Aus dem Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin

des HELIOS Klinikums Emil von Behring

DISSERTATION

Untersuchung des 16S-23S rDNA Spacers der Gattung *Nocardia*
und seine Bedeutung für die Speziesidentifizierung mittels
gattungsspezifischer PCR und Restriktionsfragmentlängen - Polymorphismus

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Andrees
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H. Mauch

2. Prof. Dr. med. D. H. Krüger

3. Priv.-Doz. Dr. med. K. Arastéh

Datum der Promotion: 9. September 2011

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG ... 6
1.1 Biologie der Nocardien ... 6
1.2 Klinische und ökologische Bedeutung der Gattung *Nocardia* ... 7
1.3 Methoden für die Identifizierung von Nocardien ... 9
1.3.1 Kultur ... 9
1.3.2 Biochemische Methoden der Identifizierung ... 9
1.3.3 Molekularbiologische Methoden der Identifizierung ... 11
1.3.3.1 Methoden basierend auf der 16S rDNA und dem 65-kDa heat shock Protein 11
1.3.3.2 Der 16S-23S rDNA internally transcribed spacer (ITS) und seine Bedeutung für die molekularbiologische Identifikation von Bakterien ... 14
1.4 Aufgabenstellung ... 17
2. MATERIAL UND METHODEN ... 18
2.1 Referenzstämme und klinische Isolate ... 18
2.2 Kultivierung und Überprüfung der Keime mit konventionellen Methoden ... 19
2.3 Identifizierung der Nocardien mittels molekularbiologischer Methoden ... 21
2.3.1 DNA Gewinnung ... 21
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 21
2.3.3 Nachweis der PCR-Produkte ... 24
2.3.4 Klonierung des 16S-23S rDNA Spacers ... 24
2.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte ... 25
2.3.6 Analyse der Sequenzdaten ... 26
2.3.7 Phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten ... 27
2.3.8 Primer Entwicklung und Evaluation ... 27
2.3.9 Restriktionsanalyse des 16S-23S rDNA Spacers ... 28
3. ERGEBNISSE ... 29
3.1 Morphologische und biochemische Identifizierung der *Nocardia*-Isolate ... 29
3.2 Analysen der 16S rDNA ... 32
3.2.1 PCR der 16S rDNA ... 32
3.2.2 Sequenzierung der 16S rDNA ... 33
3.2.3 Phylogenetische Auswertung der 16S rDNA Sequenzdaten ... 34
3.3 Analysen des 16S-23S rDNA Spacers ... 41
3.3.1 Amplifizierung und Sequenzierung des 16S-23S rDNA Spacers ... 41
3.3.2 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen ... 41
3.3.3 Phylogenetische Auswertung der 16S-23S rDNA Sequenzdaten ... 45
3.4 Identifizierung der Nocardien basierend auf 16S-23S rDNA Spacersequenzen ... 49
3.4.1 Gattungsspezifische PCR des 16S-23S rDNA Spacers ... 49
3.4.2 Restriktionsanalyse (RFLP) des 16S-23S rDNA Spacers ... 53
4. DISKUSSION ... 58
4.1 Morphologische und biochemische Identifizierung der *Nocardia*-Isolate ... 58
4.2 Phylogenie der Gattung *Nocardia* basierend auf 16S rDNA Daten ... 59
4.3 Phylogenie der Gattung *Nocardia* basierend auf 16S-23S rDNA Spacer Daten ... 64
4.4 Nachweis der Nocardien mittels gattungsspezifischer PCR und RFLP-Analyse ... 66
5. ZUSAMMENFASSUNG ... 71
6. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER DISSERTATION ... 73
7. LITERATUR ... 75
ERKLÄRUNG ... 85
LEBENSLAUF ... 86
DANKSAGUNGEN ... 87

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des rDNA-Operons mit Angabe der Primerpositionen. …… 22
Abbildung 2: Agarosegelelektrophorese von Eu 4/5 PCR-Produkten…….……. 32
Abbildung 3: Phylogenetischer Baum (16S rDNA Sequenzen)…… 35
Abbildung 4: Phylogenetischer Baum (16S-23S rDNA Spacer Sequenzen)……46
Abbildung 5: Phylogenetischer Baum (16S-23S rDNA Spacer Sequenzen, fünf Gattungen)……48
Abbildung 6: Alignment eines Sequenzausschnittes am Übergang vom 16S-23S rDNA Spacers zur 23S rDNA ……51
Abbildung 7: Sequenzvergleich des Primers Sp3 mit den Sequenzen der analysierten Nocardien und *R. equi*……..51
Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten mit den Primern Sp3 und Sp4……...52
Abbildung 9: Spezifität der Primer Sp3/4 bei 60°C…… 52
Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese nach vorangehendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mva*I……..53
Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese nach vorangehendem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Mva*I und *Msp*I……..54
Abbildung 12: Variation des RFLP-Musters bei Stämmen der Spezies *N. cyriacigeorgica (Mva*I)……... 57
Abbildung 13: Variation des RFLP-Musters bei Stämmen der Spezies *N. cyriacigeorgica (Msp*I)……57

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit untersuchte Referenzstämme und klinische Isolate……. 18
Tabelle 2: Für die PCR der 16S rDNA und des 16S-23S rDNA Spacers verwendete Primer……. 21
Tabelle 3: Für die PCR verwendete Thermocylerprogramme……23
Tabelle 4: Phänotypische Eigenschaften von 42 *Nocardia* Stämmen……31
Tabelle 5: In GenBank eingereichte 16S rDNA Sequenzen von 26 *Nocardia* Spezies.. 33
Tabelle 6: Distance Matrix der 16S rDNA Sequenzen von den sequenzierten Typusstämmen der Gattung *Nocardia*……38
Tabelle 7: Bei der DSMZ in der Spezies falsch zugeordnete Referenzstämme der Gattung *Nocardia*……... 39
Tabelle 8: In der Gattung falsch zugeordnete Referenzstämme…….. 40
Tabelle 9: Klinische Isolate, die aus der vorliegenden Arbeit bei der DSMZ als Referenzstämme neu aufgenommen wurden……..40
Tabelle 10: 131 in GenBank eingereichte 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen aus 22 Spezies der Gattung *Nocardia*……...42
Tabelle 11: RFLP-Schema von 126 Stämmen aus 24 Spezies der Gattung *Nocardia*…..55

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7H11	flüssiges Kulturmedium nach Middlebrook
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylen-diamine-tetraacetic-acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
hsp	*65-kDa heat shock* Protein
ITS	internally transcribed spacer
JCM	Japanese Collection of Microorganisms
M.	*Mycobacterium*
N.	*Nocardia*
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
R.	*Rhodococcus*
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RISSC	Ribosomal Intergeneric Spacer Sequence Collection
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
T	Typusstamm
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
tDNA	transfer-DNA
T_m	Temperature of melting (Schmelztemperatur)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit

1. EINLEITUNG

1.1 Biologie der Nocardien

Die Gattung *Nocardia* gehört zu der Ordnung der *Actinomycetales.* Nocardien sind grampositive 0,5 bis 1,2 µm dicke Fadenbakterien, die verzweigte, vegetative Geflechte meist mit Lufthyphen bilden, welche in stäbchenförmige bis kokkoide Elemente zerfallen können (Schaal, 1992).

Die Nocardien wachsen als Aktinomyzeten mit oxidativem Kohlenhydratstoffwechsel obligat aerob. Ihre Zellwände weisen *meso*-Diaminopimelinsäure, Arabinose und Galaktose auf, wodurch sie dem Zellwandtyp IV zuzuordnen sind (Lechevalier und Lechevalier 1970). Die Mycolsäuren der Nocardien besitzen 44 bis 60 Kohlenstoffatome. Einige der Stämme sind partiell oder schwach säurefest (Beaman et al. 1995).

Die Gattung *Nocardia*, deren Name von dem französischen Tierarzt E.I.E. Nocard stammt, wurde 1889 von Trevisan erstmalig gekennzeichnet (Goodfellow und Lechevalier 1989). Die Beschreibung von *Nocardia asteroides (Typus Spezies)* als klassische humanpathogene Spezies wurde 1891 von Eppinger durchgeführt (Burkhardt 1992). Chemotaxonomische Untersuchungen verschiedener als *N. asteroides* klassifizierter Stämme ergaben eine große Heterogenität dieser Spezies, die vorwiegend aus sechs unterschiedlichen Mustern der Antibiotikaempfindlichkeit (Biotypen) ersichtlich wurde (Wallace et al. 1988a). Den verschiedenen Biotypen wurden taxonomische Gruppen zugeordnet, was im Folgenden zu einer Aufteilung der ursprünglichen Spezies „*N. asteroides*“ in *N. asteroides* sensu stricto (mit der *Typus Spezies N. asteroides*), *N. farcinica* (Wallace et al. 1990) und *N. nova* (Wallace et al. 1991) führte. Während die beiden letzteren Arten recht homogen erschienen, blieb die Spezies *N. asteroides* (sensu stricto) weiterhin heterogen. Aus diesem Grund wurden die Spezies *N. abscessus* (Yassin et al. 2000b) und *N. cyriacigeorgica* (Yassin et al. 2001b) aus dem *N. asteroides* Komplex ausgegliedert.

Die Gattung *Nocardia* bildet eine Gruppe von bislang 89 beschriebenen Bakterienspezies[1] (Brown-Elliott et al. 2006) medizinischer und ökologischer Bedeutung.

[1] DSMZ Bacterial Nomenclature Up-to-Date
[http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=NOCARDIA] , Stand 19.04.2009

1.2 Klinische und ökologische Bedeutung der Gattung *Nocardia*

Die in der Umwelt vorkommenden Nocardien leben vor allem im Erdreich, im Oberflächenwasser und im Abwasser (Schaal 1992). Insbesondere im Erdreich spielen sie eine wichtige Rolle beim Abbau von totem organischen Material.

Von den 89 beschriebenen Spezies sind nicht alle humanpathogen (Schaal 1994). Klinische Fälle wurden von insgesamt 33 Spezies beschrieben (Brown-Elliott et al. 2006). Eine Nocardieninfektion entsteht stets exogen meist über die Atemwege oder durch Hautwunden. Die Krankheitszustände lassen sich unterteilen in *Nocardiosen* und *Aktinomyzetome,* wobei die *Nocardiosen* den größeren Anteil ausmachen (Boiron et al. 1992, Brown-Elliott et al. 2006, Minero et al. 2009).

Nocardiosen können sowohl bei immungeschwächten als auch bei gesunden Menschen auftreten. Die Infektion kann sowohl akut als auch chronisch verlaufen. Die Haupteintrittspforte ist der Atemtrakt. Im Gegensatz dazu sind bei den *Aktinomyzetomen* die Haupteintrittspforte Hautwunden. Diese nicht opportunistische Krankheitsform tritt insbesondere in den Tropen und Subtropen auf und führt zu eitrigen Entzündungen des Bindegewebes mit Fistelbildung bis hin zu einem Mitbefall von Knochen.

Ein großer Teil (40-60%) der Patienten mit *Nocardiosen* leiden unter prädisponierenden Grundkrankheiten (Schaal 1994) wie z.B. Leukämie, AIDS, chronische Lungenaffektionen oder stehen unter immunsuppressiver Therapie (Mari et al. 2001). Die Nocardien treten in diesem Zusammenhang als opportunistische Krankheitserreger auf, die sich sonst gegen ein aktives Abwehrsystem nicht durchsetzen könnten.

Bei *Nocardiosen* treten pulmonale, systemische und superfiziale Verlaufsformen auf. Eine weitere Form ist die nosokomiale, postoperative Wundinfektion (Schaal 1992), die insbesondere durch *N. farcinica* hervorgerufen wird.

Bei pulmonalen und systemischen Verlaufsformen siedelt sich der Erreger, oft handelt es sich hierbei um *N. asteroides* oder *N. farcinica* (Mari et al. 2001, De La Iglesia et al. 2002), vorwiegend in der Lunge an und kann dort zur Ausbildung von Pneumonien mit Lungeninfiltraten führen, welche bei nicht adäquater Therapie Abszesse ausbilden, die auf andere Organe übergreifen können. Bei Auftreten dieser Art von Komplikation wurde in einer Studie eine Letalität von 40% festgestellt (Mari et al. 2001).

Bei superfizialen Verlaufsformen handelt es sich um meist gutartig verlaufende Infektionen der Haut oder des Bindegewebes.

Während *N. asteroides, N. nova* und *N. farcinica* häufig zu Nocardiosen führen ist *N. brasiliensis* der häufigste Erreger von *Aktinomyzetomen*. Da *N. brasiliensis* vorwiegend in

den Tropen und Subtropen aufzufinden ist, spielt diese Form der Infektion in Deutschland nur eine untergeordnete Rolle. Infektionen können über verschmutzte Wunden, z. B. nach Verletzung durch Dornen, verursacht werden oder nach Kontakt mit Erde entstehen.

Neben *N. farcinica* und *N. asteroides* spielen auch die Spezies *N. cyriacigeorgica* (pulmonale und systemische Nocardiosen, Yassin et al. 2001b, Fux et al. 2003), *N. abscessus* (Oberschenkelabszess; Yassin et al. 2000b), *N. paucivorans* (Nocardiosis; Eisenblätter et al. 2002, Yassin et al. 2000a) eine größere klinische Bedeutung. Infektionen mit *N. otitidiscaviarum* (superfiziale Nocardiose), *N. transvalensis* (Aktinomyzetome), *N. africana* (pulmonale Infektionen im Sudan; Hamid et al. 2001) *N. veterana* (pulmonalen Nocardiosen, Gurtler et al. 2001, Pottumarthy 2003, Conville et al. 2003, Godreuil 2003) beim Menschen wurden bisher nur vereinzelt beschrieben.

Seit 1960 ist weltweit ein schwacher Anstieg an Nocardiosen zu erkennen (Schaal, 1992, Corti und Villafane-Fioti 2003, Minero et al. 2009). In Deutschland wurden 1992 etwa 100 Fälle (Schaal, 1992) und in Frankreich 150 – 250 Fälle festgestellt (Boiron et al. 1992). Davon wurden 66.7% durch Vertreter des *N. asteroides* Komplexes, 23.8% durch *N. farcinica*, 3.2% durch *N. brasiliensis*, 4.8% durch *N. otitidiscaviarum* und 1.5% durch *N. carnea* ausgelöst. Dabei verliefen 57,1% der *N. farcinica* und 17,6% der *N. asteroides* Infektionen tödlich (Boiron et al. 1992).

Insbesondere pulmonale Formen bei HIV Patienten nahmen in der letzten Zeit stetig zu (Baracco und Dickinson 2001, Godreuil et al. 2003).

In dem Zeitraum 1992-2003 wurden in der Lungenklinik Heckeshorn 20 klinische Fälle von Nocardiainfektionen festgestellt. Dabei handelte es sich um die Spezies (Anzahl in Klammern): *N. cyriacigeorgica* (5), *N. farcinica* (4), *N. nova* (5), *N. carnea* (2), *N. otitidiscaviarum* (2), *N. abscessus* (1) und *N. paucivorans* (1). Die Infektion mit *N. paucivorans* verlief als einzige mit tödlichem Ausgang.

Nocardien haben neben der humanpathogenen auch eine tierpathogene Bedeutung. So können *N. asteroides* und *N. farcinica* u.a. bei Milchkühen zu endemischen Mastidien (Schaal 1992) führen, die sowohl unter lebensmittelhygienischen als auch wirtschaftlichen Aspekten Probleme hervorrufen können.

Andere Spezies wurden ausschließlich bei Fischen beobachtet. Dazu gehören *N. seriolae* (Kudo et al. 1988) und *N. salmonicida* (Isik et al. 1999a). *N. crassostreae* wurde bei Austern im Pazifik gefunden (Friedman et al. 1998).

1.3 Methoden für die Identifizierung von Nocardien

Eine exakte Speziesidentifizierung von Nocardien aus klinischen Patientenproben spielt eine wichtige Rolle bei der Abgrenzung von anderen meist irrelevanten Kontaminanten ähnlicher Morphologie, wie z.B. *Streptomyces*. Zusätzlich erleichtert ein sicheres und schnelles Identifizierungsergebnis die Einschätzung der möglichen klinischen Relevanz und die Auswahl der für die initiale kalkulierte Therapie am besten geeigneten Chemotherapeutika.

1.3.1 Kultur

Nocardien vermehren sich auf fast allen Nährmedien unter aeroben Bedingungen. Optimale Bedingungen erhält man bei Temperaturen von 30°C bis 37°C unter Verwendung von Columbia-Blut-Agar, 7H11 Agar oder Löwenstein-Jensen Medium. In den ersten vier Bebrütungstagen bilden sich mit dem Auge sichtbare Kolonien, die in 1 bis 2 Wochen zu ausgewachsenen Makrokolonien mit Luftmycel heranwachsen und einen charakteristischen erdigen Geruch verbreiten (Schaal 1992).

Obwohl Nocardien keine besonderen Ansprüche an die Nährböden stellen, besteht wegen der langen Bebrütungs- und Beobachtungszeit die Gefahr der Kontamination. So kann es zu einer Überwucherung oder eine Unterdrückung des Wachstums der Nocardien kommen, was eine weitere Anzucht und Identifizierung erschwert.

Durch die große kulturelle als auch mikroskopische Ähnlichkeit zwischen den Spezies und zu anderen aeroben Aktinomyzeten sind diese Nachweisverfahren sowohl zur Gattungs- als auch Speziesidentifikation nicht geeignet.

1.3.2 Biochemische Methoden der Identifizierung

Eine Abgrenzung der Nocardien von anderen Aktinomyzeten und eine Differenzierung zwischen den *Nocardia* Spezies kann mit Hilfe biochemischer Tests teilweise gelingen.

Erste Ergebnisse können mit dem leicht durchzuführenden Lysozymtest erzielt werden (Hollick 1995), da Nocardien wie *Tsukamurella* eine Resistenz gegen das Enzym Lysozym aufweisen. Eine Differenzierung zwischen den beiden Gattungen ist hiermit aber nicht möglich.

Eine Identifizierung der Gattung kann durch den Nachweis von *meso*-Diaminopimelinsäure und der Differenzierung von Mycolsäuren geschehen. Diese nur in Referenzlaboratorien durchgeführten Verfahren sind in der Literatur ausführlich dargestellt (Schaal 1992) und sollen an dieser Stelle nicht wiedergegeben werden. Der Nachweis von *meso*-

Diaminopimelinsäure reicht alleine nicht zur Gattungsidentifikation aus, da weitere Gattungen wie *Corynebacterium* und *Mycobacterium meso*-Diaminopimelinsäure besitzen. Erst durch die Differenzierung der Mycolsäuren kann eine Gattungsidentifikation mittels dünnschichtchromatographischen Vergleichs mit Referenzstämmen gelingen. Neben einem hohen experimentellen und zeitlichen Aufwand (2 Tage) geht diesem Verfahren generell eine etwa siebentägige Anzucht des Zellmaterials voraus, was eine schnelle Diagnose ausschließt.

Die Speziesidentifikation kann für einige Spezies mit Hilfe der leicht zu handhabenden Hydrolysetests (Abbau von Casein, Tyrosin, Xanthin, Hypoxanthin, Adenin oder Testosteron) durchgeführt werden (Beaman et al. 1995, Baba et al. 1997). Dieses Verfahren beansprucht bis zu zwei Wochen und ermöglicht keine Unterscheidung zwischen den klinisch relevanten Arten *N. abscessus, N. asteroides, N. carnea, N. farcinica, N. nova, N. paucivorans* und *N. cyriacigeorgica*, die alle Hydrolyse negativ sind.

Eine Speziesidentifizierung mittels Auxanographie-Verfahren nach Schaal, in dem die Verwertbarkeit verschiedener organischer Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle getestet wird, erlaubt eine Differenzierung zwischen den meisten *Nocardia* Spezies, weist aber auch einen zeitlichen Aufwand von 7-14 Tagen Bebrütungszeit auf (Schaal 1992).

In einem kürzeren Zeitraum lassen sich Differenzierungen mittels Sensibilitätsprüfungen gegenüber Antibiotika wie Ampicillin, Ciprofloxacin, Cefotaxim, Erythromycin, Imipenem, Tobramycin und Piperacillin mittels Agardiffusionstest nach 1-2 Tagen Bebrütung bei 36°C erzielen (Wallace et al. 1988a, Ambaye et al. 1997, Kiska et al. 2002). Sechs verschiedene Muster der Antibiotikaempfindlichkeit (Biotypen, drug patterns) wurden bei Stämmen der Spezies *N. asteroides* festgestellt (Wallace et al. 1988a, Brown-Elliott et al. 2006). Durch die Ausgrenzung neuer Spezies aus dem *N. asteroides* Komplex konnten der Biotyp III *N. nova* (Tsukamura 1982, Yano et al. 1990, Wallace et al. 1991) und der Biotyp V *N. farcinica* (Wallace et al. 1990) eindeutig zugeordnet werden.

1.3.3 Molekularbiologische Methoden der Identifizierung

1.3.3.1 Methoden basierend auf der 16S rDNA und dem *65-kDa heat shock* Protein

Durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 1983 durch K. Mullis (Mullis et al. 1986) wurde ein wichtiger Grundstein für einfache und schnelle molekularbiologische Methoden gelegt. Die PCR bietet die Möglichkeit in kurzer Zeit kleinste Mengen DNA *in vitro* zu amplifizieren, welche dann mittels einfacher Verfahren wie Elektrophorese, Hybridisierung oder Sequenzierung zur Identifizierung von Mikroorganismen verwendet werden können (Alphey 1998, Böttger 1991, Edwards et al. 1989, Göbel 1996, Newton und Graham 1994, Schuppler et al. 1995).

