P. DOTY:
Determination of the base composition of desoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.
J. Molec. Biol. 5, 109 – 118 (1962)

MARTIN, B. F., B. M. DERBY, G. N. BUDZILOVICH und J. RANSOHOFF:
Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Neurology 17 (9), 833 – 837 (1967)

MAXAM, A. M. und W. GILBERT:
A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 – 564 (1977)

MEYERS, B. R., E. BOTTONE, S. Z. HIRSCHMAN, S. S. SCHNEIDERSON, K.GERSHENGORN:
Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Am. J. Clin. Pathol. 56 (2), 204 – 211 (1971)

MÖLLER, V.:
Simplified tests for amino acid decarboxylases and for arginine dihydrolase system.
Acta. Patholog. Microbiol. Scand. 36, 158 – 172 (1955)

MUHLE, I., J. RAU und J. RUSKIN:
Vertebral osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
JAMA 241 (17), 1824 – 1825 (1979)

MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN und H. EHRLICH:
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt. 1, 263 - 273 (1986)

MÜHLHARDT, C.:
Molekularbiologie/Genomics.
3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2002)

MUTTERS, R., K. PIECHULLA und W. MANNHEIM:
Phenotypic differentiation of *Pasteurella* sensu stricto and the *Actinobacillus* group.
Eur. J. Clin. Microbiol. 3, 225 – 229 (1984b)

MUTTERS, R.:
Reklassifizierung der Gattung Pasteurella Trevisan 1887 und generiche Zuordnung einiger Vertreter der Familie *Pasteurellaceae* Pohl 1981 aufgrund der DNA-Basensequenzhomologie.
Thesis (rer. Nat.), Marburg (1985)

MUTTERS, R., P. IHM, S. POHL, W. FREDERIKSEN und W. MANNHEIM:
Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan (1887) on the basis of desoxyribonucleic acid homology, with proposal for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis, Pasteurella stomatis, Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 309 – 322 (1985b)

MUTTERS, R.:
Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods.
Bacteriology, 1-11(1998a)

NONNENMACHER, C., K. HEEG und R. MUTTERS:
Beteiligung von Bakterien spielt eine große Rolle bei der Entstehung von parodontalen Erkrankungen.
Parodontologie Nachrichten 3/4, 6 – 8 (2004)

OHTA, H., K. FUKUI und K. KATO:
Effect of bicarbonate on the growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in anaerobic fructose-limited chemostat culture.
J. Gen. Microbiol. 135, 3485 – 3495 (1989)

OTTEN, J. E., K. PELZ und G.CHRISTMANN:
Anaerobic bacteraemia following tooth extraction and removal of osteosynthesis plates.
J. Oral. Maxillofac. Surg. 45 (6), 477 – 480 (1987)

OTTEN, J. E., M. DREWS, K. PELZ und G. LAUER:
Odontogene Infektionen – ein systemisches Risiko ?
Dtsch. Zahnärztl. Z. 53, 83 – 88 (1998)

PAGE, M. I. und E. O. KING:
Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus.*
N. Engl. J. Med. 275 (4), 181 – 188 (1966)

PIECHULLA , K.:
Beschreibung und Klassifizierung neuer *Pasteurellaceae* aus Vögeln anhand phänotypischer und molekularer Daten, insbesondere der Verwandschaftsgrade bei DNA:DNA-Hybridisierung in vitro.
Thesis, Marburg (1985)

PIERCE, C. S., W. R. BARTHOLOMEW, D. AMSTERDAM, E. NETER und J. J. ZAMBON:
Endocarditis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c and patient immune response.
J. Infect. Dis. 149 (3), 479 (1984)

POHL, S.:
Reklassifizierung der Gattungen *Actinobacillus* Brumpt 1910, *Haemophilus* Winslow et al. 1917 und *Pasteurella* Trevisan 1887 anhand phänotypischer und molekularer Daten, insbesondere der DNS-Verwandtschaften bei DNS:DNS-Hybridisierung in vitro und Vorschlag einer neuen Familie, *Pasteurellaceae.*
Thesis, Marburg (1979)

POHL, S.:
DNA relatedness among members of *Haemophilus, Pasteurella* and *Actinobacillus.*
In: (Kilian M., Frederiksen W., Biberstein E. L. eds.) *Haemophilus, Pasteurella* and *Actinobacillus*,
Academic Press, London, 245 – 253 (1981)