Insbesondere die Sequenzierung der 16S rDNA hat einen wichtigen Stellenwert bei der Identifizierung von bakteriellen Krankheitserregern oder zur Analyse phylogenetischer Verwandtschaften zwischen verschiedenen Gattungen und Spezies eingenommen (Choi et al. 1996, Clarridge 2004, Patel 2001, Wink und Werle 1994) und ist derzeit die am meisten verwendete Methode für die Identifizierung von Nocardien (Turenne et al. 2001, Harmsen et al. 2002, Alfaresi et al. 2006, Minero et al. 2009, Xiao et al. 2010). Dabei werden im Rahmen der Routinediagnostik, vorrausgesetzt es besteht die apparative Möglichkeit zu sequenzieren, in der Regel Sequenzierungen partieller Bereiche der 16S rDNA erfolgreich zur Gattungs- und Speziesidentifikation vieler Erreger eingesetzt. Das bekannteste Beispiel dafür ist die Sequenzierung der Helix 10 oder der Helix 18 der 16S rDNA zur Identifizierung von Mykobakterien (Böttger 1991). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt in der Regel über Homologievergleiche in öffentlichen Gendatenbanken wie GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/, Altschul et al. 1990) oder ridom (http://www.ridom-rdna.de, Harmsen et al. 2002, Mellmann et al. 2003). Letztere Datenbank enthält nur partielle 16S rDNA Sequenzen, die in einigen Fällen bei sehr nah verwandten Spezies keine Differenzierung ermöglichen. Schwierigkeiten bei der Abgrenzung von *N. soli* und *N. cummidelens* aber auch von *N. africana* und *N. veterana* basierend auf partiellen Sequenzen wurden von Conville et al. 2003 beschrieben. Zudem können Fehlidentifizierungen mittels Homologievergleiche in öffentlichen Sequenzdatenbanken (z.B. GenBank) aus dem Vorhandensein von fehlerhaften Einträgen resultieren (Turenne et al. 2001).

Erste phylogenetische Untersuchungen innerhalb der aeroben Aktinomyzeten unternahmen Rainey et al. (1995) und Chun und Goodfellow (1995) nachdem Bemühungen zur vollständigen Aufklärung der Taxonomie der Nocardien, die sich ausschließlich auf morphologischen und chemotaxonomischen Verfahren stützten, nicht zu zufriedenstellenden

Ergebnissen geführt hatten. Im Rahmen dieser phylogenetischen Untersuchungen gelang dagegen eine eindeutige Abgrenzung der Gattungen *Nocardia* zur Gattung *Rhodococcus*, die im phylogenetischen Stammbaum einen signifikanten Unterschied aufwiesen (Rainey et al. 1995). In diesen phylogenetischen Untersuchungen der 16S rDNA, die allerdings nur einen Teil der bekannten Spezies mit einschlossen, wurde auch gezeigt, dass einige Nocardien-Stämme falschen Spezies oder sogar falschen Gattungen zugeordnet worden waren.

In den letzten Jahren wurde nach schnellen molekularbiologischen Methoden zur Gattungs- bzw. Speziesidentifikation der Nocardien gesucht. Verfahren zur Gattungsidentifikation klinisch relevanter Nocardien mittels gattungsspezifischer Primer wurden 1999 von Laurent et al. und 2005 von Couble et al. basierend auf der 16S rDNA beschrieben. Durch einen zusätzlichen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Mln*I, das gattungsspezifisch nur das PCR-Produkt der Nocardien schneidet, sollte eine Absicherung der Spezifität im Falle eines unspezifischen PCR-Produkts nach Amplifikation einer anderen Gattung gewährleistet werden (Laurent et al. 1999). Eine Speziesidentifikation lässt sich mit Hilfe dieses Verfahrens nicht erzielen.

Ein vielversprechendes Verfahren zur schnellen Gattungsidentifikation basiert auf der real-time-PCR (Alfaresi und Elkosh 2006). Unter Verwendung der von Laurent et al. 1999 beschriebenen Primer gelang es Alfaresi und Elkosh mit recht hoher Zuverlässigkeit, Nocardien basierend auf der 16S rDNA zu identifizieren. Einige Referenzstämme und Sequenzen, die Alfaresi und Elkosh für ihre Publikation verwendet haben, stammen aus der vorliegenden Arbeit.

Methoden zur Speziesidentifikation wurden zunächst im *65-kDa heat shock* Protein (*hsp*) entwickelt. Durch Restriktionsenzymanalyse eines 439-bp-großen PCR-Produktes mit den Endonukleasen *Msp*I und *Bsa*HI konnten RFLP (Restriktionslängen-Polymorphismen) Muster erarbeitet werden, die eine Speziesdifferenzierung von vorerst 12 klinisch relevanten *Nocardia* Spezies ermöglichten (Steingrube et al. 1995). Während die eindeutige Differenzierung zwischen *N. nova, N. farcinica, N. brasiliensis* und *N. otitidiscaviarum* gelang, konnten der Biotyp IV von *N. asteroides* von einigen *N. transvalensis* Isolaten und *N. asteroides* Biotyp VI von *N. carnea* nicht mittels RFLP unterschieden werden. Bei Evaluierung des Nachweisverfahrens an 175 Stämmen wurde eine Fehlerquote von 3,4% festgestellt (Steingrube et al. 1995). Um die Nocardien von weiteren aeroben Actinomyceten abzugrenzen, wurde das Verfahren auch auf einige Spezies der Gattungen *Actinomadura, Gordonia, Rhodococcus, Streptomyces* und *Tsukamurella* ausgeweitet (Steingrube et al. 1997). Anstelle von *Bsa*HI wurde hier das Enzym *Hin*fI in Verbindung mit dem Enzym *Msp*I

verwendet, welches das Auftreten mehrerer Muster pro Spezies verringerte. *Bsa*HI wurde zusätzlich als drittes Enzym eingesetzt, um *N. brasiliensis* von *N. otitidiscaviarum* zu differenzieren. Eine eindeutige Differenzierung zwischen allen Spezies (z.B. *N. asteroides* von *N. transvalensis*) gelang aber auch nicht mit dem erweiterten Verfahren. Im Jahre 2006 wurde das Verfahren von Rodriguez-Nava et al. um 36 neue Spezies erweitert. Dabei wurden die Grenzen des Verfahrens verdeutlicht, da mehrere der neuen hinzugefügten Spezies mit den von Steingrube et al. bestimmten RFLP-Mustern übereinstimmten. So konnte z.B. keine Differenzierung zwischen den Spezies *N. nova*, *N. soli*, *N. veterana*, *N. africana* und *N. cummidelens* mit diesem Verfahren erreicht werden.

Eine Abgrenzung von den Mykobakterien sollte durch die Verwendung des zusätzlichen Enzyms *Bst*EII erreicht werden, welches kein PCR-Produkt der analysierten Stämme aus der Gruppe der aeroben Aktinomyceten aber alle Mykobakterien mindestens einmal schneidet. Allerdings zeigten Rodriguez-Nava et al., dass diese Schnittstelle auch bei den Spezies *N. ignorata* und *N. cerradoenensis* aufzufinden ist, was die Wertigkeit des Verfahrens einschränkt.

Ein alternativer Weg wurde von Conville und Mitarbeiter beschrieben, die eine Restriktionsanalyse basierend auf einem 999 bp großen Amplifikat der 16S rDNA entwickelten (Conville et al. 2000). Die für dieses Verfahren entwickelte PCR amplifiziert alle Nocardien (bis auf *N. asteroides* Biotyp IV) aber auch Stämme aus verwandten Gattungen. Durch die Verwendung von vier Enzymen (*Hin*P1I, *Dpn*II, *Sph*I und *Bst*EII) gelang es neun klinisch relevante *Nocardia* Spezies eindeutig zu identifizieren. Basierend auf 16S rDNA Sequenzdaten lassen sich aber auch für neu beschriebene Spezies leicht die fehlenden RFLP- Muster aufstellen (Conville et al. 2000).

Aufgrund der hohen Homologie in der 16S rDNA zwischen nah verwandten Spezies wie *N. veterana* und *N. africana* können diese mit dem beschriebenen Verfahren nicht differenziert werden (Conville et al. 2003). Insgesamt ist davon auszugehen, dass die 16S rDNA für die Anwendung von Methoden wie die Hybridisierung oder die RFLP-Analyse wegen der hohen Homologie zwischen den Spezies – diese beträgt für die Typusstämme 97,2% ± 0,7% (Chun und Goodfellow 1995) – nicht gut geeignet ist.

Obwohl das *hsp* Gen aufgrund der höheren Heterogenität der Primärstruktur im Gegensatz zur 16S rDNA geeigneter für eine Speziesidentifikation erscheint, hat diese Zielsequenz den Nachteil, dass insbesondere beim Vorliegen neuer Spezies, im Gegensatz zur 16S rDNA meist keine *hsp* Gensequenzen veröffentlicht werden. Treten bei klinischen Isolaten neue

Muster auf, können somit aus diesen keine Resultate bezüglich der Gattung oder der Spezies gezogen werden.

Ein vielversprechendes Verfahren zur schnellen Speziesidentifikation bietet ein Reverse Line-Blot- Test (Xiao et al. 2010). Basierend auf 16S rDNA Sequenzen wurden Sonden entwickelt, die speziesspezifisch hybridisieren. Bis auf *Nocardia paucivorans* und einige *Nocardia farcinica* Stämme lässt sich mit diesem Verfahren eine sichere Spezieszuordnung treffen. Um auch diese Stämme zu identifizieren, wurden Sonden aus dem 16S-23S rDNA Spacer entwickelt. Mit Hilfe dieser Sonden konnten auch die fehlenden Stämme eindeutig identifiziert werden. Die von Xiao et al. verwendeten 16S-23S rDNA Sequenzen der Gattung *Nocardia* stammen aus der vorliegenden Arbeit.

1.3.3.2 Der 16S-23S rDNA internally transcribed spacer (ITS) und seine Bedeutung für die molekularbiologische Identifikation von Bakterien

Eine Alternative zur hoch konservierten 16S rDNA für die gattungsspezifische PCR oder Speziesidentifikation von Bakterien mittels molekulargenetischer Verfahren bietet der 16S-23S rDNA internally transcribed spacer (ITS). Aufgrund seiner höheren Variabilität in der Primärstruktur wurde diese Zielsequenz für die molekulare Identifikation, insbesondere eng verwandter Spezies, vorgeschlagen (Gürtler und Stanisich 1996).

Der 16S-23S rDNA internally transcribed spacer (ITS) liegt zwischen dem 16S (ca. 1,5 kb) und 23S rDNA Gen (ca. 3,2 kb), einem Teil des Genoms, das die Prä-rRNA codiert. Prä-rRNA Transkriptionseinheiten (ca. 5,3 kb bei *Mycobacterium tuberculosis* (Ji et al. 1994)) sind in der DNA z.T. in Form von mehreren Operons enthalten. So wurden in *E. coli* sieben (Morgan 1986), bei schnellwachsenden Mykobakterien wie *M. smegmatis* zwei (Ji et al. 1994a) und bei langsamwachsenden Mykobakterien wie *M. avium* nur ein rRNA Operon festgestellt (Bercovier et al. 1986, Ji et al. 1994b). Die genomischen Abschnitte in der Prä-rRNA, die den drei fertigen rRNA Molekülen entsprechen, liegen immer in derselben 5´-> 3´Anordnung vor. Die Prä-rRNA besteht neben den 16S, 23S und 5S rRNA Molekülen aus den Spacern am Anfang („leader“) und am Ende („trailer“) der Einheit und den 16S-23S rDNA und 23S-5S rDNA Spacer. Bei *E. coli* machen die Spacer einen Anteil von ca. 25% der Prä-rRNA aus. Im Gegensatz zu Spacern im Genom, die nicht transkribiert werden, werden die ITS zur Prä-rRNA mittranskribiert. Die Transkription durch die RNA-Polymerase wird bei *Mycobacterium tuberculosis* ca. 370 bp vor dem 5´Ende der 16S rDNA mit Hilfe einer Promotorregion eingeleitet (Ji et al. 1994b). Die einzelsträngige Prä-rRNA faltet sich so, dass ein Teil des 16S-23S rRNA Spacers mit der „leader“ - Region vor dem 5´-Ende der 16S

rRNA und der andere Teil des 16S-23S rRNA Spacers mit dem 23S-5S rRNA Spacer über komplementäre Basensequenzen Strukturen ausbilden, die dann Angriffspunkte für das Enzym RNAseIII bilden, welches die Prä-16S-, Prä-23S- und Prä-5S rRNA bildet. Die verbleibenden Bereiche des Spacers werden anschließend durch nucleolytische Enzyme schrittweise verdaut und es entstehen die fertigen rRNA Moleküle, welche zusammen mit Proteinen die Ribosomen bilden (Lodish et al. 1996).

Während sich die Primärstruktur der 16S und der 23S rDNA in den verschiedenen Operons im Genom nicht oder nur minimal ändert, wurde bei Keimen, die mehrere rRNA Operons aufweisen, bei den ITS Sequenzen z.T. eine hohe Interoperonvariabilität bezüglich der Länge als auch der Basenabfolge festgestellt (Gürtler und Stanisich 1996, Mendoza et al. 1998). Die Länge des 16S-23S rDNA Spacers variiert je nach Gattung zwischen 60 bp (*Thermoproteus tenax*) bis 1529 bp bei *Bartonella elizabethae* (Gürtler und Stanisich 1996).

Der Längenunterschied resultiert z.T. aus dem Auftreten von tRNA codierenden Sequenzbereichen bei einigen Bakterien, die eine Länge von 60-80 Nucleotiden besitzen (Lodish et al. 1996). Diese Sequenzbereiche lassen sich insbesondere durch typische Basenabfolgen mit Hilfe von Software (Lowe und Eddy 1997) oder durch die typische Sekundärstruktur der tRNA erkennen. Während die gramnegativen Bakterien meist tRNA codierende Bereiche im Spacer besitzen, sind diese bei den grampositiven Bakterien meist nicht vorhanden (Gürtler und Stanisich 1996, Garcia-Martinez et al. 2001).

Aussagekräftige phylogenetische Untersuchungen aufgrund von Sequenzdaten des 16S-23SrDNA Spacers grampositiver Stäbchen wurden in der Gattung *Nocardioides* (Yoon et al. 1998), *Saccharomonospora* (Yoon et al. 1997) und *Listeria* (Graham et al. 1997) durchgeführt.

In Abhängigkeit von der Spezies wurden bei Vertretern der Gattung *Nocardioides* deutliche Unterschiede in der Länge des Spacers von 328-539 bp festgestellt. Das Auftreten von Operons mit unterschiedlicher Primärstruktur wurde in nur 5 von 33 Isolaten beobachtet und bezog sich nicht auf die Länge des Spacers. Deutlich wurden die im Vergleich zur 16S rDNA erheblich größeren Differenzen zwischen den einzelnen Sequenzen sowohl innerhalb als auch zwischen nahe verwandten Spezies. So lag die Sequenzübereinstimmung zwischen zwei Stämmen der Spezies *Nocardioides albus* bei nur 84,1% und zwischen *Nocardioides albus* und *Nocardioides simplex* bei 55,1% (Yoon et al. 1998).

Völlig abweichend zu den Beobachtungen in der Gattung *Nocardioides* wiesen die Vertreter der Gattung *Saccharomonospora* dagegen im Bereich des 16S-23S rDNA Spacers alle die gleiche Basenabfolge auf, was den Spacer als mögliches Zielsequenz für die Erkennung der

Spezies interessant macht (Yoon et al. 1997). In der Gattung *Listeria* wurden für jede untersuchte Spezies zwei Operons gefunden, die sich deutlich in ihrer Länge unterschieden aber übereinstimmende Bereiche aufwiesen. Die intraspezies-spezifischen Sequenzabweichungen waren auch hier gering. Bei dem längeren Spacerprodukt wurden zusätzlich tRNA codierende Bereiche festgestellt (Graham et al. 1997), die bei den Gattungen *Nocardioides* und *Saccharomonospora* nicht auftraten.

Aufgrund der meist hohen Interoperonvariabilität lässt sich der Spacer nicht immer direkt sequenzieren und muss vorher kloniert werden, was die Einsatzmöglichkeit von Spacersequenzen in der klinischen Diagnostik einschränkt. Trotzdem werden immer mehr Sequenzen des 16S-23S rDNA Spacers in Datenbanken wie GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) oder ridom (http://www.ridom-rdna.de, Harmsen et al. 2002, Mellmann et al. 2003) veröffentlicht. Es wurde inzwischen sogar eine nur für Spacersequenzen eingerichtete Datenbank RISSC (Ribosomal Intergeneric Spacer Sequence Collection, http://egg.umh.es/rissc/, Garcia-Martinez et al. 2001) entwickelt, die zusätzliche Informationen über die Spacersequenzen enthält.

Alternativ zur Sequenzierung kann die Differenzierung von Krankheitserregern durch die Darstellung unterschiedlich großer PCR-Produkte oder durch das Auftreten mehrerer unterschiedlich langer PCR-Produkte durchgeführt werden. So gelang es mit Hilfe einer einzigen PCR der Spacerregion und anschließender Auswertung im Gel 21 Stämme der Spezies *Streptomyces albidoflavus* auf Stammebene basierend auf der Länge und der Anzahl der PCR-Produkte zu identifizieren (Hain et al. 1997). Auch zur Differenzierung von 31 Spezies der Gattung *Staphylococcus* erwies sich dieses Verfahren als geeignet (Mendoza et al. 1998).

Insbesondere aber für die Entwicklung von Sonden oder RFLP-Schemata bietet sich der Spacer gerade bei nah verwandten Spezies oder zur Differenzierung von Subspezies und Stämmen aufgrund seiner größeren Variabilität für einen Nachweis an (Barry et al. 1991, Xiao et al. 2010).

Ein solches Verfahren zur Differenzierung von Krankheitserregern aufgrund ihrer 16S-23S rDNA Spacer mit Durchführung einer gattungsspezifischen PCR und anschließender RFLP-Analyse wurde für die Mykobakterien entwickelt (Roth et al. 1998, Roth et al. 2000). Schon durch die gattungsspezifische PCR kann aufgrund der Größe des PCR-Amplifikates eine erste richtungsweisende Diagnose gestellt werden, da schnellwachsende Mykobakterien ein größeres Spaceramplifikat als die langsam wachsenden aufweisen. Aufgrund der guten Speziesstabilität der Sequenzen bei gleichzeitig hoher Interspeziesvariabilität gelang es für die

Mykobakterien ein RFLP-Schema basierend auf 4 Enzymen zu entwickeln, das eine eindeutige Differenzierung von 48 Spezies ermöglicht (Roth et al. 1998, Roth et al. 2000).

1.4 Aufgabenstellung

Die Identifizierung von Nocardien sowohl auf Gattungs- als auch Speziesebene ist zur Diagnosestellung und für die Vorhersage der Antibiotikaempfindlichkeit oder der Pathogenität des Erregers von medizinischer Bedeutung. Insbesondere durch den Anstieg von Nocardiainfektionen in den letzten Jahren und die steigende Anzahl neuer Spezies benötigt die Diagnostik sichere und schnelle Methoden zur Differenzierung dieser potentiellen Krankheitserreger. Konventionelle mikrobiologische Verfahren erwiesen sich dafür als nicht geeignet. Auch sind die bisher beschriebenen molekularbiologischen Methoden zur Identifizierung von Nocardien entweder nicht spezies- oder gattungsspezifisch oder für Einrichtungen, die keine Sequenzierungsmöglichkeiten besitzen, nicht durchführbar. Zusätzlich wird die Identifizierung durch z.T. fehlerhafte oder für einige Spezies fehlende Sequenzdaten im 16S rDNA Gen in öffentlichen Datenbanken erschwert.

Als Grundlage für die folgenden Analysen sollte eine umfangreiche Stammsammlung von Referenzstämmen und klinischen Isolaten aufgebaut werden. Um einen Vergleich zwischen den konventionellen und molekularbiologischen Methoden ziehen zu können, sollten die Stämme zunächst phänotypisch und anschließend basierend auf ihrer 16S rDNA differenziert werden.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war, ein neues molekularbiologisches Verfahren zur zuverlässigeren Identifikation der Nocardien zu entwickeln. Dazu sollte der 16S-23S rDNA Spacer im Genus *Nocardia* sequenziert und auf seine Eignung für die molekulare Identifikation im Vergleich zur 16S rDNA analysiert werden.

Basierend auf dem 16S-23S rDNA Spacer der Nocardien sollte ein Verfahren zur schnellen und sicheren Identifikation von Nocardien mittels gattungsspezifischer PCR und anschließender Analyse mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) erarbeitet werden. In diesem Zusammenhang war zu klären, wie ausgeprägt die Sequenzvariabilität im 16S-23S rDNA Spacer ist, und ob eine Differenzierung von Subspezies oder klinisch relevanten Biotypen ermöglicht werden kann.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen, die Taxonomie der Gattung *Nocardia* anhand phylogenetischer Daten besser zu verstehen. Dafür sollte überprüft werden, ob sich der Spacer für Untersuchungen phylogenetischer Verwandtschaften anbietet und ob Stammbäume des Spacers mit Stammbäumen der 16S rDNA korrelieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Referenzstämme und klinische Isolate

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Stammsammlung bestehend aus 128 *Nocardia* Stämmen (26 Spezies, 17 *Nocardia species*) und 256 Stämmen nah verwandter Gattungen oder weiterer Gattungen grampositiver Stäbchenbakterien (*Actinomadura, Actinomyces, Corynebacterium, Cellulomonas, Dietzia, Gordonia, Listeria, Mycobacterium, Nocardiopsis, Pseudonocardia, Rhodococcus, Rothia, Saccharomonospora, Skermania, Streptomyces* und *Tsukamurella*) verwendet. Die Zuordnung der Nocardien zu 26 Spezies erfolgte aufgrund der Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen des 16S rDNA Gens (siehe Kap. 2.3.5).

Die untersuchten *Nocardia* Stämme sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit untersuchte Referenzstämme und klinische Isolate

Spezies	***Anzahl***	
	Referenzstämme	***klinische Isolate***
Nocardia abscessus	*2*	*1*
Nocardia africana	*4*	
Nocardia asteroides	*4*	
Nocardia brasiliensis	*5*	
Nocardia brevicatena	*1*	
Nocardia carnea	*3*	*2*
Nocardia corynebacterioides	*1*	
Nocardia crassostreae	*1*	
Nocardia cummidelens	*2*	
Nocardia cyriacigeorgica	*8*	*8*
Nocardia farcinica	*14*	*5*
Nocardia flavorosea	*2*	
Nocardia fluminea	*1*	
Nocardia globerula	*1*	
Nocardia nova	*7*	*6*
Nocardia otitidiscaviarum	*7*	*3*
Nocardia paucivorans	*1*	*4*
Nocardia pseudobrasiliensis	*2*	
Nocardia pseudovaccinii	*1*	
Nocardia salmonicida	*2*	
Nocardia seriolae	*1*	
Nocardia soli	*1*	
Nocardia transvalensis	*3*	
Nocardia uniformis	*2*	
Nocardia vaccinii	*1*	
Nocardia veterana	*5*	
Nocardia sp.	*17*	
Summe	**99**	**29**

Ein Großteil der Referenzstämme wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Kroppenstedt zur Verfügung gestellt. Weitere Referenzstämme stammen von der ATTC (American Type Culture Collection, Manassas, USA), der JCM (Japanese Collection of Microorganisms, Hirosawa, Wako, Saitama, Japan) oder aus Ringversuchen.
Die klinischen Isolate stammen aus dem Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin in der Lungenklinik Heckeshorn und wurden seit 1992 von Patienten isoliert oder zur Identifizierung von anderen Instituten eingesandt.