POTTS, T. V. und E. M. BERRY:
DNA:DNA-hybridization analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus.*
Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 765 – 771 (1983)

PULVERER, G. und H. L. KO:
Actinobacillus actinomycetem-comitans: fermentative capabilities of 140 strains.
Appl. Microbiol. 20 (5), 693 – 695 (1970)

PULVERER, G. und H. L. KO:
Serological studies on *Actinobacillus actinomycetem-comitans.*
Appl. Microbiol. 23 (2), 207 – 210 (1972)

PULVERER, G.:
Gram-negative, fakultativ anaerobe bzw. mikroaerophile Bakterien (HACEK-GRUPPE).
In: (Köhler W., Eggers H. J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G., Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie, 381 – 382 (2001)

RAHN, R., G. FRENKEL, F. ATAMNI, P. M. SHAH und V. SCHÄFER:
Bakteriämie bei intraligamentärer Anästhesie.
Zahnärztl. Mitt. 76 (19), 2121 – 2122, 2124, 2129 (1986)

RAHN, R.:
Endocarditis risk from dental procedures.
Zahnärztl. Prax. 40 (2), 48 – 52 (1989)

ROSAN , B., J. SLOTS, R. J. LAMONT, G. M. NELSON und M. LISTGARTEN:
Fimbriae of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and colonisation of the mouth.
J. Dent. Res. 67, 179 (1988)

SAGLIE, F. R., J. H. PERDNISET, M. T. SMITH, M. E. NESTOR, F. A. CARRANZA, M.G. NEWMAN, M. T. REZENDE und R. J. NISENGARD:
The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease.
J. Periodontol. 58, 417 – 422 (1987)

SAIKI, R. K., D. H. GELFAND und S. STOFFEL:
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239, 487 – 491 (1988)

SAKAZAKI, R., E. YOSHIZAKI, K. TAMURA und S. KURAMOCHI:
Increased frequency of isolation of *Pasteurella* and *Actinobacillus* species and related organisms.
Eur. J. Clin. Microbiol. 3, 244 – 248 (1984)

SANGER F., S. NICKLEN und A. R. COULSEN:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad Sci. USA 74 (12), 5463 – 5467 (1977)

SCHOTT, H.:
DNA-Sequenzanalyse, Sequenzanalyse langkettiger DNA-Fragmente, Sequenzanalyse von Oligo-nucleotiden mit Hilfe des Fingerprints ("Wandering Spot"-Methode).
In: (Geckeler K. E., Eckstein H., Hrsg.) Bioanalytische und biochemische Labormethoden,
Vieweg Verlags-GmbH, Braunschweig/Wiesbaden, 192 – 218 (1998)

SKERMAN, V. B. D.:
A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria.
2nd edition, Williams & Wilkins Company, Baltimore, 01 – 17 (1967)

SREENIVASAN, P. K., D. H. MEYER, und P. M. FIVES-TAYLOR:
Factors influencing the growth and variability of *Actinobacillus ctinomycetemcomitans*.
Oral Microbiol. Immunol. 8, 361 – 369 (1993)

SHAPIRA, L., W. AUBREY-SOSKOLNE, M. N. SELA, S. OFFENBACHER und V. BARAK:
The Secretion of PGE2, IL-1ß, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients.
J. Periodontol. 65, 139 – 146 (1994)

SLOTS, J.:
The predominant cultivable organisms in Juvenile Periodontitis.
Scand. J. Dent. Res. 84, 01 – 08 (1976)

SLOTS, J., H. S. REYNOLDS und R. J. GENCO:
Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation.
Infection and Immunity 29, 1013 – 1020 (1980b)

SLOTS, J.:
Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Archives of Microbiology 131, 60 – 67 (1982a)

SLOTS, J.:
Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
J. Clin. Microbiology 15, 606 – 609 (1982b)

SLOTS, J. und B. G. ROSLING:
Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline.
J. Clin. Periodontol. 10, 465 – 486 (1983)

SLOTS, J. und R. J. GENCO:
Black pigmented *Bacteroides species, Capnocytophaga species* and *A.a.* in human periodontal disease: Virulencefactors in colonisation, survival and tissue distruction.
J. Dent. Res. 63, 412 – 421 (1984)

SLOTS J. und M. A. LISTGARTEN:
B.g.,B.i. and *A.a.* in human periodontal diseases.
J. Clin. Periodontol. 15, 85 – 93 (1988)