2.2 Kultivierung und Überprüfung der Keime mit konventionellen Methoden

Die Referenz- und Patientenstämme wurden auf Columbia-Blutagar (Oxoid, COL SB+, PB 5039 A) und Middlebrook 7H11-Agar (21g 7H11 Agarbasis (Difco 0838-19-9), 5ml Glycerin (Merck 104094), 900ml Aqua dest. und 5 Ampullen Middlebrook OADC (BBL 431186)) unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezüchtet.

Die *Nocardia* Stämme wurden makroskopisch durch die Bildung einer myzelartigen Kulturmorphologie mit Auftreten von Luftmyzel und mikroskopisch mittels Gramfärbung durch den Nachweis von Verzweigungen und Fragmentierung des Substratmyzels der Gattung *Nocardia* zugeordnet. Zur weiteren Gattungsidentifizierung wurde von allen 128 *Nocardia* Stämmen und 4 Stämmen je Genus nahe verwandter Gattungen (*Actinomadura, Gordonia, Nocardiopsis, Pseudonocardia, Rhodococcus, Saccharomonospora, Streptomyces* und *Tsukamurella*) die Resistenz gegenüber Lysozym analysiert. Dazu wurden die Stämme gleichzeitig in je einer Bouillon ohne und einer Bouillon mit Lysozym (0,5g Pepton (Merck 7214), 7ml Glycerin (Merck 104094) in 100ml A.dest., nach Bedarf vor Gebrauch Zugabe von 100mg Lysozym (BIOMOL 05934)) für 1 Woche bei 37 °C bebrütet. Ein positives Ergebnis, welches mit Lysozymresistenz gleichzusetzen war, wurde makroskopisch durch vergleichende Beurteilung der wachstumsbedingten Trübung der beiden parallel durchgeführten Flüssigkulturen ermittelt. Kräftiges Wachstum oder im Vergleich zur Kultur ohne Lysozym gleich starkes Wachstum wurde als ein positives Ergebnis befundet.

Weiterhin wurden sowohl alle klinischen Isolate als auch die Referenzstämme mittels Überprüfung der Fähigkeit zur Hydrolyse von Casein, Xanthin, Hypoxanthin und Tyrosin bei einer Bebrütungszeit von 2 Wochen bei 30°C untersucht. Die Hydrolysetestplatten wurden unter Verwendung folgender Reagenzien hergestellt:

Caseinhydrolyse-Agar:

10g Magermilchpulver (Oxoid L31), 2,5g Agar Granulat (BBL 4311849), 200ml Aqua dest.

Tyrosinhydrolyse-Agar:

5g Tyrosin (Sigma T3379), 5g Pepton Gelysat (BBL 4311870), 15g Agar Granulat (BBL 4311849), 3g Rindfleischextrakt gepulvert (BBL 12303) in 1000ml Aqua dest.

Xanthinhydrolse-Agar:

4g Xanthin (Sigma X7375), 5g Pepton Gelysat (BBL 4311870), 15g Agar Granulat (BBL 4311849), 3g Rindfleischextrakt gepulvert (BBL 12303) in 1000ml Aqua dest.

Hypoxanthin-Agar:

5g Hypoxanthin (Sigma H9377), 5g Proteose-Pepton (Oxoid L85), 15g Agar Granulat (BBL 4311849), 3g Rindfleischextrakt gepulvert (BBL12303) in 1000ml Aqua dest.

Die Hydrolysetestplatten dienten der Abgrenzung von *N. otitidiscaviarum* und *N. brasiliensis*. Zudem wurden 42 *Nocardia* Stämme ausgewählt und diese einer weiteren aufwendigeren biochemischen Analyse unterzogen. Diese Isolate waren sowohl klinisch relevante Spezies (*N. asteroides, N. abscessus, N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. nova* und *N. paucivorans*) als auch klinisch unbedeutendere aber nahe verwandte Spezies (*N. carnea, N. flavorosea* und 6 *N.sp*. Stämme), die nicht mittels Hydrolyse differenziert werden konnten. Folgende biochemische Tests wurden durchgeführt: Wachstum bei 45 °C (Kiska et al. 2002), Hydrolyse von Harnstoff (Yassin et al. 2000b) und Assimilation von Kohlenhydraten als einzige Kohlenstoffquelle (Muir und Pritchard 1997). Letztere wurde mittels API ID 32C von BioMerieux (Marcy-l´Etoile, Frankreich) wie von Muir und Pritchard 1997 beschrieben durchgeführt, wobei allerdings keine Auswertung anhand der beschriebenen Api-Codes erfolgte, es wurden lediglich die Reaktionen als positiv oder negativ dokumentiert. Die weitere Differenzierung geschah mittels Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Antibiotika mit Hilfe des Agardiffusionstests bei 37 °C auf Müller Hinton-Agar mit Schafblut (Brown et al. 1999, Wallace et al. 1988b). Empfindlichkeit wurde festgestellt, wenn die Hemmhofdurchmesser größer als die in Klammern angegebenen Werte in Millimetern waren: Ampicillin (10 µg, 25 mm), Ciprofloxacin (5 µg, 20 mm), Cefotaxime (30 µg, 25 mm), Erythromycin (15 µg, 30 mm), Imipenem (10 µg, 15 mm), Tobramycin (10 µg, 20 mm), Piperacillin (100 µg, 20 mm). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Zuordnung zu den nach Wallace et al. (1988b) beschriebenen Biotypen durchgeführt.

2.3 Identifizierung der Nocardien mittels molekularbiologischer Methoden

2.3.1 DNA Gewinnung

Die DNA wurde von Zellmaterial einer im Durchmesser 1-2mm großen Bakterienkolonie einer zweiwöchigen Kultur auf Middlebrook 7H11-Agar gewonnen. Das Zellmaterial wurde in ein Reaktionsgefäß (Sarstedt 72.692.105) eingebracht, mit 200µl Tris (Tris-HCl 10mM, pH 7,8-8,2) resuspensiert, mit 4 Tropfen Glass Beads (Sigma Nr G4649 in Tris 10mM) versetzt und anschließend zur Freisetzung der DNA für 10 Minuten in ein Ultraschallbad (Sonorex RK156, Bandelin, Berlin) gestellt. Nach Überschichtung des Ansatzes mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma M3516) wurde das Zelllysat für 15 Minuten bei 95 °C in einem Thermoblock (TB1, Biometra, Göttingen) inkubiert und anschließend bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zwei Abschnitte der 16S rDNA, die nahezu das komplette 16S rDNA Gen abdecken, wurden mit Hilfe der in der Tabelle 2 dargestellten Primerpaare Eu4b/Eu5b und Eu7rv/Eu1 mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Position 8 bis 1522). Der übrige 3´- ständige Teil des 16S rDNA Gens wurde durch das für die Amplifikation und Sequenzierung des 16S-23S rDNA Spacers eingesetzte Primerpaar ITS1/ITS5 sequenziert. Für die gattungsspezifische PCR der Nocardien und anschließende RFLP-Analyse wurde das Primerpaar Sp3/Sp4 verwendet.

Tabelle 2: Für die PCR der 16S rDNA und des 16S-23S rDNA Spacers verwendete Primer

Primer	Sequenz (5´→ 3´)	Zielsequenz	Position [1]
Eu4	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	16S rDNA	8-27
Eu4b	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG [2]		8-28
Eu5	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	16S rDNA	926-907
Eu5b	CCCCG TCA ATT CMT TTR AGT TT [2]		928-907
Eu7rv	GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC	16S rDNA	784-806
Eu1	GAA AGG AGG TGA TCC AAC CGC	16S rDNA	1541-1522
ITS1	TTG TAC ACA CCG CCC GTC A	16S rDNA	1390-1408
ITS5	GGG TAC TGA GAT GTT TCA CTT C	23S rDNA	209-188
Sp3	CGC TCT TAM ACA CTT ACW AAC CAA	ITS	Siehe Text
Sp4	CAC ACT ATT GGG TCC TGA AAG	ITS-23S rDNA	Siehe Text

[1] Die Nummern der Nukleotidpositionen im 16S und 23S rDNA Gen beziehen sich auf die Sequenz von Escherichia coli (NC 002695) in Anlehnung an den Veröffentlichungen von Edwards et al. (1989), Gürtler und Stanisich (1996), Lane et al. (1985), Weisburg et al. (1991) und Wilson et al. (1990).

[2] Die gekennzeichneten Primer wurden zwecks besserer Homologie mit der Sequenz von Nocardien modifiziert, der modifizierte Primer ist unterhalb des ursprünglich publizierten Primers dargestellt.

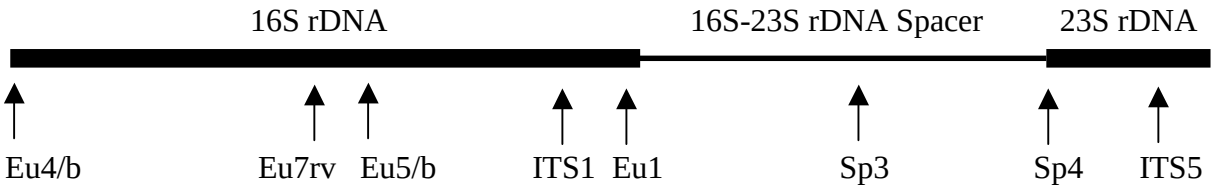

Abbildung 1: Schematische Darstellung des rDNA-Operons mit Angabe der Primerpositionen.

Für die Durchführung der PCR wurde eine räumliche Trennung der Arbeiten vor der Amplifikation und nach der Amplifikation zur Vermeidung von Kontamination eingehalten und generell aerosolgeschützte Pipettenspitzen (Biozym 692066, 692150 und 692079) verwendet. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl pro PCR-Gefäß (Tube) in PCR Strips (8 Tubes pro Strip, Biozym 711030/40) unter Verwendung der in der Tabelle dargestellten Primern durchgeführt. Dazu wurden in einem auf Eiswasser stehenden 1,5-ml-Reagiergefäß (Safe-Lock) (Eppendorf 0030120.086) die einzelnen Komponenten wie folgt zusammengemischt:

- 46,8 µl Mastermix, bestehend aus
  - 5 µl PCR Puffer (Sigma P2192)
  - 8 µl dNTPs (1,2 mM je dNTP, Amersham Pharmacia 27-2040/50/60/70)
  - 23,8 µl A.dest (steril, pyrogen und DNA-frei)
  - 5 µl Triton-X-100 (1% in A. dest., Sigma T8787) und
  - 5 µl bovines Serumalbumin (1 % in A. dest., Sigma A6003)
- 0,2 µl Taq Polymerase (Amersham Pharmacia 27-0799, 5 U/µl) und
- 1,5 µl je Primer (5 µM)

Für die Amplifikation von DNA zwecks anschließender Sequenzierung oder Klonierung wurde das eine etwa fünffach geringere Fehlerrate (Cline et al. 1996) aufweisende „proofreading“ Enzym DyNAzyme EXT (Finnenzymes F505S) verwendet.

Zu den 50 µl des PCR-Reaktionsgemisches wurden 2 µl der DNA hinzugegeben. Zusätzlich wurde bei jeder PCR eine Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von *N. asteroides* DSM 43757 verwendet. Die PCR Strips wurden direkt aus dem Eiswasser in den vorgeheizten (95 °C) Thermocycler überführt (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer). Die verwendeten Reaktionsbedingungen für die Amplifikation sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: Für die PCR verwendete Thermocylerprogramme

Primerpaar	Eu4/b / Eu5/b Eu7rv / Eu 1	ITS1 / ITS5	Sp3 / Sp4
Initiale Denaturierung	95 °C 5 Min.	98 °C 20 Sek.	
Zyklische Denaturierung	94 °C 1 Min.	94 °C 20 Sek.	
Annealing der Primer	56 °C 1 Min.	64 °C 20 Sek.	58 °C 20 Sek.
DNA-Synthese	72 °C 1 Min.	72 °C 1 Min.	72 °C 1 Min.
Anzahl der Zyklen	40	40	40
Inkubation	72°C 10 Min.	72°C 5 Min.	72°C 5 Min.

Während die PCR mit den Primerpaaren Eu4b/Eu5b und Eu7rv/Eu1 nur der Synthese der DNA für die Sequenzierung diente und nicht mehr evaluiert werden musste, wurde die PCR mit den Primern Sp3/Sp4 in Versuchsreihen durch Variation der Annealingtemperatur und der Länge der verschiedenen Temperaturschritte vor ihrer Anwendung zunächst optimiert (siehe Kap. 2.3.8).

Zur Eliminierung von Kontaminationen durch bakterielle Fremd-DNA bei der eubakteriellen PCR der 16S rDNA, die eine Sequenzierung erschwert, wurden zwei Verfahren erprobt. Das erste Verfahren wurde nach der Beschreibung von Meier et al. 1993 durchgeführt. Dem Mastermix wurde vor Zugabe der DNA-Probe 0,5 µl 8-Methoxypsoralen in DMSO (2,5 mg 8-methoxy-Psoralen, Sigma M3501-1G, in 1 ml DMSO gelöst) zugegeben und der Ansatz 4 Minuten mit UV Licht der Wellenlänge 254 nm (Vilber Courmat TF20C) bestrahlt.

Beim zweiten Verfahren wurde zu dem Ansatz vor Zugabe der zu untersuchenden DNA 0,5 µl des hitzeempfindlichen Restriktionsenzyms *Hae*III zum Verdau von kontaminierender DNA hinzugegeben (Carroll et al. 1999). Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz vier Minuten bei 95 °C erhitzt und nach Abkühlung auf Eis mit der DNA-Probe versetzt und die PCR durchgeführt. Die Methoden wurden durch die Beurteilung der Amplifikationseffizienz nach Durchführung einer PCR mit einer Verdünnungsreihe genomischer DNA von *N. asteroides* DSM 43757 empirisch beurteilt. Hierfür wurde die genomische DNA in den Verdünnungen von 1 pg/µl, 0,1 pg/µl, 100 fg/µl und 10 fg/µl eingesetzt und die Quantität der amplifizierten DNA anhand der Stärke der Banden in der Agarosegelelektrophorese verglichen.

2.3.3 Nachweis der PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR-Produkte wurde mittels Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt (1,8%-iges Agarosegel, Amresco 221-776). Die Agarose wurde in der Mikrowelle in 1x TBE-Puffer[1] durch Kochen vollständig gelöst und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (Merck. 111615, Konzentration im Gel: 0,1%) versetzt. Nach kurzer Abkühlung wurde sie in Gelschalen gegossen. Für die Darstellung der DNA wurden 8 µl eines PCR-Produktes vor dem Auftragen in eine Geltasche mit 2 µl Loading Buffer[2] versetzt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer (1x) und als Molekulargewichtsmarker eine 100-bp-Leiter (GibcoBRL 15628-019) verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Gel ca. 30 Minuten bei 80V aufgetrennt. Auf einem Transilluminator wurde das Gel über UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm beurteilt und mit einem Polaroidbild dokumentiert.

2.3.4 Klonierung des 16S-23S rDNA Spacers

Die 16S-23S rDNA Spaceramplifikate von 52 Stämmen der Gattung *Nocardia* und 6 Isolaten nah verwandter Gattungen wurden vor der Sequenzierung kloniert. Für die Klonierung wurden die ITS1/5 PCR-Produkte nach Aufreinigung mit Microcon-Centrifugal Filtereinheiten (Millipore UFC7 PCR 50) nach Angaben des Herstellers direkt eingesetzt. Als Klonierungsverfahren wurde die TA-Klonierung verwendet. Hierbei macht man sich die Eigenschaft der Taq-Polymerase zunutze, welche an das 3´-Ende der doppelsträngigen PCR-Produkte ein überstehendes Adenosin anhängt. Unter Einsatz eines Vektors mit überstehendem Thymidinrest kann so eine effektive Klonierung aller zuvor mittels PCR amplifizierter Operons erfolgen. Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde der TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen K4575-01) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet (Klonierungsvektor pCR4®-TOPO®, Transformation in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*). Anschließend wurden die Bakterienzellen auf Columbia Kochblut-Agar mit Ampicillin aufgetragen.

Von 16 Einzelkolonien wurde nach den oben beschriebenen Methoden die DNA gewonnen und eine ITS1/5 PCR durchgeführt. Um nicht alle 16 Klone sequenzieren zu müssen, wurden die einzelnen PCR-Produkte der Klone mittels RFLP-Analyse auf Unterschiede in ihrer Sequenz gescreent, indem sie mit den Enzymen *Hae*III (Sigma B3158, R5628) und *Msp*I (Sigma B 3782, R4506) nach dem unter Kapitel 2.3.9 dargestellten Verfahren untersucht

[1] 1x TBE-Puffer: 10,8 g TRIS, 5,5 g Borsäure, 4 ml EDTA auf 1Liter A.dest, pH 8

[2] Loading Buffer: 100 mg Bromphenolblau, 46 ml Glycerol, 3,7 g EDTA, auf 100ml mit A.dest auffüllen

wurden. Die aufgrund von unterschiedlichen RFLP–Mustern gefundenen Klone, die unterschiedliche Operons des 16S-23S rDNA Spacers enthalten mussten, wurden anschließend sequenziert. In Fällen wo keine Unterscheidung zwischen den Klonen mit Hilfe der beiden Enzyme möglich war, wurde durch den Einsatz weiterer Restriktionsenzyme (*Dde*I, Promega R629A und *Hinf*I, Fermentas ER0801) eine Differenzierung versucht. Wurde mit keinem Restriktionsenzym eine Unterscheidung erzielt, wurden alle 16 Klone sequenziert.

2.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Alle 128 *Nocardia* Stämme (siehe Kap. 2.1) wurden im 16S rDNA Gen sequenziert. Von 63 Stämmen (Spezifizierung der Stämme siehe Kap. 3.2.2) wurde die beinahe komplette 16S rDNA Sequenz (1494 bzw. 1492bp) für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes (siehe Kap. 2.3.7) ermittelt, die übrigen Stämme wurden mit einer Sequenzlänge von mindestens 600 bp der 5'-Region des 16S rDNA Gens zur Speziesidentifizierung sequenziert. Wiesen partielle 16S rDNA Sequenzen Abweichungen gegenüber bekannten Sequenzen in der Datenbank auf, wurden sie komplett sequenziert. Mit Ausnahme der *N. asteroides* Referenzstämme DSM 43255 und 43258 wurden Stämme mit einer Abweichung von mehr als 8 Basen zu vorhandenen Sequenzen in den Datenbanken als *Nocardia spezies* klassifiziert. Sequenzen mit einer Variabilität von 1 bis 7 Basenunterschieden zur Speziessequenz wurden der entsprechenden Spezies zugeordnet und als Genotypen, die mit römischen Zahlen nummeriert wurden, klassifiziert. Stämme der Spezies *N. cyriacigeorgica*, die nur partiell sequenziert wurden, wurden deshalb auch am 3` Ende der 16S rDNA sequenziert, um eine Unterscheidung zwischen den zwei vorkommenden Sequenzvarianten (Genotypen I und II) zu erhalten. Der 16S-23S rDNA Spacer wurde von 52 Stämmen der Gattung *Nocardia* und 6 Isolaten nah verwandter Gattungen (Spezifizierung der Stämme siehe Kap. 3.2.3) sequenziert.
Für die Sequenzierung wurden die mit den oben beschriebenen Primern amplifizierten PCR-Produkte verwendet. Nach der Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wurden diese mit Hilfe von Microcon-Centrifugal Filtereinheiten (Millipore UFC7 PCR 50) nach Angaben des Herstellers gereinigt, in 20 µl A. dest aufgenommen und die Sequenzierungsreaktion mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems 403044) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 4 µl Terminator Ready Reaction Mix
- 8 µl gereinigtes PCR-Produkt (in etwa 50 ng)
- 1,5 µl Primer (3,2 pmol)
- 6,5 µl A. dest auf 20 µl auffüllen.

Bei PCR-Produkten mit schwächeren Banden im Gel wurden 10 µl des PCR-Produktes und nur 4,5 µl Wasser eingesetzt. Von den PCR-Produkten wurden sowohl die Plus- als auch die Gegenstränge der doppelsträngigen DNA sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600) nach folgendem Programm durchgeführt:

- 96 °C für 2 Min..
- 96 °C für 20 Sek.
- 55 °C für 10 Sek.
- 60 °C für 4 Min.
- 25 Zyklen
- 4 °C

Es folgte eine Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte mittels Ethanolfällung. Die präzipitierte DNA wurde im Vakuum getrocknet, anschließend in Puffer gelöst und im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers sequenziert.

2.3.6 Analyse der Sequenzdaten

Die aus den Sequenzierläufen gewonnenen Chromatogrammdateien wurden mit Hilfe der Chromas Software (Version 1.43, Connor McCarthy, Griffith University, Brisbane, Australien) analysiert und in Form von Sequenzdateien exportiert. Mit den Plus- und Gegenstrangsequenzen wurde mittels BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) ein Alignment basierend auf dem Algorithmus von Clustal W (Higgins et al. 1994) erstellt. Bei Abweichungen zwischen den Plus- und Gegenstrangsequenzen wurden diese wiederholt amplifiziert und sequenziert.

Aus den Alignments wurden die prozentualen Übereinstimmungen der Sequenzen (distance matrix) unter Einsatz von DNADIST (Version 3.5c, J. Felsenstein, University of Washington, USA, Felsenstein 1981) unter Berücksichtigung von Insertionen und Deletionen ermittelt.

Die aus den partiellen 16S rDNA Sequenzen zusammengesetzten annähernd kompletten 16S rDNA Sequenzen wurden mit der DNASIS for Windows Software (Version 2.5, Hitachi

Software 1994-1997) mit bereits ermittelten und mit in öffentlichen Datenbanken publizierten Sequenzen verglichen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, USA, Altschul et al. 1990).

Die kompletten Sequenzen des 16S-23S rDNA Spacers wurden nach dem Auftreten von tDNA codierenden Bereichen mit Hilfe des Onlineprogramms tRNAscan-SE (Lowe und Eddy 1997) analysiert.

Die überprüften Sequenzen wurden mit Hilfe der Sequin Software (Version 3.70, National Center for Biotechnology Information) in die benötigten Dateiformate formatiert und in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) eingereicht. Zusätzlich wurden sowohl die Sequenzen als auch die Chromatogrammfiles der ridom Sequenzdatenbank zur Verfügung gestellt (http://www.ridom-rdna.de, Harmsen et al. 2002, Mellmann et al. 2003).

2.3.7 Phylogenetische Auswertung der Sequenzdaten

Die aus dem Alignment exportierten Sequenzen wurden zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes mit der TREECON for Windows Software (Version 1.3, Yves Van de Peer, Universität Konstanz, Deutschland, Van de Peer und Wachter 1994, Van de Peer und Wachter 1997) verarbeitet. Der Stammbaum wurde basierend auf der Neighbor-Joining-Analyse (Saitou und Nei 1987, Felsenstein 1981) unter Verwendung von Kimuras zwei Parameter-Modell (Kimura 1980) generiert. Als Wurzel wurde sowohl für den 16S rDNA als auch den 16S-23S rDNA Spacer Stammbaum die entsprechende Sequenz von *Rhodococcus equi* (DSM 20307) verwendet.

2.3.8 Primer Entwicklung und Evaluation

Die Alignments der kompletten 16S-23S rDNA Sequenzen wurden in Hinblick auf konservierte Sequenzbereiche zur Entwicklung von gattungsspezifischen Primern untersucht. Dazu wurden auch Bakterien aus nah verwandten Gattungen wie *Rhodococcus, Gordonia, Corynebacterium* und *Tsukamurella* kloniert und sequenziert, da auch für diese keine Sequenzdaten im Spacer bekannt waren. Weitere Sequenzen zur Abgrenzung gegenüber anderen Gattungen wurden aus GenBank übernommen. Die auf Sequenzdaten entwickelten Primer Sp3 und Sp4 wurden empirisch an 384 Stämmen aus insgesamt 17 Gattungen auf ihre Spezifität getestet. Zusätzlich wurden in Testreihen die PCR Bedingungen optimiert. Hierfür

wurde genomische DNA von *N. asteroides* DSM 43757 in den Verdünnungen von 1 pg/µl, 0,1 pg/µl, 100 fg/µl und 10 fg/µl verwendet.

2.3.9 Restriktionsanalyse des 16S-23S rDNA Spacers

Das RFLP-Schema wurde basierend auf den kompletten 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen entwickelt. Dazu wurden alle Sequenzen mit Hilfe der DNASIS for Windows Software (Version 2.5, Hitachi Software 1994-1997) auf Schnittstellen mit ca. 100 Restriktionsenzymen untersucht. Die erfassten Schnittstellen wurden tabellarisch ausgewertet und die für deutliche RFLP-Muster geeigneten Enzyme ausgewählt. Die so ermittelten RFLP-Muster wurden experimentell überprüft und um Muster nicht sequenzierter Keime ergänzt.
Für die Evaluation des Verfahrens wurden 128 Stämme der Gattung *Nocardia* aus 26 Spezies und 17 als *Nocardia species* identifizierte Stämme mit Hilfe der Primer Sp3 und Sp4 amplifiziert. Anschließend wurden jeweils 8,8 µl des PCR-Produktes mit 0,2 µl (2 Units) der Enzyme *Mva*I (Sigma R1632), *Msp*I (Sigma 4506), *Dde*I (Promega R629A) und *Hae*III (Sigma R5628) und 1 µl des dazugehörenden Puffers (SH-Puffer, Sigma, B 3657, SL-Puffer, Sigma, B3782, D-Puffer, Promega, R004A und SM-Puffer, Sigma, B 3158) versetzt. Zum enzymatischen Verdau wurden die Ansätze bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch die Zugabe von 3,5 µl Loadingbuffer beendet.
Für das RFLP-Gel wurde eine hochauflösende 4,0%-ige Small Agarose (Biozym, 870073) in 1x TBE-Puffer verwendet. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden in die Geltaschen der mit Ethidiumbromid versetzten Agarose pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine 100-bp-Leiter verwendet. Die PCR-Produkte wurden im Gel ca. 1-2 Stunden bei 65 V aufgetrennt. Das Gel wurde auf einen Transilluminator gelegt und mit einem Polaroidbild für die anschließende Auswertung dokumentiert.
Die Fragmentgröße von nicht sequenzierten PCR-Produkten wurde visuell ohne die Verwendung von computergestützten Programmen durch Vergleich mit der 100-bp-Leiter und bekannten Fragmentgrößen ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Morphologische und biochemische Identifizierung der *Nocardia*-Isolate

Makroskopisch bildeten die *Nocardia* Stämme eine vielfältige Morphologie der angewachsenen Kolonien mit unterschiedlich ausgeprägtem Luftmyzel aus. Selbst innerhalb einer Spezies traten unterschiedliche Erscheinungsformen auf. So wiesen z.B. die Stämme DSM 43289 und DSM 43669 der Spezies *N. farcinica* weiße Kolonien auf, während die restlichen Vertreter dieser Spezies orange Kolonien ausbildeten. Auch innerhalb eines Stammes kam es zum Auftreten unterschiedlicher Kolonieformen. So konnten bei *N. flavorosea* DSM 44480(T) sowohl weiße als auch rosa Kolonieformen isoliert werden. Von beiden Kulturvarianten wurde das 16S rDNA Gen wie im Kapitel 2.3.5 beschrieben sequenziert und diese der Spezies *Nocardia flavorosea* zugeordnet.

Im Lysozymtest wiesen alle Nocardien eine Resistenz gegenüber dem Enzym Lysozym auf. Diese Resistenz konnte aber auch bei den 4 untersuchten Vertretern der Gattung *Tsukamurella* festgestellt werden.

Mit Hilfe der Hydrolysetests ließen sich Spezies-Gruppen wie im Kapitel 2.2 beschrieben voneinander abgrenzen. Eine Differenzierung zwischen hydrolysenegativen Spezies, wie z.B. *N. asteroides, N. abscessus, N. carnea, N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. flavorosea, N. nova* und *N. paucivorans,* war aber erwartungsgemäß nicht möglich. Aber auch in der Spezies *N. brasiliensis* kam es zu einer Abweichung gegenüber den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. So verhielt sich *N. brasiliensis* DSM 43009 Tyrosin und Casein negativ. Eine eindeutige Zuordnung dieses Keimes zu der Spezies *N. brasiliensis* konnte aber mittels 16S rDNA Analyse erreicht werden.

Die Ergebnisse der untersuchten phänotypischen Merkmale (Wachstum bei 45°C, Hydrolyse von Harnstoff, Assimilation von Kohlenhydraten und Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Antibiotika) sind in folgender Tabelle 4 dargestellt. Die Auswertung der Stoffwechselleistung im Api ID32 erwies sich insgesamt als schwierig, weil eine Beurteilung des Wachstums bei den meisten Reaktionen wegen zu geringen Wachstums nicht eindeutig möglich war. Deshalb wurden nur die Ergebnisse der in der Tabelle 4 dargestellten 4 Reaktionen, bei denen eine Ablesung des Ergebnisses eindeutiger war, aufgeführt.

Im Gegensatz dazu konnten die in der Literatur beschriebenen Muster der Antibiotikaempfindlichkeit eindeutig wiedergefunden werden. Insbesondere bestätigten die Ergebnisse, dass die Muster V und IV, eine Spezifität für die Spezies *N. farcinica*

(Piperacillin-, Cefotaxim- und Tobramycinresistenz) und *N. cyriacigeorgica* (Ampicillin- und Ciprofloxacinresistenz) aufweisen. In anderen Spezies tritt diese eindeutige Spezifität nicht immer auf. Einerseits trat Muster I in *N. asteroides* als auch in *N. abscessus* auf, andererseits waren die Muster I, II und III nicht bei allen Vertretern der jeweiligen Spezies aufzufinden.

Die sehr einfach durchzuführenden Reaktionen des Wachstums bei 45 °C und der Harnstoffspaltung erwiesen sich als eindeutig beurteilbar und als orientierende Hilfe für die Zuordnung einer *Nocardia* zu bestimmten Speziesgruppen.

Tabelle 4: Phänotypische Eigenschaften von 42 *Nocardia* Stämmen, die nicht durch die Hydrolyse von Casein, Hypoxanthin, Tyrosin oder Xanthin differenziert werden können. Erläuterungen zu den Genotypen siehe Kap. 2.3.5 und 3.2.3. Zeichenerklärung: -: negativ, (+): schwach positiv, +: positiv, v: variable Test Ergebnisse.

Spezies	Genotyp	Anzahl der untersuchten Stämme	Wachstum bei 45°C	Hydrolyse von Harnstoff	Api ID32 C Reaktion[1]				Empfindlichkeit gegenüber[2]							Biotyp[3]
					ACT	GLY	GNT	LVT	PIP	AMP	ERY	IMI	CIP	CTX	NN	
N. abscessus		3	-	+	+	+	-	-	+	+	-	v	-	+	+	I
N. asteroides	I	2	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
	II	1	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	I
	III	1	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	
N. carnea	I	2	-	-	v	v	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
	II	2	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	II
	III	1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
N. cyriacigeorgica	I	4	+	-	v	v	+	+	-	-	-	+	-	+	+	VI
	II	6	+	-	v	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	VI
N. farcinica	I	1	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	V
	II	1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	V
N. flavorosea		1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
N. nova	I	5	v	v	+	v	-	+	-	+	+	+	-	v	v	III
	II	1	(+)	(+)	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
	III	1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	III
	IV	1	(+)	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	III
	V	1	(+)	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	III
N. paucivorans		2	+	-	-	v	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
N. sp. DSM 43253 DSM 43263		2	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	II
N. sp. DSM 43576		1	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
N. sp. DSM 43254		1	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	II
N. sp. DSM 43260 DSM 43261		2	v	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	II

[1] ACT: Actidion (Cycloheximid), GLY: Glycerol, GNT: Gluconat, LVT: Levulinat. [2] AMP: Ampicillin, CIP: Ciprofloxacin, CTX: Cefotaxim, ERY: Erythromycin, IMI: Imipenem, NN: Tobramycin, PIP: Piperacillin. [3] Biotyp nach Wallace et al. 1988a.

3.2 Analysen der 16S rDNA

3.2.1 PCR der 16S rDNA

Die Ergebnisse der PCR Ansätze nach Behandlung mit 8-Methoxypsoralen oder mit Restriktionsenzymen sind in der Abbildung 2 dargestellt. Die Zugabe von 8-Methoxypsoralen und anschließende Bestrahlung mit UV- Licht hatte generell eine Hemmung der PCR zur Folge, verhinderte aber nicht die Amplifikation kontaminierender bakterieller DNA in der negativen Kontrolle. Bessere Ergebnisse wurden unter dem Einsatz des Restriktionsenzyms *Hae*III erreicht. Wie erwünscht konnte hier die Kontamination durch bakterielle DNA verhindert werden.

Durch die Anpassung der Primer auf die Sequenz der Nocardien (vgl. 2.3.2, Tabelle 2) und eine daraus resultierende Erhöhung der Annealingtemperatur ließ sich die Amplifikation kontaminierender Fremd-DNA in der PCR auch verhindern, was den erfolgreichen aber auch zeitaufwendigen Einsatz des Enzyms *Hae*III überflüssig machte. Zusätzlich konnte durch die Verwendung der Polymerase DyNAzyme EXT (FINNZYMES, F505S) eine Verbesserung der Amplifikation erreicht werden, weil mit diesem Enzym deutlich stärkere PCR-Produkte generiert werden konnten.

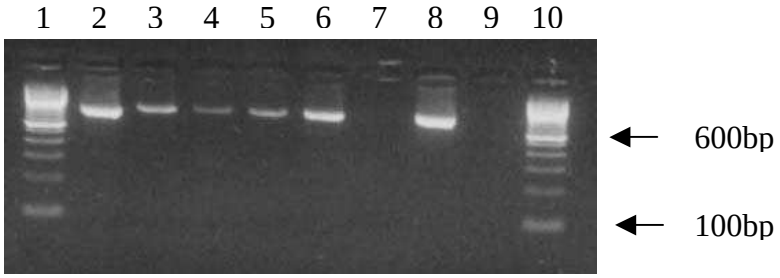

Abbildung 2: Agarosegelelektrophorese von Eu 4/5 PCR-Produkten. Bahnen 1 und 10: 100-bp-Leiter, Bahn 2: Amplifikation von 1 pg genomischer DNA von *N. asteroides* DSM 43757 unter Verwendung der nicht modifizierten Primer Eu 4/5, Bahn 3: keine DNA-Zugabe (negative Kontrolle) unter Verwendung der nicht modifizierten Primer Eu 4 /5, Bahnen 4 und 5: wie Bahn 2 und 3 aber nach vorangehender Behandlung mit 8-Methoxypsoralen, Bahnen 6 und 7: wie Bahn 2 und 3 aber nach vorangehender Behandlungen mit *Hae*III, Bahnen 8 und 9: Verwendung der modifizierten Primer Eu 4b / 5b.

Die Größe der PCR-Produkte im Gel beträgt für das Eu4b/5b Amplifikat 895 bp und für das Eu7rv/Eu1 Amplifikat 761 bzw. 763 bp.

3.2.2 Sequenzierung der 16S rDNA

Die annähernd kompletten 16S rDNA Sequenzen, die in dieser Arbeit von 63 Nocardienstämmen bestimmt wurden, beginnen bei Position 28[1] und enden direkt am Spacer und weisen eine Länge von 1492 bzw. 1494 bp. auf. Die Differenz resultiert aus zwei jeweils eine Base umfassende Deletionen an Position 1451[1] und 1458[1] bei 32 Spezies der Gattung *Nocardia*. Die Sequenzen von *N. fluminea* DSM 44489 und *N. asteroides* DSM 43258 wiesen trotz mehrfacher Sequenzierungen nicht eindeutig zuordenbare Basen auf. Insbesondere bei *N. fluminea* muss von einer Verunreinigung der Kultur ausgegangen werden, da die unleserlichen Bereiche für Interoperonvariabilität zu hoch erscheinen.

Die erarbeiteten Sequenzen wurden in GenBank eingereicht. Die von GenBank generierten Accession-Nr. sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: 54 in GenBank eingereichte 16S rDNA Sequenzen aus 26 Spezies der Gattung *Nocardia* und einer Spezies der Gattung *Rhodococcus* mit den zugehörigen Accession-Nr. DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland; JCM, Japanese Collection of Microorganisms, Hirosawa, Wako-shi, Japan; S, Stammsammlung, Institut für Mikrobiologie, Lungenklinik Heckeshorn, Berlin, Deutschland; T: type strain

Spezies	Stämme (komplett sequenziert)	16S rDNA Genotyp	GenBank Accession-Nr.	Stämme mit identischer kompletter oder partieller 16S rDNA Sequenz
N. abscessus	JCM 6043		AF430018	DSM 44432^T, DSM 44557
N. africana	DSM 44491^T		AF430054	DSM 44500, DSM 44501, DSM 44502
N. asteroides	DSM 43757^T	I	AF430019	S546
N. asteroides	DSM 43258	II	AF430025	
N. asteroides	DSM 43255	III	AF430026	
N. brasiliensis	DSM 43758^T		AF430038	DSM 46059, DSM 46032, DSM 43009, S690
N. brevicatena	DSM 43024^T		AF430040	
N. carnea	DSM 43397^T	I	AF430035	DSM 46055
N. carnea	DSM 44558	II	AF430036	S562
N. carnea	DSM 46071	III	AF430037	
N. corynebacterioides	DSM 20151^T		AF430066	
N. crassostreae	JCM 10500^T		AF430049	
N. cummidelens	DSM 44490^T		AF430052	DSM 46002,
N. cyriacigeorgica	DSM 43208	I	AF430027	DSM 44484^T, S284, S297 S739, S71, S883, S104
N. cyriacigeorgica	DSM 43005	II	AF430020	DSM 40350, DSM 43004, DSM 46058, S328, S750, S 969, S64
N. farcinica	DSM 43665^T	I	AF430033	DSM 43289, DSM 43131, DSM 43063, DSM 43669, DSM 46005, DSM 43133, DSM 43298, DSM 43244, DSM 46004, DSM 43668, DSM 43006, S308, S752,

[1] bezogen auf Escherichia coli (NC 002695), (Edwards et al. 1989)

Fortsetzung Tabelle 5:

Spezies	Stämme (komplett sequenziert)	16S rDNA Genotyp	GenBank Accession-Nr.	Stämme mit identischer kompletter oder partieller 16S rDNA Sequenz
				S300, S327, S746, S747
N. farcinica	DSM 44562	II	AF430034	
N. flavorosea	JCM 3342^T		AF430048	DSM 44480T
N. fluminea	DSM 44489^T		AF430053	
N. globerula	DSM 46019		AF430065	
N. nova	JCM 6044^T	I	AF430028	DSM 44481T DSM 43207, DSM 43209, DSM 43843, DSM 44559, S558
N. nova	DSM 44561	II	AF430030	S301, S557
N. nova	DSM 44560	III	AF430029	
N. nova	DSM 43256	IV	AF430031	
N. nova	DSM 40806	V	AF430032	
N. otitidiscaviarum	DSM 43242^T	I	AF430067	DSM 46057, DSM 46009, DSM 43400, DSM 43010, DSM 43398
N. otitidiscaviarum	DSM 44565	II	AF430068	DSM 46056, S666, S877
N. paucivorans	DSM 44563		AF430041	DSM 44386^T, S896, S67, S878
N. pseudobrasiliensis	DSM 44290^T	I	AF430042	
N. pseudobrasiliensis	JCM 9883	II	AF430043	
N. pseudovaccinii	DSM 43406^T		AF430046	
N. salmonicida	DSM 40472^T		AF430050	DSM 6250
N. seriolae	DSM 44129^T		AF430039	
N. soli	DSM 44488		AF430051	
N. sp.	ATCC 49872		AY155203	
N. sp.	DSM 43301		AF430056	DSM 43132
N. sp.	DSM 43395		AF430057	
N. sp.	DSM 43253		AF430021	DSM 43263
N. sp.	DSM 43576		AF430022	
N. sp.	DSM 43254		AF430023	
N. sp.	DSM 43260		AF430024	DSM 43261
N. sp.	DSM 43399		AF430058	
N. sp.	DSM 40872		AF430060	
N. sp.	DSM 46070		AF430061	
N. sp.	DSM 43396		AF430062	DSM 46072
N. sp.	DSM 6249		AF430063	
N. sp.	DSM 46067		AF430064	
N. transvalensis	DSM 43405^T		AF430047	DSM 46068, DSM 43404
N. uniformis	DSM 43136^T		AF430044	DSM 43196
N. vaccinii	DSM 43285^T		AF430045	
N. veterana	DSM 44445^T	I	AF430055	S 756
N. veterana	DSM 40777	II	AF430059	DSM 43300
N. veterana	DSM 43557	III	AF490540	
R. equi	DSM 20307^T		AF490539	

3.2.3 Phylogenetische Auswertung der 16S rDNA Sequenzdaten

Basierend auf dem gewonnenen Alignment wurde mit der TREECON for Windows Software (Version 1.3, Yves Van de Peer, Universität Konstanz, Deutschland, Van de Peer et al. 1994, Van de Peer et al. 1997) der im Folgenden dargestellte phylogenetische Stammbaum ermittelt.

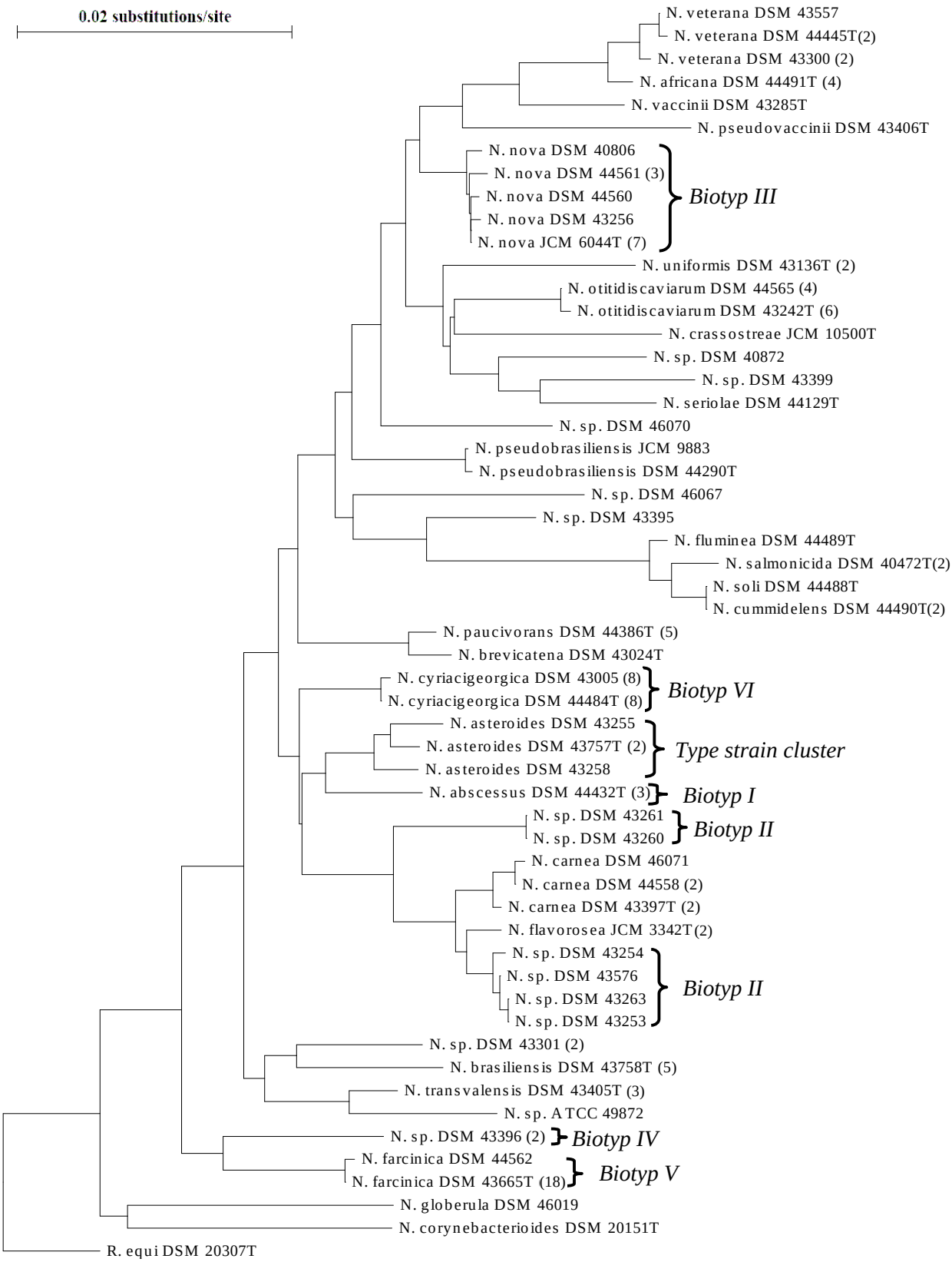

Abbildung 3: Phylogenetischer Baum erstellt aus 54 annähernd kompletten 16S rDNA Sequenzen (1494 bzw. 1492bp) von 26 anerkannten Spezies der Gattung *Nocardia* und 14 *Nocardia species* Stämmen. Als Wurzel für den phylogenetischen Baum wurde *Rhodococcus equi* DSM 20307T verwendet. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Stämme mit identischer (z.T. partieller) Sequenz an. Die Bezeichnung der Stämme bezieht sich auf die aus der Arbeit resultierende Reklassifizierung (Roth et al. 2003). Angabe der Biotypen nach Wallace et al. 1988a. Der Maßstab repräsentiert 2 bp Abweichung auf 100 bp.