SNEATH, P. H. und R. R. SOKAL:
Numerical Taxonomy.
W. H. Freeman & Co, San Francisco (1973)

SUZUKI, J. B., B. C. COLLISON, W. A. FALKLER JR. und R. K. NAUMANN:
Immunologic profile of juvenile periodontitis II. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and spore germination.
J. Periodontol. 55, 461 – 472 (1984)

SUZUKI, N., Y. NAKANO, Y. YOSHIDA, D. IKEDA und T. KOGA:
Identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes by multiplex PCR.
J. Clin. Microbiol. 39 (5), 2002 – 2005 (2001)

SYMBAS, P. N., R. C. SCHLANT, C. R. HATCHER jr. und J. LINDSAY:
Congenital fistula of right coronary artery to right ventricle complicated by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endarteritis.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 53 (3), 379 – 384 (1967)

TANNER, A. C. R., R. A. VISCONTI, S. S. SOCRANSKY und S. C. HOLDT:
Classification and identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by cluster analysis and deoxyribonucleic acid hybridizations.
Journal of Periodontal Research 17, 585 – 596 (1982)

TENER, G. M., P. T. GILHAMPT, W. E. RAZZEIL, A. F. TURNER und H. G. KHORANA:
Studies on chemical synthesis and enzymatic degradation of desoxyribo-oligonucleotides.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 757 – 775 (1959)

TENER, G. M.:
The separation of oligonucleotides from s-RNA.
Proc Can Cancer Conf. 6, 257 – 273 (1966)

THOMAS, C. A., K. J. BERNS und T. J. KELLY:
Isolation of high molecular weight DNA from bacteria and cell nuclei.
In: (Cantoni C., Davis G. eds.) Procedures in Nucleic Acid Research, Harper & Row, New York, 535 – 540 (1967)

THOMAS, C. A. und J. ABELSON:
The isolation and characterization of DNA from bacteriophage.
In:(Cantoni C., Davis G. eds.) Procedures in Nucleic Acid Research, Harper & Row, New York, 553 – 561 (1967)

TOPLEY, W.W.C. und G. S.WILSON:
The principles of bacteriology and immunity.
Edward Arnold and Co, London (1929)

TOWNSEND, T. R. und J. Y. GILLENWATER:
Urinary tract infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
JAMA 210 (3), 558 (1969)

TURENNE , C. Y., S. E. SAANCHE, D. J. HOBAN, J. A. KARLOWSKY und A. M. KABANI:
Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system.
J. Clin. Microbiol. 37 (6), 1846 – 1851 (1999)

VAN DYKE, T. E., M. J. LEVINE, L. A. TABAK und R. J. GENCO:
Juvenile periodontitis as a model for neutrophil function: Reduced binding of the complement chemotactic fragment C5a.
J. Dent. Res. 62, 860 – 872 (1983)

VAN DYKE, T. E., E. BARTHOLOMEW, R. J. GENCO, J. SLOTS und M. J. LEVINE:
Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products.
J. Periodontol. 53, 502 – 508 (1992)

VAN STEENBERGEN, T. J. M., C. J. BOSCH-TIJHOF, A. J. VAN WINKELHOFF, R. GMÜR und J. DE GRAAFF:
Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
J. Clin. Microbiol. 32 (11), 2769 – 2774 (1994)

VON GRAEVENITZ, A., R. ZBINDEN und R. MUTTERS:
Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella, and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods.
In: (Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Jorgensen J.H., Yolken F.C., eds.) Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, 609 – 622 (2003)

WEGENER, E.:
Phänotypische und genetische Charakterisierung klinischer Isolate von *Haemophilus segnis*, *Haemophilus aphrophilus* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans.*
Thesis, Marbug (1992)

WETMUR, J. G. und N. DAVIDSON:
Kinetics of renaturation of DNA.
J. Molec. Biol. 31, 349 – 370 (1968)

WHITE, D. J. und R. L. SANDS:
Storage of bacteria -76°C.
Medical Laboratory Sciences 42, 289 – 290 (1985)

WILFINGER, W. W., K. MACKEY und P. CHOMCZYNSKI:
Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.
Bio Techniques 22, 474 – 481 (1997)

ZAMBON, J. J., L. A. CHRISTERSSON und J. SLOTS:
Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families.
J. Periodontol. 54 (12), 707 - 711 (1983)