Sowohl aus dem phylogenetischen Baum als auch aus der Distance Matrix (Tabelle 6) geht hervor, dass die Interspeziesheterogenität zwischen nah verwandten *Nocardia* Spezies sehr gering ist. Die höchste 16S rDNA Übereinstimmung wurde zwischen den Spezies *N. paucivorans* und *N. brevicatena* festgestellt (99,5% bzw. 7 Basenunterschiede). Zusätzlich wiesen die beiden Spezies *N. cummidelens* DSM 44490T und *N. soli* DSM 44488T über 1494 bp die identische Sequenz auf. Dies steht allerdings im Widerspruch zu der in GenBank eingereichten Sequenz von *N. soli* (AF277223, Maldonado et al. 2000) und lässt einen Fehler in der Kultur vermuten. Der maximale Abstand zwischen zwei Spezies beträgt 5,9%, dies sind *N. corynebacterioides* DSM 20151T und *N. salmonicida* DSM 40472T. Dieser Abstand ist bereits größer als der zwischen *N. abscessus* DSM 44432T und dem zur Gattung *Rhodococcus* gehörende *R. equi* DSM 20307T, der 2,8 % beträgt.

Zusätzlich wurde bei 8 medizinisch relevanten Spezies Intraspeziesvariabilität festgestellt, die zwischen einem und vier Basenunterschieden liegt. So wurden in den Spezies *N. otitidiscaviarum*, *N. cyriacigeorgica*, *N. pseudobrasiliensis* und *N. farcinica* jeweils zwei Genotypen, die sich in einem Basenpaar unterscheiden, gefunden. In der Spezies *N. nova* wurden insgesamt fünf Genotypen charakterisiert. Während Genotyp II und III sich nur um eine Base zum Typusstamm unterscheiden, weisen die Genotypen IV und V zwei Basenunterschiede auf. Auch in der Spezies *N. carnea* wurden 3 Genotypen mit 3 bzw. 4 Basenunterschieden und in der Spezies *N. veterana* drei Genotypen mit 1 bzw. 3 Basenunterschieden in der Primärstruktur der 16S rDNA gefunden.

Eine deutlich höhere Intraspeziesvariabilität wurde in der Spezies *N. asteroides* festgestellt. So wiesen die Stämme *N. asteroides* DSM 43255 und *N. asteroides* DSM 43258 8 bzw. 12 Basenunterschiede zum Typusstamm auf.

In zwei Fällen wurde Interoperonvariabilität in der 16S rDNA erkennbar. Diese konnte durch unleserliche Sequenzen festgestellt werden, wie sie auch schon von Mellmann et al. 2003 für *N. ignorata* beschrieben wurden. In beiden Fällen konnte die Interoperonvariabilität durch die Klonierung des ITS1 / ITS5 PCR-Produktes am Ende der 16S rDNA eindeutig identifiziert werden. So wurde bei *N. farcinica* DSM 43289 bei Position 1451[1] in einem von drei Operons ein T anstelle von einem C und bei *N. brasiliensis* DSM 46059 bei Position 1527[1] in einem von zwei Operons ein T anstelle von einem C aufgefunden. Von diesen beiden Keimen wurde jeweils nur ein 16S rDNA-Operon in GenBank eingereicht.

[1] bezogen auf Escherichia coli (NC 002695), (Edwards et al. 1989)

Im Gegensatz zu der 16S rDNA wurde in den ersten 210 bp der mitsequenzierten 23S rDNA in mehreren Fällen Interoperonvariabilität ersichtlich. Während *N. globerula* DSM 46019, *N. nova* JCM 6044 und *N. uniformis* DSM 43136 sogar zwei Basenunterschiede zwischen ihren Operons aufwiesen, besaßen 9 weitere Stämme Interoperonvariabilität im Umfang von einer Base in dem sequenzierten Bereich des 23S rDNA Gens.

Zur Veranschaulichung der prozentualen Übereinstimmung in der 16S rDNA zwischen den sequenzierten Typusstämmen der Gattung *Nocardia* ist im Folgenden die zugehörige Distance Matrix unter Einsatz von DNADIST (Version 3.5c, J. Felsenstein, University of Washington, USA, Felsenstein 1981) unter Berücksichtigung von Insertionen und Deletionen dargestellt.

Tabelle 6: Distance Matrix der 16S rDNA Sequenzen von den sequenzierten Typusstämmen der Gattung *Nocardia*

	N. abscessus	*N. africana*	*N. asteroides*	*N. brasiliensis*	*N. brevicatena*	*N. carnea*	*N. corynebacterioides*	*N. cummidelens*	*N. crassostreae*	*N. cyriacigeorgica*	*N. farcinica*	*N. flavorosea*	*N. fluminea*	*N. globerula*	*N. nova*	*N. otitidiscaviarum*	*N. paucivorans*	*N. pseudobrasiliensis*	*N. pseudovaccinii*	*N. salmonicida*	*N. seriolae*	*N. soli*	*N. transvalensis*	*N. uniformis*	*N. vaccinii*	*N. veterana*
N. abscessus	0	0,032	0,010	0,019	0,016	0,018	0,044	0,032	0,033	0,011	0,016	0,021	0,028	0,041	0,026	0,030	0,018	0,025	0,035	0,029	0,033	0,032	0,020	0,030	0,030	0,032
N. africana	0,032	0	0,031	0,033	0,028	0,036	0,036	0,046	0,029	0,028	0,024	0,036	0,043	0,039	0,016	0,022	0,026	0,031	0,029	0,049	0,030	0,046	0,020	0,031	0,013	0,006
N. asteroides	0,010	0,031	0	0,022	0,022	0,020	0,046	0,026	0,032	0,015	0,022	0,023	0,027	0,049	0,024	0,031	0,023	0,020	0,027	0,026	0,032	0,026	0,025	0,032	0,028	0,032
N. brasiliensis	0,019	0,033	0,022	0	0,032	0,030	0,043	0,037	0,033	0,020	0,018	0,032	0,032	0,051	0,032	0,037	0,033	0,027	0,038	0,036	0,037	0,037	0,023	0,037	0,039	0,034
N. brevicatena	0,016	0,028	0,022	0,032	0	0,018	0,046	0,040	0,033	0,016	0,031	0,016	0,037	0,042	0,025	0,027	0,005	0,023	0,033	0,039	0,028	0,040	0,027	0,030	0,022	0,030
N. carnea	0,018	0,036	0,020	0,030	0,018	0	0,053	0,040	0,037	0,016	0,032	0,007	0,037	0,054	0,032	0,034	0,020	0,027	0,037	0,037	0,034	0,040	0,031	0,037	0,032	0,039
N. corynebacterioides	0,044	0,036	0,046	0,043	0,046	0,053	0	0,056	0,050	0,046	0,035	0,054	0,055	0,034	0,041	0,045	0,047	0,046	0,044	0,059	0,046	0,056	0,045	0,051	0,039	0,039
N. cummidelens	0,032	0,046	0,026	0,037	0,040	0,040	0,056	0	0,044	0,034	0,042	0,043	0,005	0,057	0,033	0,042	0,038	0,029	0,039	0,005	0,041	0,000	0,039	0,038	0,044	0,047
N. crassostreae	0,033	0,029	0,032	0,033	0,033	0,037	0,050	0,044	0	0,026	0,039	0,035	0,041	0,047	0,021	0,021	0,032	0,024	0,034	0,047	0,025	0,044	0,030	0,030	0,032	0,034
N. cyriacigeorgica	0,011	0,028	0,015	0,020	0,016	0,016	0,046	0,034	0,026	0	0,018	0,015	0,029	0,046	0,020	0,023	0,014	0,020	0,034	0,032	0,029	0,034	0,020	0,027	0,028	0,029
N. farcinica	0,016	0,024	0,022	0,018	0,031	0,032	0,035	0,042	0,039	0,018	0	0,030	0,037	0,038	0,035	0,039	0,029	0,036	0,038	0,041	0,042	0,042	0,020	0,042	0,032	0,025
N. flavorosea	0,021	0,036	0,023	0,032	0,016	0,007	0,054	0,043	0,035	0,015	0,030	0	0,037	0,049	0,030	0,032	0,018	0,030	0,038	0,042	0,034	0,043	0,030	0,039	0,033	0,037
N. fluminea	0,028	0,043	0,027	0,032	0,037	0,037	0,055	0,005	0,041	0,029	0,037	0,037	0	0,053	0,030	0,039	0,037	0,032	0,041	0,006	0,037	0,005	0,036	0,035	0,042	0,044
N. globerula	0,041	0,039	0,049	0,051	0,042	0,054	0,034	0,057	0,047	0,046	0,038	0,049	0,053	0	0,038	0,044	0,041	0,049	0,047	0,058	0,041	0,057	0,049	0,045	0,036	0,044
N. nova	0,026	0,016	0,024	0,032	0,025	0,032	0,041	0,033	0,021	0,020	0,035	0,030	0,030	0,038	0	0,015	0,021	0,017	0,023	0,035	0,022	0,033	0,025	0,020	0,018	0,019
N. otitidiscaviarum	0,030	0,022	0,031	0,037	0,027	0,034	0,045	0,042	0,021	0,023	0,039	0,032	0,039	0,044	0,015	0	0,024	0,020	0,032	0,045	0,019	0,042	0,031	0,019	0,025	0,023
N. paucivorans	0,018	0,026	0,023	0,033	0,005	0,020	0,047	0,038	0,032	0,014	0,029	0,018	0,037	0,041	0,021	0,024	0	0,022	0,032	0,039	0,027	0,038	0,026	0,028	0,021	0,028
N. pseudobrasiliensis	0,025	0,031	0,020	0,027	0,023	0,027	0,046	0,029	0,024	0,020	0,036	0,030	0,032	0,049	0,017	0,020	0,022	0	0,027	0,033	0,028	0,029	0,030	0,024	0,029	0,032
N. pseudovaccinii	0,035	0,029	0,027	0,038	0,033	0,037	0,044	0,039	0,034	0,034	0,038	0,038	0,041	0,047	0,023	0,032	0,032	0,027	0	0,042	0,032	0,039	0,036	0,034	0,023	0,029
N. salmonicida	0,029	0,049	0,026	0,036	0,039	0,037	0,059	0,005	0,047	0,032	0,041	0,042	0,006	0,058	0,035	0,045	0,039	0,033	0,042	0	0,043	0,005	0,040	0,038	0,044	0,051
N. seriolae	0,033	0,030	0,032	0,037	0,028	0,034	0,046	0,041	0,025	0,029	0,042	0,034	0,037	0,041	0,022	0,019	0,027	0,028	0,032	0,043	0	0,041	0,038	0,027	0,025	0,034
N. soli	0,032	0,046	0,026	0,037	0,040	0,040	0,056	0,000	0,044	0,034	0,042	0,043	0,005	0,057	0,033	0,042	0,038	0,029	0,039	0,005	0,041	0	0,039	0,038	0,044	0,047
N. transvalensis	0,020	0,020	0,025	0,023	0,027	0,031	0,045	0,039	0,030	0,020	0,020	0,030	0,036	0,049	0,025	0,031	0,026	0,030	0,036	0,040	0,038	0,039	0	0,037	0,029	0,023
N. uniformis	0,030	0,031	0,032	0,037	0,030	0,037	0,051	0,038	0,030	0,027	0,042	0,039	0,035	0,045	0,020	0,019	0,028	0,024	0,034	0,038	0,027	0,038	0,037	0	0,027	0,036
N. vaccinii	0,030	0,013	0,028	0,039	0,022	0,032	0,039	0,044	0,032	0,028	0,032	0,033	0,042	0,036	0,018	0,025	0,021	0,029	0,023	0,044	0,025	0,044	0,029	0,027	0	0,018
N. veterana	0,032	0,006	0,032	0,034	0,030	0,039	0,039	0,047	0,034	0,029	0,025	0,037	0,044	0,044	0,019	0,023	0,028	0,032	0,029	0,051	0,034	0,047	0,023	0,036	0,018	0

Aus der Analyse der 16S rDNA Sequenzen wurde ersichtlich, dass 41 Referenzstämme der DSMZ falschen Spezies zugeordnet worden waren.

Tabelle 7: Bei der DSMZ in der Spezies falsch zugeordnete Referenzstämme der Gattung *Nocardia*.

Spezies	Stamm	Ursprüngliche Spezieszuordnung bei der DSMZ
N. abscessus	JCM 6043	*N. asteroides* (Biotyp I, ATCC 23824)
N. cummidelens	DSM 46002	*N. sp*
N. cyriacigeorgica	DSM 43208	*N. asteroides* (Biotyp VI, ATCC 14759)
N. cyriacigeorgica	DSM 43005	*N. sp*
N. cyriacigeorgica	DSM 40350	*N. sp*
N. cyriacigeorgica	DSM 43004	*N. asteroides*
N. cyriacigeorgica	DSM 46058	*N. brasiliensis*
N. farcinica	DSM 43289	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43131	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43063	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43298	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43244	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 46004	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43006	*N. asteroides*
N. farcinica	DSM 43133	*N. brasiliensis*
N. nova	DSM 43207	*N. asteroides*
N. nova	DSM 43209	*N. asteroides*
N. nova	DSM 43843	*N. sp.*
N. nova	DSM 43256	*N. asteroides*
N. nova	DSM 40806	*N. sp.*
N. pseudovaccinii	DSM 43406^{T}	*N. vaccinii*
N. salmonicida	DSM 6250	*N. sp.*
N. sp.	ATCC 49872	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43301	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43132	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43395	*N. brasiliensis*
N. sp.	DSM 43253	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43263	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43576	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43254	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43260	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43261	*N. asteroides*
N. sp.	DSM 43399	*N. otitidiscaviarum*
N. sp.	DSM 46070	*N. vaccinii*
N. sp.	DSM 43396	*N. carnea*
N. sp	DSM 46072	*N. carnea*
N. sp.	DSM 46067	*N. transvalensis*
N. uniformis	DSM 43196	*N. sp.*
N. veterana	DSM 43557	*N. sp.*
N. veterana	DSM 40777	*N. sp.*
N. veterana	DSM 43300	*N. sp.*

Weitere 20 bei der DSMZ als Nocardien geführt Referenzstämme mussten anderen Gattungen zugeordnet werden.

Tabelle 8: In der Gattung falsch zugeordnete Referenzstämme

Spezies	Stamm	Ursprüngliche Zuordnung bei der DSMZ
Dermatophilus congolensis	DSM 43243	*N. sp.*
Gordonia sputi	DSM 43022	*N. sp.*
Gordonia sputi	DSM 46016	*N. sp.*
Gordonia sputi	DSM 43233	*N. sp.*
Gordonia sp.	DSM 43007	*N. asteroides*
Mycobacterium farcinogenes	DSM 43294	*N. farcinica*
Mycobacterium farcinogenes	DSM 43245	*N. asteroides*
Mycobacterium farcinogenes	DSM 46028	*N. farcinica*
Mycobacterium sp.	DSM 43264	*N. asteroides*
Rhodococcus opacus	DSM 43069	*N. sp.*
Rhodococcus opacus	DSM 44000	*N. sp.*
Rhodococcus opacus	DSM 43280	*N. sp.*
Rhodococcus ruber	DSM 44319	*N. sp.*
Rhodococcus sp.	DSM 43262	*N. asteroides*
Rhodococcus sp.	DSM 43259	*N. asteroides*
Streptomyces somaliensis	DSM 43577	*N. farcinica*
Streptomyces sp.	DSM 46018	*N. sp.*
Streptomyces sp.	DSM 46017	*N. sp.*
Streptomyces sp.	DSM 43112	*N. sp.*
Streptomyces sp.	DSM 43191	*N. sp.*

Alle Stämme wurden zwischenzeitlich bei der DSMZ basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit reklassifiziert. Zusätzlich wurden folgende klinische Isolate aus der vorliegenden Arbeit als Referenzstämme in der DSMZ aufgenommen:

Tabelle 9: Klinische Isolate, die aus der vorliegenden Arbeit neu bei der DSMZ als Referenzstämme aufgenommen wurden.

Spezies	Neue Stammnummer	GenBank Accession-Nr.
N. abscessus	DSM 44557	AF430018
N. carnea	DSM 44558	AF430036
N. nova	DSM 44559	AF430028
N. nova	DSM 44560	AF430029
N. nova	DSM 44561	AF430030
N. farcinica	DSM 44562	AF430034
N. paucivorans	DSM 44563	AF430041
N. otitididscaviarum	DSM 44565	AF430068

3.3 Analysen des 16S-23S rDNA Spacers

3.3.1 Amplifizierung und Sequenzierung des 16S-23S rDNA Spacers

Die Produktgröße der ITS 1/5 Amplifikate im Gel variierten zwischen 637 bp bei *N. sp.* DSM 43301 und 714 bp bei *N. farcinica* DSM 43244. Schon die Analyse der PCR-Produkte im Gel ließ eine hohe Intraspeziesvariabilität aufgrund der Differenzen der Produktlängen innerhalb einer Spezies erkennen. So variierten die PCR-Produkte in der Spezies *N. farcinica* zwischen 674 bp (DSM 43063) und 714bp (DSM 43244).

Neben den unterschiedlichen Produktgrößen wurde im Gel das Auftreten von verschieden großen Operons in einem Stamm durch Doppelbanden bei der Mehrzahl der Amplifikate erkennbar. So konnte bei *N. farcinica* DSM 43063 sowohl eine 701 bp als auch eine 674 bp große Bande im Gel festgestellt werden.

Diese Ergebnisse konnten durch Sequenzierungen unklonierter ITS1/5 Produkte bestätigt werden. 22 Keime wurden sowohl forward als auch reverse direkt sequenziert. Sechszehn dieser Sequenzen waren aufgrund von Doppelsignalen unleserlich und ließen somit auf eine hohe Interoperon Variabilität schließen. Zwei Sequenzen besaßen nur wenige Doppelsignale (*N. carnea* (DSM 44558) und *N. nova* (DSM 44560)), während die Sequenzen von *N. paucivorans* (DSM 44563), *N. pseudobrasiliensis* (DSM 44290 T), *N. africana* (DSM 44491 T) und *N. nova* (DSM 44561) keine Doppelsignale aufwiesen.

Insgesamt wurden die ITS1/5 Amplifikate von 52 Stämmen der Gattung *Nocardia* und 6 Stämme nah verwandter Gattungen kloniert. Davon wurden mittels anschließender ITS1/5 PCR und Restriktionsenzym-Verdau 928 Einzelkolonien gescreent. Auch nach dem Einsatz von vier Enzymen ließen sich bei drei Stämmen (*N. farcinica* II DSM 44562, *N. brevicatena* DSM 43024 T und *N. vaccinii* DSM 43285 T) keine unterschiedlichen Operons mittels Screening charakterisieren. In diesem Fall wurden 16 willkürlich ausgewählte Klone sequenziert.

3.3.2 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen

Insgesamt wurden 104 Klone von 22 verschieden *Nocardia* Spezies und 27 Klone von 13 Spezies aus vier nah verwandten Gattungen mit den Primern ITS1/5 sequenziert. Die zu der 16S und 23S rDNA gehörenden Sequenzbereiche wurden gelöscht und die kompletten Spacersequenzen in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) eingereicht. Die eingereichten Sequenzen sind in der folgenden Tabelle 10 mit der GenBank „Accession“ Nummern dargestellt. Die Bezeichnung der Operons basiert auf dem in Abbildung 4 dargestellten phylogenetischen Baum der 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen.

Tabelle 10: 131 in GenBank eingereichte 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen aus 22 Spezies der Gattung *Nocardia*, davon 12 Stämmen, die als *N. sp*. klassifiziert worden waren und 13 Spezies aus vier nah verwandten Gattungen mit den zugehörigen Accession-Nr.

Spezies	Stamm	16S-23S ITS		16S rDNA	
		Operon	GenBank Accession-Nr.	Genotyp	GenBank Accession-Nr.
N. abscessus	DSM 44557	rrnA	AF536387		AF430018
N. abscessus	DSM 44557	rrnB	AF536388		AF430018
N. abscessus	DSM 44557	rrnC	AF536389		AF430018
N. abscessus	JCM 6043T	rrnA	AF536390		AF430018
N. abscessus	JCM 6043T	rrnB	AF536391		AF430018
N. africana	DSM 44491T		AF536392		AF430054
N. asteroides	DSM 43757T	rrnA	AF536394	I	AF430019
N. asteroides	DSM 43757T	rrnB	AF536393	I	AF430019
N. asteroides	DSM 43757T	rrnC	AF536395	I	AF430019
N. asteroides	S546	rrnA	AF536396	I	AF430019
N. asteroides	S546	rrnB	AF536397	I	AF430019
N. asteroides	S546	rrnC	AF536398	I	AF430019
N. asteroides	S546	rrnD	AF536399	I	AF430019
N. brasiliensis	DSM 43009	rrnA	AF536400		AF430038
N. brasiliensis	DSM 43009	rrnB	AF536401		AF430038
N. brasiliensis	DSM 43758T	rrnA	AF536402		AF430038
N. brasiliensis	DSM 43758T	rrnB	AF536403		AF430038
N. brasiliensis	DSM 43758T	rrnC	AF536404		AF430038
N. brasiliensis	DSM 46059	rrnA	AF536405		AF430038
N. brasiliensis	DSM 46059	rrnB	AF536406		AF430038
N. brevicatena	DSM 43024T	rrnA	AF536407		AF430040
N. carnea	DSM 43397T	rrnA	AF536408	I	AF430035
N. carnea	DSM 44558	rrnA	AF536409	II	AF430036
N. carnea	DSM 44558	rrnB	AF536410	II	AF430036
N. carnea	DSM 44558	rrnC	AF536411	II	AF430036
N. carnea	DSM 44558	rrnD	AF536412	II	AF430036
N. carnea	DSM 44558	rrnE	AF536413	II	AF430036
N. corynebacterioides	DSM 20151T	rrnA	AF536414		AF430066
N. corynebacterioides	DSM 20151T	rrnB	AF536415		AF430066
N. corynebacterioides	DSM 20151T	rrnC	AF536416		AF430066
N. corynebacterioides	DSM 20151T	rrnD	AF536417		AF430066
N. crassostreae	JCM 10500T	rrnA	AF536418		AF430049
N. crassostreae	JCM 10500T	rrnB	AF536419		AF430049
N. cyriacigeorgica	DSM 43208	rrnA	AF536420	I	AF430027
N. cyriacigeorgica	DSM 43208	rrnB	AF536421	I	AF430027
N. cyriacigeorgica	DSM 40350	rrnA	AF536423	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	DSM 40350	rrnB	AF536422	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	DSM 43005	rrnA	AF536424	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	DSM 43005	rrnB	AF536425	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	S328	rrnA	AF536426	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	S328	rrnB	AF536427	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	S328	rrnC	AF536428	II	AF430020
N. cyriacigeorgica	S284	rrnA	AF536429	I	AF430027
N. cyriacigeorgica	S284	rrnB	AF536430	I	AF430027

Fortsetzung Tabelle 10:

Spezies	Stamm	16S-23S ITS		16S rDNA	
		Operon	GenBank Accession-Nr.	Genotyp	GenBank Accession-Nr.
N. cyriacigeorgica	S297	rrnA	AF536431	I	AF430027
N. cyriacigeorgica	S297	rrnB	AF536432	I	AF430027
N. farcinica	DSM 43063	rrnA	AF536433	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43063	rrnB	AF536434	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43131	rrnA	AF536437	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43131	rrnB	AF536436	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43131	rrnC	AF536435	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43244	rrnA	AF536440	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43244	rrnB	AF536439	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43244	rrnC	AF536438	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43289	rrnA	AF536443	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43289	rrnB	AF536442	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43289	rrnC	AF536441	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43298	rrnA	AF536444	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43665T	rrnA	AF536445	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43665T	rrnB	AF536446	I	AF430033
N. farcinica	DSM 43668	rrnA	AF536447	I	AF430033
N. farcinica	DSM 44562	rrnA	AF536448	II	AF430034
N. flavorosea	JCM 3342T	rrnA	AF536449		AF430048
N. flavorosea	JCM 3342T	rrnB	AF536450		AF430048
N. globerula	DSM 46019	rrnA	AF536451		AF430065
N. globerula	DSM 46019	rrnB	AF536452		AF430065
N. globerula	DSM 46019	rrnC	AF536453		AF430065
N. globerula	DSM 46019	rrnD	AF536454		AF430065
N. nova	JCM 6044T	rrnA	AF536455	I	AF430028
N. nova	JCM 6044T	rrnB	AF536456	I	AF430028
N. nova	JCM 6044T	rrnC	AF536457	I	AF430028
N. nova	S558	rrnA	AF536458	I	AF430028
N. nova	S558	rrnB	AF536459	I	AF430028
N. nova	DSM 44561		AF536460	II	AF430030
N. nova	S557	rrnA	AF536461	II	AF430030
N. nova	S557	rrnB	AF536462	II	AF430030
N. nova	DSM 44560	rrnA	AF536463	III	AF430029
N. nova	DSM 44560	rrnB	AF536464	III	AF430029
N. otitidiscaviarum	DSM 43242T	rrnA	AF536465	I	AF430067
N. otitidiscaviarum	DSM 43242T	rrnB	AF536466	I	AF430067
N. otitidiscaviarum	DSM 43398	rrnA	AF536467	I	AF430067
N. otitidiscaviarum	DSM 43398	rrnB	AF536468	I	AF430067
N. otitidiscaviarum	DSM 44565	rrnA	AF536469	II	AF430068
N. paucivorans	DSM 44563T		AF536470		AF430041
N. pseudobrasiliensis	DSM 44290T		AF536471	I	AF430042
N. salmonicida	DSM 40472T	rrnA	AF536472		AF430050
N. salmonicida	DSM 40472T	rrnB	AF536473		AF430050
N. seriolae	DSM 44129T	rrnA	AF536474		AF430039
N. seriolae	DSM 44129T	rrnB	AF536475		AF430039
N. sp.	DSM 43253	rrnA	AF536476		AF430021
N. sp.	DSM 43301	rrnA	AF536477		AF430056

Fortsetzung Tabelle 10:

Spezies	Stamm	16S-23S ITS Operon	16S-23S ITS GenBank Accession-Nr.	16S rDNA Genotyp	16S rDNA GenBank Accession-Nr.
N. sp.	DSM 43301	rrnB	AF536478		AF430056
N. sp.	DSM 43396	rrnA	AF536479		AF430062
N. sp.	DSM 43399	rrnA	AF536480		AF430058
N. sp.	DSM 43399	rrnB	AF536481		AF430058
N. sp.	DSM 43399	rrnC	AF536482		AF430058
N. sp.	DSM 43576	rrnA	AF536483		AF430022
N. sp.	DSM 43576	rrnB	AF536484		AF430022
N. transvalensis	DSM 43405T	rrnA	AF536485		AF430047
N. transvalensis	DSM 43405T	rrnB	AF536486		AF430047
N. uniformis	DSM 43136	rrnA	AF536487		AF430044
N. uniformis	DSM 43136	rrnB	AF536488		AF430044
N. vaccinii	DSM 43285T	rrnA	AF536489		AF430045
N. veterana	DSM 40777	rrnB	AF536490	II	AF430059
R. equi	DSM 20307T	rrnA	AF536491		AF490539
R. equi	DSM 20307T	rrnB	AF536492		AF490539
R. opacus	DSM 43205T	rrnA	AF536493		X80630
R. opacus	DSM 43205T	rrnB	AF536494		X80630
R. opacus	DSM 43205T	rrnC	AF536495		X80630
R. ruber	DSM 43338T	rrnA	AF536496		X80625
R. ruber	DSM 43338T	rrnB	AF536497		X80625
C. renale	DSM 20688T	rrnA	AF536498		X81909
C. renale	DSM 20688T	rrnB	AF536499		X81909
C. argentoratense	DSM 44202T		AF536500		X83955
C. amycolatum	DSM 44371		AF536501		
C. amycolatum	DSM 6922T		AF536502		X82057
C. jeikeium	S815		AF536503		
C. kutscheri	DSM 7172		AF536504		
C. kutscheri	DSM 7173		AF536505		
C. propinquum	DSM 44285T		AF536506		X81917
C. propinquum	DSM 46324		AF536507		X81917
C. pseudodiphtheriticum	DSM 46324		AF536508		
C. pseudotuberculosis	DSM 20689T		AF536509		X81916
G. terrae	DSM 43249T	rrnA	AF536510		X81922
G. terrae	DSM 43249T	rrnB	AF536511		X81922
G. terrae	DSM 43249T	rrnC	AF536512		X81922
G. terrae	DSM 43249T	rrnD	AF536513		X81922
T. pulmonis	DSM 44142T	rrnA	AF536514		X92981
T. pulmonis	DSM 44142T	rrnB	AF536515		X92981
T. pulmonis	DSM 44142T	rrnC	AF536516		X92981
T. pulmonis	DSM 44142T	rrnD	AF536517		X92981

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland; JCM: Japanese Collection of Microorganisms, Hirosawa, Wako-shi, Japan; S: Stammsammlung, Institut für Mikrobiologie, Lungenklinik Heckeshorn, Berlin, Deutschland; T: type strain

Die kompletten Spacersequenzen weisen eine Länge zwischen 268 Basen bei *N. sp* DSM 43301 und 346 Basen bei *N. brasiliensis* DSM 46059 auf.
Nicht veröffentlicht wurden die Sequenzen von *N. cyriacigeorgica* DSM 46058 und DSM 43004, die in beiden Operons identisch mit *N. cyriacigeorgica* DSM 43005 rrnA und rrnB waren.
Bei drei Keimen (*N. farcinica* II DSM 44562, *N. brevicatena* DSM 43024 T und *N. vaccinii* DSM 43285 T) ließen sich trotz Screenen und bis zu 16 Sequenzläufen keine unterschiedlichen Operons finden.
Die Analyse des 16S-23S rDNA Spacers der sequenzierten Nocardien mit Hilfe der tRNAscan-Software (Lowe und Eddy 1997) und die Untersuchungen der Sekundärstruktur ergaben keine Hinweise auf das Vorhandensein von tRNA Genen.

3.3.3 Phylogenetische Auswertung der 16S-23S rDNA Sequenzdaten

Neben einer hohen Interspeziesvariabilität konnte in den 16S-23S rDNA Sequenzdaten eine sehr hohe Interoperonvariabilität festgestellt werden. Die höchste Interoperonvariabilität wurde in der Spezis *N. cyriacigeorgica* (DSM 43005) berechnet. Sie beträgt zwischen dem rrnA und rrnB Operon 49,6% und übertrifft somit sogar die Interspeziesvariabilität etlicher Stämme. Eine hohe Interoperonvariabilität ist auch bei den klinisch relevanten Keimen *N. asteroides* (zwischen *N. asteroides* DSM 43757T rrnA und rrnB: 35,19%), *N. nova* (zwischen *N. nova* I JCM 6044T rrnA und rrnC: 32,76%) und *N. brasiliensis* (zwischen *N. brasiliensis* DSM 43758T rrnA und rrnB: 44,62%) aufzufinden. Die angegebenen Werte basieren auf dem Sequenzalignment und schließen Insertionen und Deletionen mit ein.
Basierend auf dem Sequenzalignment wurde mit Hilfe der TREECON for Windows Software folgender phylogenetischer Stammbaum konstruiert.

0.1 substitutions/site
N. farcinica DSM 43131 rrnA
N. farcinica DSM 43063 rrnA
N. farcinica DSM 43668 rrnA
N. farcinica DSM 43244 rrnA
N. farcinica DSM 43665T rrnB
N. farcinica DSM 43289 rrnB
N. farcinica DSM 43244 rrnC
N. farcinica DSM 43289 rrnC
N. farcinica DSM 43244 rrnC
N. farcinica II DSM 44562 rrnA
N. farcinica DSM 43665T rrnA
N. farcinica DSM 43298 rrnA
N. farcinica DSM 43289 rrnA
N. farcinica DSM 43131 rrnB
N. farcinica DSM 43063 rrnB
N. farcinica DSM 43131 rrnC
1
N. sp. DSM 43396 rrnA
N. paucivorans DSM 44563 rrnA
N. brevicatena DSM 43024T rrnA
6
N. sp. DSM 43301 rrnB
N. sp. DSM 43301 rrnA
N. abscessus JCM 6043T rrnA
N. abscessus DSM 44557 rrnA
N. abscessus DSM 44557 rrnC
N. nova III DSM 44560 rrnB
N. nova II S557 rrnB
N. nova II S557 rrnA
9
N. transvalensis DSM 43405T rrnB
N. sp. DSM 43576 rrnA
N. sp. DSM 43253 rrnA
N. sp. DSM 43576 rrnB
N. carnea I DSM 43397T rrnA
N. flavorosea JCM 3342T rrnB
N. flavorosea JCM 3342T rrnA
N. carnea II DSM 44558 rrnD
N. carnea II DSM 44558 rrnE
N. carnea II DSM 44558 rrnA
N. carnea II DSM 44558 rrnC
N. carnea II DSM 44558 rrnB
2
N. crassostreae JCM 10500T rrnB
N. crassostreae JCM 10500T rrnA
N. otitidiscaviarum DSM 43398 rrnB
N. otitidiscaviarum DSM 43242T rrnB
N. otitidiscaviarum DSM 43398 rrnA
N. otitidiscaviarum DSM 43242T rrnA
N. asteroides S546 rrnA
N. asteroides DSM 43757T rrnA
N. vaccinii DSM 43285T rrnA
N. veterana DSM 40777 rrnA
N. africana DSM 44491T rrnA
7
N. cyriacigeorgica II S328 rrnA
N. cyriacigeorgica II DSM 43005 rrnA
N. cyriacigeorgica II DSM 43005 rrnB
N. cyriacigeorgica II DSM 40350 rrnB
N. cyriacigeorgica II DSM 40350 rrnA
N. cyriacigeorgica S297 rrnB
N. cyriacigeorgica S297 rrnA
N. cyriacigeorgica S284 rrnA
N. cyriacigeorgica DSM 43208 rrnA
N. cyriacigeorgica S284 rrnB
10
N. otitidiscaviarum II DSM 44565 rrnA
N. nova I JCM 6044 rrnC
N. pseudobrasiliensis DSM 44290T rrnA
N. abscessus JCM 6043T rrnB
N. abscessus DSM 44557 rrnB
N. sp. DSM 43399 rrnB
N. cyriacigeorgica II S328 rrnC
N. cyriacigeorgica II S328 rrnB
N. cyriacigeorgica DSM 43208 rrnB
10
N. transvalensis DSM 43405T rrnA
N. seriolae DSM 44129T rrnB
N. sp. DSM 43399 rrnC
N. sp. DSM 43399 rrnA
N. uniformis DSM 43136T rrnA
N. uniformis DSM 43136T rrnB
N. seriolae DSM 44129T rrnA
8
N. salmonicida DSM 40472T rrnA
N. asteroides S546 rrnD
N. asteroides S546 rrnB
N. asteroides DSM 43757T rrnB
N. nova II DSM 44561 rrnA
N. nova I S558 rrnA
N. nova I S558 rrnB
N. nova III DSM 44560 rrnA
N. nova I JCM 6044T rrnB
N. nova I JCM 6044T rrnA
9
N. brasiliensis DSM 46059 rrnA
N. brasiliensis DSM 43009 rrnA
N. brasiliensis DSM 46059 rrnB
N. brasiliensis DSM 43758T rrnA
N. brasiliensis DSM 43009 rrnB
N. brasiliensis DSM 43758T rrnC
N. brasiliensis DSM 43758T rrnB
3
N. salmonicida DSM 40472T rrnB
N. asteroides S546 rrnC
N. asteroides DSM 43757T rrnC
N. corynebacterioides DSM 20151T rrnD
N. corynebacterioides DSM 20151T rrnB
N. corynebacterioides DSM 20151T rrnC
N. corynebacterioides DSM 20151T rrnA
4
N. globerula DSM 46019 rrnA
N. globerula DSM 46019 rrnB
N. globerula DSM 46019 rrnD
N. globerula DSM 46019 rrnC
5
R. equi DSM 20307T rrnA

Abbildung 4: Phylogenetischer Baum erstellt aus 104 kompletten 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen von 22 anerkannten Spezies der Gattung *Nocardia*. Als Wurzel für den phylogenetischen Baum wurde das rrnA Operon von *Rhodococcus equi* DSM 20307T verwendet. Die Bezeichnung der Stämme bezieht sich auf die aus der Arbeit resultierende Reklassifizierung (Roth et al. 2003). Die mit Klammern angegebenen Bereiche 1-10 dienen der Verdeutlichung der Spezies Cluster. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit der TREECON for Windows Software (Version 1.3, Yves Van de Peer, Universität Konstanz, Deutschland, Van de Peer et al. 1994, Van de Peer et al. 1997) erstellt. Der Maßstab repräsentiert 10 bp Abweichung auf 100 bp.

Trotz der hohen Variabilität der Spacersequenzen lassen sich in dem phylogenetischen Stammbaum mehrere Cluster erkennen, die einzelne Spezies oder nah verwandte Spezies umfassen. Sowohl die Spezies *N. farcinica* (1), *N. carnea* (2), *N. brasiliensis* (3), *N. corynebacterioides* (4) und *N. globerula* (5) bilden in dem Stammbaum eigene speziesspezifische Äste aus.

Andere Spezies, die hohe Interoperonvariabilität aufweisen, bilden demgegenüber mehrere Äste aus, in denen aber jeweils mehrere Operons der Spezies zusammen eine Gruppe ausbilden wie z.B. *N. nova* (9), *N. cyriacigeorgica* Genotyp I und II (10), *N. otitidiscaviarum* und *N. asteroides*.

Zur Analyse der 16S-23S rDNA Spacersequenzen auf Gattungsebene wurden 21 Operons aus 7 klinisch relevanten Spezies der Gattung *Nocardia* mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Sequenzen aus 16 Spezies der Gattungen *Rhodococcus, Corynebacterioides, Gordonia* und *Tsukamurella* verglichen und ein phylogenetischer Stammbaum erstellt.

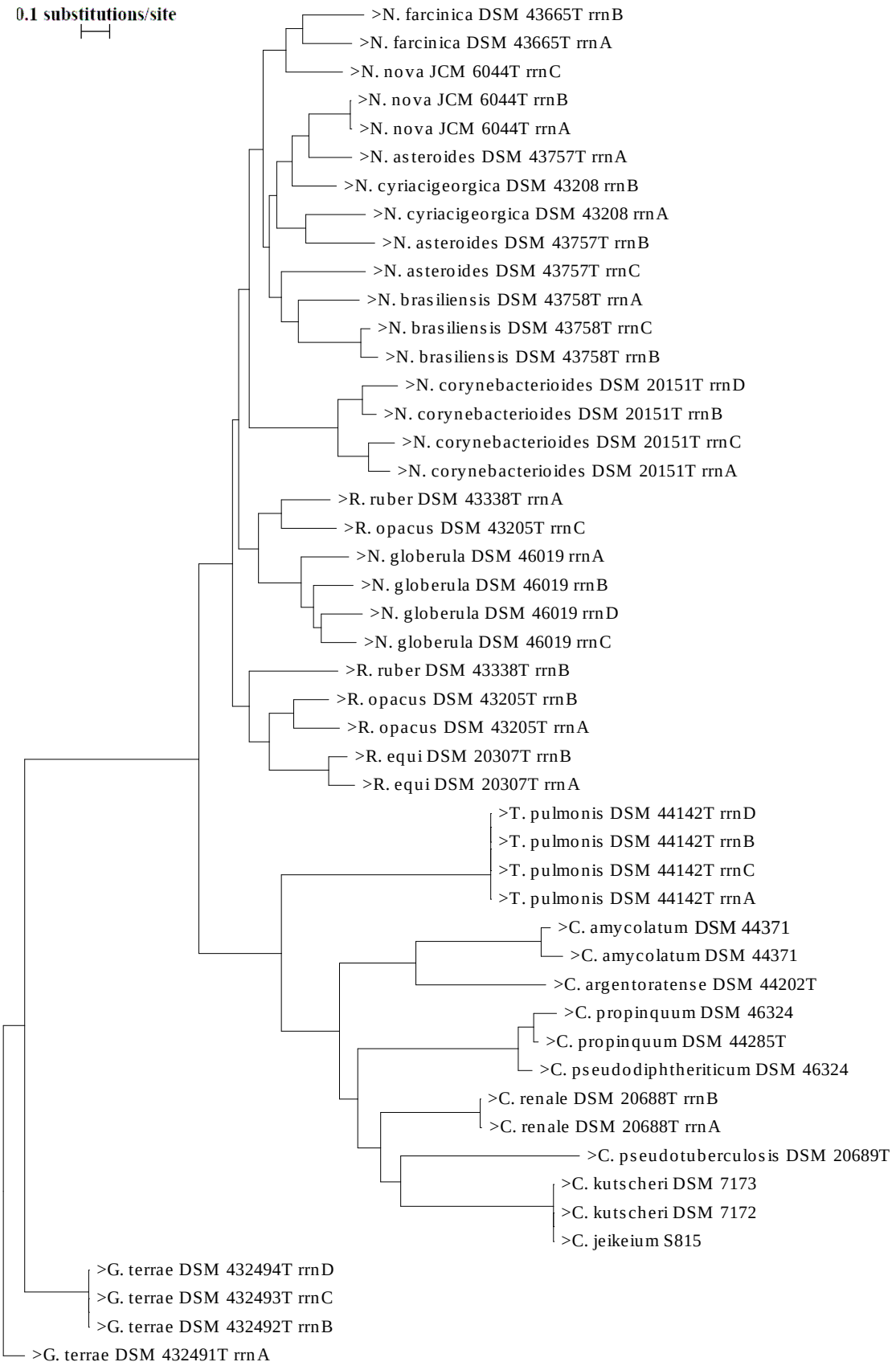

Abbildung 5: Phylogenetischer Baum erstellt aus 48 kompletten 16S-23S rDNA Spacer Sequenzen aus den fünf Gattungen *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterioides*, *Gordonia* und *Tsukamurella*. Als Wurzel für den phylogenetischen Baum wurde das rrnA Operon von *Gordonia terrae* DSM 432491T verwendet. Der Maßstab repräsentiert 10 bp Abweichung auf 100 bp.

Die drei Spezies der Gattung *Rhodococcus* weisen wie die Nocardien eine recht hohe Interoperonvariabilität von bis zu 56% auf. Auch in der Länge des Spacers von 298-335bp ähneln die Rhodococcen den Nocardien. Während bei *G. terrae* DSM 43249T noch eine Interoperonvariabilität von bis zu 25,3% auftritt, weisen die untersuchten Keime der Gattungen *Tsukamurella* und *Corynebacterioides* nur minimale Interoperonvariabilität von einer bis zwei Basen auf. Auch in der Länge des Spacers, der bis zu 442 Basen aufweisen kann, unterscheiden sich die letzten drei Gattungen deutlich von den Nocardien.
Trotz der hohen Interoperon- und Interspeziesvariabilität innerhalb der Gattungen, lassen sich im phylogenetischen Baum diese durch die Ausbildung eigener Äste voneinander trennen. Deutlich geht aus dem Baum auch die nahe Verwandtschaft zwischen den Gattungen *Nocardia* und *Rhodococcus* hervor, die aus einer Verzweigung hervorgehen. Die Spezies *N. corynebacterioides* und *N. globerula* bilden auch in diesem Baum eigene Äste außerhalb der Gattung *Nocardia* aus. *N. globerula* ordnet sich sogar direkt in dem Cluster der Gattung *Rhodococcus* an.