ZAMBON, J. J., C. DELUCA, J. SLOTS, R. J. GENCO:
Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line.
Infect. Immun. 40, 205 - 212 (1983a)

ZAMBON, J. J., J. SLOTS und R. J. GENCO:
Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease.
Infect. Immun. 41 (1), 19 – 27 (1983b)

ZAMBON, J. J.:
Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease.
J. Clin. Periodont. 12, 1 – 20 (1985)

ZAMBON, J. J., G. J. SUNDAY und J. S. SMUTKO:
Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology.
J. Periodontol. 61, 75 – 80 (1990)

IX. ANHANG

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mehnert

Vorname: Juliane Mareen

Anschrift: Farbenweg 9
38350 Helmstedt

Geburtsdatum: 03.10.1978

Geburtsort: Schwedt/Oder

Familienstand: ledig

Eltern: Frau Dr. med. Ute Doris Mehnert, geb. Karbe, Fachärztin für Augenheilkunde
Herr Dr. med. Manuel Joachim Mehnert, Fachzahnarzt für Kieferorthopädie

Geschwister: Franziska Ulrike Mehnert, Studentin der Medizin, Universität Kiel

Bildungsweg

Besuchte Schulen

1985-1989	Nikolaus Kopernikus Oberschule, Hoyerswerda
1989	Grundschule Wettbergen, Hannover
1989-1991	Orientierungsstufe Martensplatz, Hannover-Ricklingen
1991	Orientierungsstufe Amtsgasse, Helmstedt

1991-1995	Gymnasium Julianum, Helmstedt
1995-1996	Blundell's Boarding School, Tiverton, Devon, England
1996-1998	Gymnasium Julianum, Helmstedt
1998	Erwerb der Hochschulreife, Abitur

Besuchte Hochschule

1998-2003	Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
12/2003	Staatsexamen der Zahnheilkunde
01/2004	Erteilung der Approbation als Zahnärztin
seit 03/2002	Anfertigung der Dissertation

Assistenzarztzeit

01/2003-07/2003	Praxis Dr. med. dent. K. Kuhr, Marburg/Lahn
01/2004	Tannklinikk Vinstra, Oppland, Norwegen

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

AUMÜLLER
AUSTERMANN
BACH
CETIN
CZUBAYKO
DIBBETS
DAUT
FLORES-DE-JACOBY
GENTE
GEUS
GUDERMANN
HASILIK
HEEG
HELLINGER
HOCHBAHN
HÖFFGEN
HÜHNERMANN
JUNGCLAS
KERN
KLENK
KOOLMAN
KÖNIG
KRAUSE
KUHLMANN
LAMMEL
LEHMANN
LOHOFF
LOTZMANN
MENGEL
MITTAG
MUTTERS
NEUMÜLLER
PIEPER
RADSAK
ROGAUSCH
RÖHM
SEITZ
STACHNISS
STEINIGER
STELZEL
SUSKE
VOIGT
WAGNER
WALTER
WERNER
WESTERMANN

9.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg/Lahn.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Mutters für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgesprochen gute Betreuung sowie die stete Hilfsbereitschaft und Förderung jeglicher Art aufrichtig verpflichtet.

Frau Dr. Claudia Nonnenmacher danke ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Ausdrücklich danken möchte ich Frau Sandra Opper, Frau Anneliese Hoops und Frau Susanne Riehl für die herausragende technische Hilfe.

Herzlich danke ich auch den anderen Mitarbeitern des Instituts für die Herstellung zahlreicher Nährmedien und die allgemeine Unterstützung.

Ebenso danke ich Michael Völling für sein unermüdliches und gewissenhaftes Mitwirken bei der Beseitigung von computertechnischen Problemen jeder Art.

Meiner Schwester Franziska Mehnert danke ich vielmals für die tatkräftige Hilfe bei der umfangreichen Kopierarbeit der zahlreichen für meine Arbeit erforderlichen Artikel in der Zentralbibliothek für Medizin in Köln.

Schließlich möchte ich meinen lieben Eltern von Herzen für ihre immerwährende Motivation und liebevolle Fürsorge danken.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Vergleich der genetischen und biochemisch-phänotypischen Eigenschaften von ausgewählten Stämmen der fakultativ pathogenen Spezies *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg unter stellvertretender Leitung von Prof. Dr. M. Lohoff mit Unterstützung von Prof. Dr. R. Mutters ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich weder ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Juliane Mareen Mehnert

Marburg, den 01. Mai 2005