3.4 Identifizierung der Nocardien basierend auf 16S-23S rDNA Spacersequenzen

3.4.1 Gattungsspezifische PCR des 16S-23S rDNA Spacers

Aus dem angefertigten Alignment lassen sich neben hoch variablen Bereichen auch konservierte Bereiche ablesen, die sich für die Entwicklung von potenziellen Primern anbieten. Insbesondere drei aus dem Alignment hervorgegangene konservierte Bereiche im Spacer wurden auf ihre Eignung für gattungsspezifische Primer überprüft.
Der erste konservierte Bereich reicht von Position 241-259[1] (19 bp) und hat die Sequenz GCTCATGGGTG(G/A)AAC(G/A)CTG.
Dieser konservierte Bereich wurde allerdings auch bei den 16S-23S rDNA Spacersequenzen der Gattung *Rhodococcus* gefunden. GenBank Datenbankvergleiche ergaben zusätzlich, dass auch in den Gattungen *Streptomyces*, *Frankia* und *Kitasatosporia* diese Sequenz mit maximal 3 Basenunterschieden Abweichung aufzufinden ist, was die Verwendbarkeit für einen gattungsspezifischen Primer einschränkt. Eine Abgrenzung gegenüber anderen Gattungen, insbesondere *Mycobacterium*, *Nocardioides* und *Saccharomonospora* ist in dieser Region allerdings möglich.

[1] bezogen auf *N. asteroides* DSM 43757T rrnA Gen Bank AF536394

Der zweite konservierte Bereich beginnt bei Nucleotid 315[1] und reicht bis zum Nucleotid 339[1] (25 bp):

```
        C(A/T)CACT(G/A)TTGGGT|CCTGA(A/G)AG AACA
Sp4     C  A  CACT  A  TTGGGT CCTGA  A  AG
```

Diese konservierte Sequenz lässt sich formal in zwei Bereiche unterteilen. Der Bereich ab Nucleotid 328[1] ist sowohl bei grampositiven als auch gramnegativen Bakterien mit geringfügigen Abweichungen (bis 4 Basen Unterschied) wiederzufinden, während der davor liegende Bereich nur bei den Gattungen *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Renibacterium* und *Streptomyces* auftritt. Letztere Gattung besitzt allerdings nicht den zweiten Teil der konservierten Region im direkten Anschluss.

Durch die Auswahl einer beide Bereiche überlappenden Sequenz konnte der Primer Sp4 entwickelt werden, der neben den Nocardien nur die Rhodococcen amplifiziert, da er am 3´Ende zwei oder mehr Mismatches gegenüber den oben genannten anderen Gattungen besitzt.

Der dritte konservierte Bereich liegt am 3´Ende des Spacers und reicht von Position 433-476[1] (44 bp):

GTGTGTTGTTTGAGAACTG(C/T)ACAGTGGACGCGAGCATCTTTGTT

Diese hochkonservierte Region wurde sowohl bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nocardien (bis auf *N.sp*. DSM 43301, die an Position 345 statt eines C ein T hat) als auch bei allen Rhodococcen gefunden. Während weitere Gattungen wie *Streptomyces*, *Kitasatosporia* und *Frankia* in bis zu 35 Basen eindeutig mit dieser Sequenz übereinstimmen, sind die letzten 6 konservierten Basen dieses Bereiches (TTTGTT) nur bei den Nocardien und Rhodococcen aufzufinden. Deutlichere Abweichungen mit zusätzlichen Mismatches weisen die Sequenzen von *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Micromonospora*, *Gordonia*, *Tsukamurella* und *Saccharomonospora* auf.

Unter Einbeziehung der letzten 6 Basen dieses konservierten Bereiches für die Entwicklung des Primers Sp3 konnte in Zusammenhang mit dem oben genannten Primer Sp4 eine Nocardien - Rhodococcen spezifische PCR entwickelt werden, die in einer Versuchsreihe zuverlässige Produkte lieferte.

Eine Abgrenzung der Gattung *Nocardia* von der Gattung *Rhodococcus* wird durch das Auftreten einer Deletion in den *Rhodococcus* Sequenzen am Übergang vom 16S-23S rDNA Spacers zur 23S rDNA ermöglicht:

[1] bezogen auf *N. asteroides* DSM 43757T rrnA Gen Bank AF536394

	ITS	23S rDNA	
Nocardia	TTGTTA-	GTAAG	(58 Operons)
Nocardia	TTGTTT-	GTAAG	(27 Operons)
Nocardia	TTGTTTT	GTAAG	(11 Operons)
Rhodococcus	TTGTT--	GTAAG	(und *N. corynebacterioides* und *N. globerula*)

Abbildung 6: Alignment eines Sequenzausschnittes (5´→ 3´) am Übergang vom 16S-23S rDNA Spacers zur 23S rDNA.

Durch den zusätzlichen Einbau eines Mismatches an Position 3 des folgenden Alignments zu den *Nocardia* Sequenzen gelang es, die Spezifität des Primers zu erhöhen:

Primer Sp3	**TTG**	**GTT**	**WGT**	**AAG**	**TGT**	**KTA**	**AGA**	**GCG**	
Nocardia	--T	---	---	---	---	---	---	---	40 Operons
Nocardia	--T	---	---	---	---	---	---	---	38 Operons
Nocardia	--T	---	---	---	---	---	--G	---	2 Operons
Nocardia	--T	---	---	---	---	-G-	---	---	5 Operons
Nocardia	---	T--	---	---	---	--T	---	---	11 Operons
N.corynebacterioides	C-T	TG-	---	---	---	G--	---	---	2 Operons
N.globerula	C-T	TG-	---	---	-AA	–G-	---	---	
R.equi	C-T	TG-	---	---	---	---	---	---	

Abbildung 7: Sequenzvergleich des Primers Sp3 mit den Sequenzen (5´→ 3´) der analysierten Nocardien und *R. equi*.

Durch Verwendung von zwei Wobbles / degenerierte Basen (W = A / T und K = T / G) besitzt der Primer Sp3 einen Mismatch bei 78 Operons und 2 Mismatches bei 18 Operons der Gattung *Nocardia*, wobei nur einer im Bereich des für die PCR bedeutsamen 3´Endes des Primers liegt. Demgegenüber weisen Stämme der Gattung *Rhodococcus* und die beiden Spezies *N. corynebacterioides* und *N. globerula* vier Mismatches am 3´Ende des Primers auf, was eine Amplifizierung während der PCR ausschließt.

Zur Absicherung gegenüber nicht untersuchten Gattungen wurden die Primersequenzen mit in GenBank enthaltenen Sequenzen verglichen. Aus den Analysen wurden keine entscheidenden Übereinstimmungen ersichtlich, die eine Spezifität des Primers beeinflussen würden.

Der Primer Sp3 hat eine Länge von 24 bp, einen GC-Gehalt von 39,6% und einen thermodynamischen Schmelzpunkt T_m von 58,4°C (Methode TIB Molbiol, Berlin).

Aufgrund seines höheren GC Gehaltes musste der Primer Sp4 kürzer gewählt werden, um eine ähnliche Annealingtemperatur wie Sp3 zu erhalten. Er hat eine Länge von 21 bp, einen GC-Gehalt von 47,6% und einen thermodynamischen Schmelzpunkt T_m von 57,9°C.

126 Stämme der Gattung *Nocardia* wurden mit den neuen Primern amplifiziert. Unter den 256 Stämmen anderer nah verwandter Gattungen wurde keiner vervielfältigt. Negativ in der PCR waren auch die beiden ungeklärten Taxa *N. corynebacteroides* DSM 20151 und *N. globerula* DSM 46019.

Das PCR-Produkt weist im Gel in Abhängigkeit von der Spezies eine Länge von 175 bis 197 bp auf.

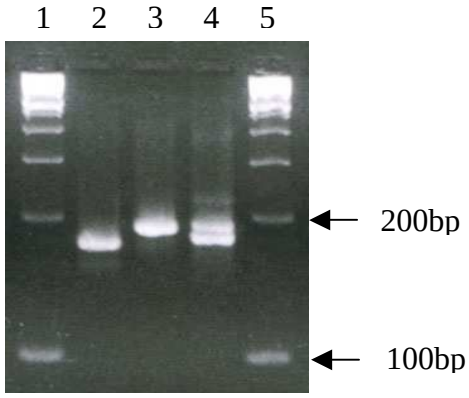

Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten mit den Primern Sp3 und Sp4. Bahnen 1 und 5: 100-bp-Leiter, Bahn 2: *N. otitidiscaviarum* DSM 44565 (175bp), Bahn 3: *N. asteroides* DSM 43757T (187/184/180bp), Bahn 4: *N. farcinica* DSM 43665T (195/184bp).

Alle aufgrund der 16S rDNA Sequenzanalysen reklassifizierten Referenzstämme der DSMZ, die fälschlicherweise der Gattung *Nocardia* zugeordnet waren, fielen in der Sp3/Sp4 PCR negativ aus.

Die Spezifität der neu entwickelten Primer wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen bei verschiedenen Annealingtemperaturen analysiert. Bei Temperaturen von 58°C und 60°C ließen sich sowohl 1 pg und 100 fg Nocardien DNA im Gel detektieren, während sich 10 fg nicht mehr im Gel nachweisen ließen. Die Spezifität des Primers betrug bei beiden Temperaturen 100%. Bei einer Annealingtemperatur von 65°C konnten keine Produkte mehr nachgewiesen werden.

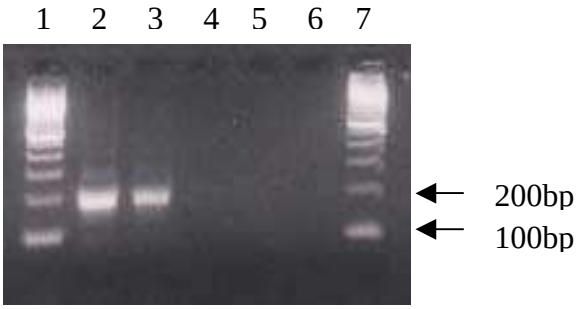

Abbildung 9: Spezifität der Primer Sp3/4 bei 60°C. Bahnen 1 und 7: 100-bp-Leiter, Bahn 2: *N. asteroides* DSM 43757 1 pg, Bahn 3: *N. asteroides* DSM 43757 100 fg, Bahn 4: *N. asteroides* DSM 43757 10 fg, Bahn 5: *R. equi* DSM 20307T, Bahn 6: keine DNA-Zugabe (Negativkontrolle).

Die Selektivität zu der am nächsten verwandten Gattung *Rhodococcus* wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA Menge und Annealingtemperatur analysiert. Auch bei Annealingtemperaturen unter 58°C fand in den Testreihen keine Amplifikation von Rhodococcen statt.

3.4.2 Restriktionsanalyse (RFLP) des 16S-23S rDNA Spacers

Basierend auf den gewonnenen Sequenzdaten wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die für die Entwicklung eines RFLP-Schemas für eine Identifikation der Spezies geeignet erschienen. Das Enzym *Mva*I (Schnittstelle: CC|WGG) wurde als erstes Enzym aufgrund seiner recht speziesspezifischen RFLP-Muster gewählt. Eindeutige Zuordnungen mit Hilfe dieses Enzyms sind für die Spezies *N. farcinica*, *N. seriolae*, *N. vaccinii*, *N. pseudovaccinii* und *N. salmonicida* möglich. Zusätzlich gelingt eine eindeutige Differenzierung der 16S rDNA Genotypen *N. asteroides* I (type strain), *N. asteroides* II, *N. nova* V, und *N. carnea* I.

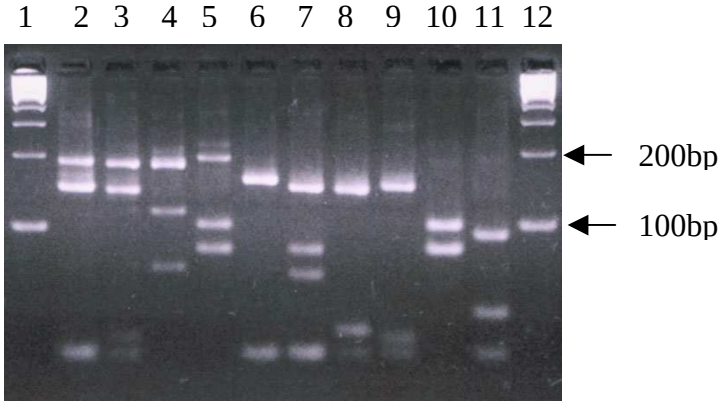

Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese (4%) nach vorangehendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mva*I. Bahnen 1 und 12: 100-bp-Leiter, Bahn 2: *N. nova* DSM 40806, Bahn 3: *N. asteroides* (Genotyp II) DSM 43258, Bahn 4: *N. salmonicida* DSM 40472T, Bahn 5: *N. farcinica* DSM 43665T, Bahn 6: *N. carnea* DSM 46071, Bahn 7: *N. cyriacigeorgica* DSM 43208, Bahn 8: *N. seriolae* DSM 44129T, Bahn 9: *N. asteroides* DSM 43757T, Bahn 10: *N. farcinica* DSM 43131, Bahn 11: *N. vaccinii* DSM 43285T.

Um die verbleibenden nach *Mva*I-Restriktionsverdau identischen Stämme zu unterscheiden, wurde zusätzlich das Enzym *Msp*I (Schnittstelle C|CGG) ausgewählt. Die Kombination der Enzyme *Mva*I und *Msp*I ermöglicht eine eindeutige Zuordnung fast aller untersuchten Spezies. Nur eine Differenzierung zwischen *N. veterana* (T) und *N. crassostreae* (T) und zwischen den Spezies *N. uniformis*, *N. soli*, *N. fluminea* und *N. cummidelens* und sieben

N. species Stämmen gelingt im RFLP nicht, wobei zu beachten ist, dass in einem medizinischen Kontext nur *N. veterana* eine klinische Bedeutung hat.

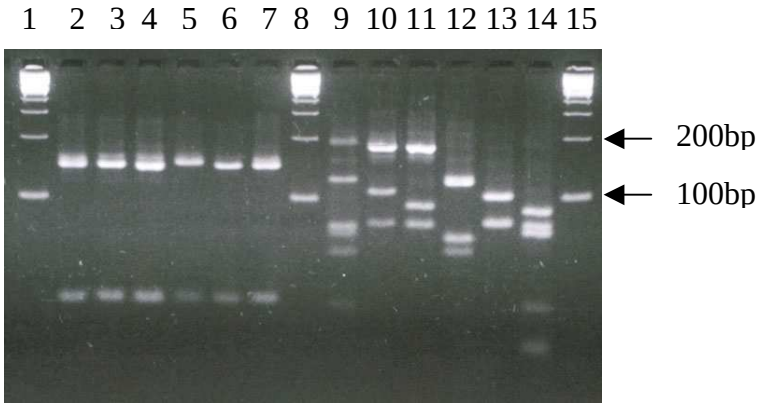

Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese (4%) nach vorangehendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mva*I (Bahnen 2-7) bzw. *Msp*I (Bahnen 9-14). Bahnen 1, 8 und 15: 100-bp-Leiter, Bahnen 2 und 9: *N. veterana* DSM 43300, Bahnen 3 und 10: *N. cyriacigeorgica* (Genotyp II) S328, Bahnen 4 und 11 *N. otitidiscaviarum* DSM 43242 T, Bahnen 5 und 12: *N. abscessus* JCM 6043T, Bahnen 6 und 13 *N. brevicatena* DSM 43024 T, Bahnen 7 und 14 *N. nova* JCM 6044 T. Bahnen 4 und 6 weisen eine geringfügig kleinere Bande (143bp) im Vergleich zu den Banden 2,3,5 und 7 (146 bp) auf.

Durch den Einsatz der zusätzlichen Enzyme *Dde*I und *Hae*III lassen sich sowohl *N. veterana* (T) von *N. crassostreae* (T) als auch *N. fluminea* von *N. cumidelens* differenzieren. Nur eine Unterscheidung von *N. soli* und *N. cummidelens* und der 5 *N. species* Keime, die ursprünglich alle dem Biotyp II des *N. asteroides* Komplex zugeordnet wurden, ist auch mit Hilfe von vier Enzymen nicht möglich.

Das folgende RFLP-Schema basiert auf den Sequenzdaten des Sp3/4 PCR-Produktes und wurde um empirische Ergebnisse von nicht sequenzierten Stämmen bzw. Operons ergänzt.

Tabelle 11: RFLP-Schema von 126 Stämmen aus 24 Spezies der Gattung *Nocardia* und weiteren 17 *Nocardia species* basierend auf dem Sp3/Sp4 PCR-Produkt.

Spezies	16S rDNA Genotyp	Stamm	Anzahl	PCR in bp	*Mva*I Muster A-M und Fragmentgrößen in bp	*Msp*I Fragmentgrößen in bp	*Dde I* Fragmentgrößen in bp	*Hae III* Fragmentgrößen in bp
N. sp.		DSM 43395	1	190	**A** ungeschnitten	ungeschnitten	190 95	190 105 85
N. sp.		DSM 43301	1	195	ungeschnitten	195 125 70	190 110 90	ungeschnitten
N. sp.		DSM 43254	1	190	ungeschnitten	190 125 70	ungeschnitten	ungeschnitten
N. transvalensis		DSM 43405T	3	185	ungeschnitten	185 130 60	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp.		DSM 6249	1	195	ungeschnitten	195 110 80	190 95	195 105 85
N. fluminea		DSM 44489T	1	190	ungeschnitten	190 105 85	190 95	ungeschnitten
N. cummidelens		DSM 44490T	2	190	ungeschnitten	190 105 85	190 95	190 105 85
N. soli		DSM 44488T	1	190	ungeschnitten	190 105 85	190 95	190 105 85
N. uniformis		DSM 43136T	2	195 185	ungeschnitten	195 105 80	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp.		DSM 46067	2	185 175	ungeschnitten	125 120 60	185 105 75	185 110 65
N. nova	V	DSM 40806	1	190 185	**B** 190 150 35	105 80	190 120 70	190 105 80
N. asteroides	II	DSM 43258	1	180	180 145 40 35	180 105 80	180 90	ungeschnitten
N. pseudovaccinii		DSM 43406	1	190	**C** 190 120 70	110 80 60	ungeschnitten	190 105 80
N. salmonicida		DSM 40472T	2	195 185	**D** 195 185 110 80	110 105 85 60	ungeschnitten	195 105 80
N. farcinica	I / II	DSM 43244	7	195 185	**E** 195 100 85	195 125 55	180 100 80	ungeschnitten
N. farcinica	I	DSM 43665T	2	195 185	195 100 85	195 105 80	180 100 80	ungeschnitten
N. farcinica	I	DSM 43298	2	190 185	190 100 85	125 105 80 55	170	ungeschnitten
N. carnea	II / III	DSM 46071	3	195	**F** 160 35	125 70	ungeschnitten	ungeschnitten
N. paucivorans		DSM 44386T	5	195	160 35	80 55 45	120	120 75
N. flavorosea		JCM 3342 T	2	190	155 35	190 100 90	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp.		DSM 43396	3	190	155 35	115 75	ungeschnitten	ungeschnitten
N. cyriacigeorgica	I	DSM 44484T	1	190	155 35	115 95 90 75	120 70	190 95
N. cyriacigeorgica	I	DSM 43208	4	190	**G** 155 80 70 35	190 95 90	120 70	190 95
N. cyriacigeorgica	I	S297	1	190	155 80 70 35	115 95 90 75	120 110 75 70	95 90
N. cyriacigeorgica	I	K1013	3	190	155 80 70 35	190 115 75	190 120 70	ungeschnitten
N. cyriacigeorgica	II	DSM 43005	5	180	**H** 145 120 35 20	180 95 75	ungeschnitten	180 95 85
N. brasiliensis		DSM 43009	2	190	**I** 145 95 50 45	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. brasiliensis		DSM 46059	2	190	**J** 145 45	ungeschnitten	180 120 70	ungeschnitten
N. pseudobrasiliensis		DSM 44290T	2	185	140 45	120 65	ungeschnitten	ungeschnitten
N. seriolae		DSM 44129T	1	185 180	140 45 35	180 90	185 110 70	ungeschnitten
N. asteroides	I	DSM 43757T	2	185 180	145 40 35	180 105 80	185 100 85	185 105 80

Spezies	16S rDNA Genotyp	Stamm	Anzahl	PCR in bp		*Mva*I Muster A-M und Fragmentgrößen in bp	*Msp*I Fragmentgrößen in bp	*Dde I* Fragmentgrößen in bp	*Hae III* Fragmentgrößen in bp
N. sp. (Biotyp II)		DSM 43253	2	185		**K** 150 35	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp. (Biotyp II)		DSM 43576	1	185		150 35	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp. (Biotyp II)		DSM 43260	2	185		150 35	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. crassostreae		JCM 10500T	1	180		145 35	ungeschnitten	180 125 55	180 95 85
N. veterana	I	DSM 44445T	2	185		145 35	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. veterana	II	DSM 43300	1	185		145 35	185 120 75 70 60 35	185 115 55	185 105 75
N. nova	I / II	S558	3	185	180	145 35	180 120 75 70 60 35 25	180 115 55	185 105 75
N. veterana	III	DSM 43557	1	180		145 35	180 110 75	180 115 55	180 105 75
N. cyriacigeorgica	II	S328	1	180		145 35	180 105 75	100 80	ungeschnitten
N. sp.		DSM 43399	1	180	175	145 35	180 100 75	115 105 70 65	ungeschnitten
N. otitidiscaviarum	I	DSM 43242T	8	180		145 35	180 95 75	ungeschnitten	ungeschnitten
N. africana		DSM 44491T	4	180		145 35	180 90	ungeschnitten	ungeschnitten
N. veterana	II	DSM 40777	1	180		145 35	125 90 60	ungeschnitten	ungeschnitten
N. abscessus		JCM 6043T	3	180		145 35	120 65 55	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp.		DSM 40872	1	180		145 35	110 70	180 115 65	180 105 75
N. asteroides	III	DSM 43255	1	180		145 35	105 80	180 105 75	180 90
N. brevicatena		DSM 43024T	1	180		145 35	100 80	115 65	ungeschnitten
N. nova	I / III	JCM 6044T	6	185	180	145 35	90 75 70 35 25	115 100 65 55	180 105 75
N. nova	IV	DSM 43256	1	185		145 35	85 80 35	115 65	180 105 75
N. nova	II	S559	2	185		145 35	75 35	115 55	105 75
N. otitidiscaviarum	II	DSM 46056	2	175		140 35	95 75	ungeschnitten	ungeschnitten
N. sp		DSM 46070	1	190		**L** 105 85	95 60 30	ungeschnitten	ungeschnitten
N. farcinica	I	DSM 43131	8	185		100 85	125 55	170	ungeschnitten
N. brasiliensis		DSM 43758T	1	190		**M** 95 50 45	ungeschnitten	195 110 70	ungeschnitten
N. vaccinii		DSM 43285T	1	180		95 50 35	ungeschnitten	ungeschnitten	ungeschnitten
N. carnea	I	DSM 43397T	2	180		85 60 35	100 90	110 70	ungeschnitten
N. cyriacigeorgica	I	S284	1	185		80 70 35	ungeschnitten	115 70	ungeschnitten

Die PCR-Produkte und Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben. Die RFLP- Fragmente sind auf die nächsten 5 bp gerundet. Fragmente kleiner als 25 bp werden nicht gezeigt, da diese auch fälschlicherweise aus Primer-Dimeren resultieren können. Die angegebenen Genotypen beziehen sich auf die Analysen der 16S rDNA.

Aufgrund der hohen Intraspezies- und Interoperonvariabilität sind bei einigen Spezies keine einheitlichen RFLP-Muster zu finden. Dies betrifft insbesondere die klinisch relevanten Spezies *N. cyriacigeorgica* und *N. nova*. Während diese Spezies nach enzymatischem Verdau mit *Mva*I noch recht stabile Muster aufweisen, fällt in den *Msp*I Mustern eine höhere Variabilität auf.

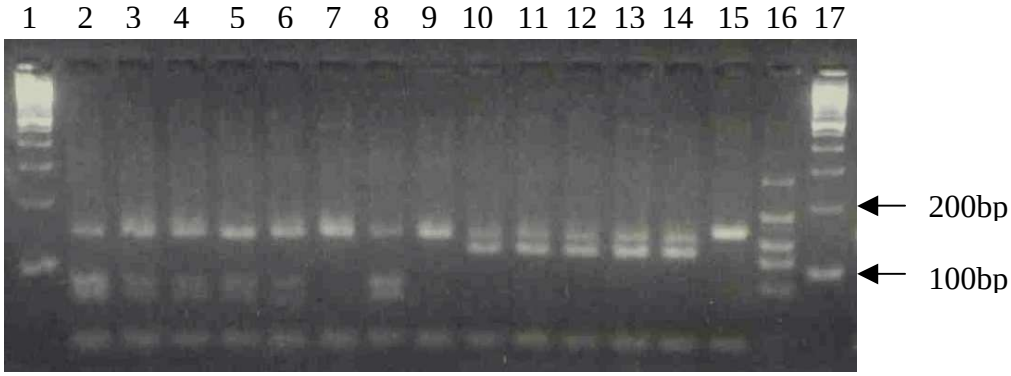

Abbildung 12: Variation des RFLP-Musters bei Stämmen der Spezies *N. cyriacigeorgica*. Agarosegelelektrophorese (4%) nach vorangehendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Mva*I. Bahnen 1 und 17: 100-bp-Leiter, Bahn 16: Marker 80, 113, 137, 185, 270, Bahn 2: K406, Bahn 3: K256, Bahn 4: K969, Bahn 5: K1013, Bahn 6: DSM 43208, Bahn 7: DSM 44484 T, Bahn 8: S297, Bahn 9: S328, Bahn 10: DSM 43004, Bahn 11: DSM 43005, Bahn 12: DSM 46058, Bahn 13: DSM 40350, Bahn 14: K817, Bahn 15: S284
(K = klinisches Isolat)

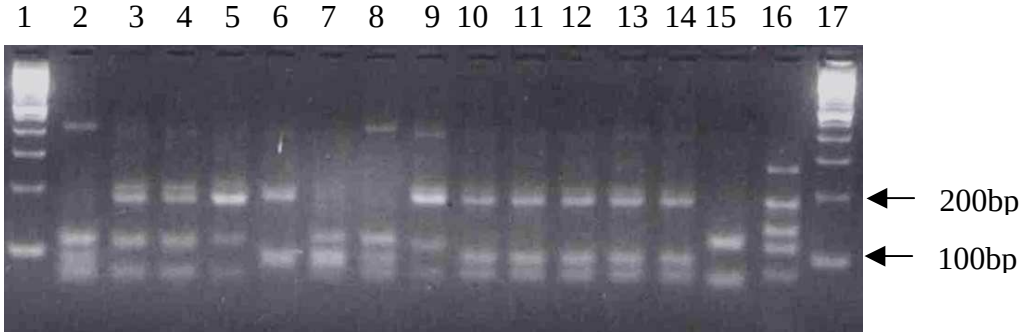

Abbildung 13: Variation des RFLP-Musters bei Stämmen der Spezies *N. cyriacigeorgica*. Agarosegelelektrophorese (4%) nach vorangehendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Msp*I. Bahnen 1 und 17: 100bp Leiter, Bahn 16: Marker 80, 113, 137, 185, 270, Bahn 2: K406, Bahn 3: K256, Bahn 4: K969, Bahn 5: K1013, Bahn 6: DSM 43208, Bahn 7: DSM 44484 T, Bahn 8: S297, Bahn 9: S328, Bahn 10: DSM 43004, Bahn 11: DSM 43005, Bahn 12: DSM 46058, Bahn 13: DSM 40350, Bahn 14: K817, Bahn 15: S284
(K = klinisches Isolat)

4. DISKUSSION

4.1 Morphologische und biochemische Identifizierung der *Nocardia*-Isolate

Eine zuverlässige und schnelle Gattungs- und auch Speziesidentifikation von Nocardien ist neben der notwendigen mikrobiologischen Befundung auch für die Vorhersage der Pathogenität und der Antibiotikaempfindlichkeit von klinischer Bedeutung (Brown-Elliott et al. 2006, Schaal 1994, Saubolle und Sussland, 2003). Die Identifizierung der Spezies von *Nocardia*-Isolaten ist aufgrund morphologischer und biochemischer Tests schwer möglich und wird heutzutage vorwiegend molekulargenetisch durchgeführt (Mellmann et al. 2003, Muňoz et al., 2007), weil die verfügbaren Daten der phänotypischen Eigenschaften der Nocardien (Schaal 1992, Beaman et al. 1995, Goodfellow und Lechevalier, 1989) für die große Anzahl der in den letzten Jahren neu beschriebenen Spezies nicht mehr ausreichen oder unvollständig sind (Brown-Elliott et al. 2006).

Auch in der vorliegenden Arbeit traten bei der konventionellen Identifikation mittels phänotypischer und biochemischer Merkmale die beschriebenen Probleme auf, die ohne eine zusätzliche molekularbiologische Analyse mittels Sequenzierung des 16S rDNA Gens zu keiner sicheren Spezieszuordnung der Stämme geführt hätte. Dass aufgrund von konventionellen Methoden Fehler in der Spezies oder sogar Gattungsidentifikation auftreten können, wurde auch aus den 61 falsch bei der DSMZ als Referenzstämme eingereichten Isolaten deutlich.

Einerseits beanspruchen morphologische und biochemische Nachweisverfahren für ihre Durchführung einen Zeitraum von 7 bis 21 Tagen. Andererseits treten klinische Fälle von Nocardiainfektionen in Routinelaboratorien selten auf (2-3 Fälle pro Jahr, vgl. 1.2), sodass aufgrund der begrenzten Haltbarkeit der benötigten Medien (Lysozymtest, Hydrolyseplatten) diese Art von Diagnostik für das Routinelabor zu aufwendig und unwirtschaftlich erscheint.

Eine biochemische Differenzierung von Nocardien mittels Auxanographie-Verfahrens (Muir und Pritchard 1997, Schaal 1992) ist ebenfalls einerseits zeitaufwendig und - wie auch in der vorliegenden Arbeit deutlich wird (Tabelle 4) - nicht ausreichend für die sichere Abgrenzung aller Spezies. Stattdessen müssen diese Verfahren vorher mit zahlreichen anderen phänotypischen Merkmalen in umfangreichen Analysen evaluiert und verfügbar gemacht werden. Da diese Art von Untersuchungen heutzutage kaum mehr durchgeführt oder publiziert werden, können die Einzelbeschreibungen biochemischer Leistungen eher als

bestätigende Verfahren im Rahmen einer bakteriologischen Diagnostik, die sowohl molekulargenetisch als auch phänotypisch identifiziert, angewandt werden. In diesem Sinne sind auch die beiden Schlüsselreaktionen, die Spaltung von Harnstoff und das Wachstum bei 45°C, die in der vorliegenden Arbeit ausgewählt wurden und einfach durchzuführen sind, zu werten. Diese beiden Schlüsselreaktionen wurden von Wauters et al. in einem phänotypischen Identifizierungsschema mit aufgenommen (Wauters et. al 2005). Die in der Tabelle 4 beschriebenen Ergebnisse dieser beiden Reaktionen stimmen mit den bisher veröffentlichen Ergebnissen überein (Brown-Elliott et al. 2006, Wauters et al. 2005). Ebenso konnten die Ergebnisse der Identifizierung von Nocardien anhand von Empfindlichkeitsprüfungen gegenüber Antibiotika (Wallace et al. 1988b, Ambaye et al. 1997, Kiska et al. 2002) in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Tabelle 4). Die Datenlage dieser Verfahren wurde zwar im Rahmen der Beschreibungen neuer Spezies in den meisten Fällen für diese erweitert, die Anzahl neu beschriebener Spezies hat aber in der Zwischenzeit einen so großen Umfang angenommen, dass die Verfahren nur noch schwer für alle Spezies zu interpretieren sind. Weltweit betrachtet können aber molekularbiologische Verfahren nicht in allen Laboratorien durchgeführt werden, so dass diese phänotypischen Merkmalsbestimmungen hier durchaus einen wichtigen Stellenwert in der Diagnostik haben und auch durchaus zu recht sicheren Ergebnissen führen können.

4.2 Phylogenie der Gattung *Nocardia* basierend auf 16S rDNA Daten

Durch die Etablierung molekularbiologischer Methoden – wie die Sequenzierung der 16S rDNA (Alphey 1998, Böttger 1991, Edwards et al. 1989) – wird heutzutage eine sichere und auch schnelle Identifizierung der *Nocardia* Spezies durch die Sequenzanalyse ermöglicht (Cloud et al. 2004, Mellmann et al. 2003). Je nachdem ob die vorangehende PCR von einer Kultur oder direkt aus Patientenmaterial (z.B. Sputum) durchgeführt wird, kann damit eine sichere Identifizierung in einem Zeitraum von ein bis zwei Tagen gelingen. Grundvoraussetzung dafür sind aber fehlerfreie Vergleichssequenzen (Cloud et al. 2004, Roth et al. 2003). Vorhandene Sequenzdatenbanken und Sequenzanalyseverfahren wie z.B. die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) betriebene GenBank und das Analyseverfahren BLAST (Altschul et al. 1990) erweisen sich nicht immer als zuverlässig für die sichere Identifizierung von Bakterien aufgrund falsch eingereichter Daten oder Daten mit hoher Fehlerrate. Dieser Sachverhalt wurde bereits in vorangehenden Publikationen beschrieben (Turenne et al. 2001, Mellmann et al. 2003, Roth et al. 2003).

Bei dem Vergleich der *Nocardia* Sequenzen mit den in GenBank vorhandenen Sequenzen wurde ersichtlich, dass einige Stämme in den öffentlichen Sequenzdatenbanken Fehler aufwiesen. Neben Fehlern wie Insertionen oder Deletionen insbesondere am Anfang und Ende der Sequenzen wurden auch Sequenzdaten falschen Spezies zugeordnet. So wurde unter der accession number X80611 (EMBL: NO16SR) der Stamm *N. otitidiscaviarum* (type strain) mit der Sequenz der Spezies *N. farcinica* eingereicht. Durch die fehlende Qualitätskontrolle der Einträge sind die öffentlichen Datenbanken deshalb nur bedingt für die klinische Diagnostik von pathogenen Mikroorganismen geeignet. RIDOM (Ribosomal Differentiation of Microorganisms; www.ridom-rdna.de) und die kommerziell verfügbare Software und Datenbank MicroSeq versuchen diese Limitierungen zu beheben (Cloud et al. 2004, Mellmann et al. 2003). Die Sequenzen dieser Arbeit wurden alle sowohl in GenBank als auch RIDOM eingereicht. Somit stellt dieser Teil der vorliegenden Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Sequenzdatenlage der verfügbaren Datenbanken und somit die wichtigste Voraussetzung für die sequenzgestützte Identifizierung von Nocardien dar (Patel, 2001).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen annähernd vollständigen 16S rDNA Sequenzen enthalten im Vergleich zu bereits vorhandenen Sequenzen das komplette 3´Ende der 16S rDNA. Sie ermöglichen in diesem Zusammenhang auch eine sichere Differenzierung sehr nah verwandter Spezies oder Genotypen, was anhand von partiellen Sequenzen nicht immer möglich ist (Conville et al. 2003, Mellmann et al. 2003). Dies spielt insbesondere im Rahmen phylogenetischer Analysen eine wichtige Rolle (Roth et al. 2003). Für die Routinediagnostik ist eine komplette Sequenzierung der 16S rDNA meist zu aufwendig. Für klinisch relevante Vertreter der Gattung *Nocardia* erwies sich die Sequenzierung der variablen Regionen zwischen Position 100 bis 610 (bezogen auf *N. asteroides* AF430019) als ausreichend. Zur Gewinnung der Sequenz reicht in diesem Fall eine PCR mit den verwendeten Primern Eu4b/5b und die Sequenzierung eines Stranges des doppelsträngigen PCR-Produktes aus.

Die Topologie innerhalb des phylogenetischen Stammbaumes korreliert mit den Ergebnissen von Rainey et al. (1995) und Chun und Goodfellow (1995) und ergänzt diese um etliche neu beschriebene Spezies. Im Vergleich zu phylogenetischen Stammbäumen im Rahmen von Neubeschreibungen wurden in der vorliegenden Arbeit auch die einzelnen Biotypen des *N. asteroides* komplex und einige *Nocardia species* in die phylogenetischen Analysen mit einbezogen. Daraus konnten zusätzliche Verwandtschaften abgeleitet werden, die selbst bei Neubeschreibungen von Spezies nicht beachtet worden waren. So stellte Chun et al. 1998 bei

der Neubeschreibung von *N. flavorosea* nicht die nahe Verwandtschaft dieses Keimes zu dem Biotyp II des *N. asteroides* Komplex fest, welche aus dem vorliegenden Baum hervorgeht. Auch bei der Neubeschreibung der klinisch relevanten Spezies *N. cyriacigeorgica* durch Yassin et al. 2001 wurde nicht die hohe Verwandtschaft basierend auf 16S rDNA Daten zu den Keimen des zum *N. asteroides* Komplex gehörenden Biotyps VI festgestellt. Diese Keime weisen sogar eine identische 16S rDNA auf oder unterscheiden sich nur um eine Base zu der Sequenz von *N. cyriacigeorgica*, was aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht und durch andere Arbeiten bestätigt wurde (Brown-Elliott et al. 2006, Conville und Witebsky 2007).

Aus dem phylogenetischen Baum als auch aus der Distance Matrix geht hervor, dass die Interspeziesheterogenität zwischen nah verwandten *Nocardia* Spezies sehr gering ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Conville et al. 2003 und Yassin et al. 2000b. Die höchste DNA-Übereinstimmung wurde von Yassin et al. zwischen den anerkannten Spezies *N. paucivorans* und *N. brevicatena* festgestellt (Yassin et al. 2000a). Dieser Grad der Übereinstimmung ist auf der Grundlage der neuen Sequenzen sogar noch um 4 Basen geringer als er von Yassin et al. angegeben wurde. Dass es sich hierbei wirklich um eine neue Spezies handelt, konnte durch DNA-DNA Hybridisierungswerte von 61,9% gezeigt werden (Yassin et al. 2000a).

Bei den Stämmen der Spezies *N. farcinica* DSM 43289 und *N. brasiliensis* DSM 46059 konnte im Bereich der 16S rDNA Interoperonvariabilität festgestellt werden. Diese wurde bei mehreren Klonen bestätigt. Das Auftreten von 16S rDNA Operons mit abweichender Primärstruktur hat Auswirkungen auf die molekularbiologische Diagnostik, da durch Interoperonvariabilität in der sonst so konservierten 16S rDNA die Sequenzierung erschwert wird und ggf. sogar zu falschen Ergebnissen führen kann. Später publizierten Conville et al. 2005 das Auftreten von drei 16S rDNA Sequenzen bei einem klinischen Isolat von *N. nova*.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in acht klinisch relevanten Spezies der Gattung *Nocardia* Intraspeziesvariabilitäten festgestellt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit bekannten Studien (Conville et al. 2000, Hamid et al. 2001). Gerade das Auftreten von Mikroheterogenitäten erfordert zuverlässige Sequenzen für eine eindeutige Differenzierung. Die weiteste Entfernung zwischen zwei Stämmen innerhalb einer Spezies (Mikroheterogenität) wurde in der vorliegenden Arbeit bei *N. carnea* mit 4 Basenunterschieden festgestellt.

Eine noch höhere Intraspeziesvariabilität wurde in der Spezies *N. asteroides* aufgefunden. So wiesen die Stämme *N. asteroides* DSM 43255 und *N. asteroides* DSM 43258 8 bzw. 12 Basenunterschiede zum Typusstamm auf. Diese Abweichungen übertreffen den Abstand

zwischen den Spezies *N. paucivorans* und *N. brevicatena*. Über die Definition zweier neuer Spezies muss in diesem Fall diskutiert werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der biochemischen Analysen, in denen die Genotypen II und III unterschiedliche Muster der Antibiotikaempfindlichkeit aufwiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang eine Klärung der phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den zum *N. asteroides* Komplex gehörenden Stämmen. Dazu wurden die von Wallace et al. 1988a beschriebenen Biotypen in dem Stammbaum für eine anschließende Analyse mit einbezogen.

Betrachtet man die einzelnen Stämme aus dem *N. asteroides* Komplex, so bilden diese im phylogenetischen Baum sieben Äste aus, die sich in fünf etablierte Spezies und zwei unbenannte Taxons unterteilen lassen. Neben dem Cluster des Typusstammes bilden *N. abscessus* (Biotyp I nach Wallace et al. 1988b), *N. nova* (Biotyp III), *N. farcinica* (Biotyp V), *N. cyriacigeorgica* (Biotyp VI) und *N. sp*. ATCC 49872 (Biotyp IV) eigene stabile Äste aus, während der Biotyp II (DSM 43260, DSM 43261, DSM 43253, DSM 43254, DSM 43263) in zwei phylogenetische Gruppen zerfällt. Diese Gruppen weisen eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Spezies *N. flavorosea* und *N. carnea* auf. Während der Stamm *N. carnea* DSM 44558 (Genotyp II) auch die gleichen Antibiotikaresistenzen wie der Biotyp II aufweist, unterscheidet sich *N. flavorosea* von diesem in der Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin.

Aufgrund der phylogenetischen Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die beiden Biotypen II und IV nicht zur Spezies *N. asteroides* gehören, sondern eigene, unbeschriebene Spezies bilden. Aus diesem Grund wurde für diese Stämme in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung *N. species* verwendet. Dass mit Hilfe der von Wallace et al. 1988b beschriebenen Biotypen nicht immer eindeutige Zuordnungen gelingen, ist auch in den Spezies *N. nova* und *N. asteroides* zu erkennen. So weist der im phylogenetischen Stammbaum mit dem *N. asteroides* (T) verwandte Stamm *N. asteroides* (DSM 43258) den Biotyp II auf und der Stamm *N. nova* (Genotyp II, DSM 44561) weist abweichend zu allen anderen Vertretern dieser Spezies nicht den Biotyp III auf.

Der bei der DSMZ unter dem Namen *N. asteroides* DSM 43005 eingereichte Stamm sowie fünf weitere in der Biochemie gleiche Stämme sind in der Sequenz identisch oder unterscheiden sich nur um ein Base zu der 2001 von Yassin et al. neu beschriebenen Spezies *N. cyriacigeorgica* und bilden mit dieser im phylogenetischen Baum einen gemeinsamen Ast. Basierend auf den Sequenzdaten aber auch auf der gemeinsamen Zuordnung zum Biotyp VI erscheint es sinnvoll, das Isolat DSM 43005 als einen Stamm der Spezies *N. cyriacigeorgica*

zu betrachten. Zur eindeutigen Absicherung dieser Zuordnung müssten DNA-DNA Hybridisierungen durchgeführt werden.

Aufgrund der Genotypisierung der Biotypen des *N. asteroides* Komplex, können mit Hilfe der erarbeiteten Ergebnisse basierend auf 16S rDNA Sequenzanalysen Aussagen über die Antibiotikaresistenzen erzielt werden, was für die Therapie dieser Krankheitserreger von Bedeutung ist.

Den Ergebnissen des phylogenetischen Stammbaumes und der Distance Matrix zufolge erscheint eine Einführung von neuen *Nocardia*–Spezies als angebracht. Deutlich muss hier aber zwischen Intraspeziesvariabilität und neuer Spezies unterschieden werden. Aus den Ergebnissen von Yassin et al. 2000b und Mellmann et al. 2003 können bereits 7 Basenunterschiede in der 16S rDNA für die Abgrenzung einer neuen Spezies ausreichen. Auch zwischen den anerkannten Spezies *N. flavorosea* und *N. carnea* ist nur eine Abweichung von 10 Basenunterschieden und zwischen den Spezies *N. africana* und *N. veterana* 11 Basenunterschieden, basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen, aufzufinden. Dies spricht dafür, dass sowohl die klinisch relevanten Biotypen II und IV als auch die Genotypen II und III des *N. asteroides* Typusstammes eigene Spezies bilden.

Beschreibungen neuer Spezies können allerdings nicht ausschließlich auf der Grundlage von 16S rDNA Daten geschehen, wenn diese auch einen guten Anhaltspunkt geben, sondern es müssen auch weitere genotypische (wie DNA-DNA Hybridisierung) und phänotypische Merkmale analysiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund von genotypischen Analysen die Neubeschreibung der Spezies *N. pseudovaccinii* (DSM 43406, Kim et al. 2002) durchgeführt. Basierend auf den 16S rDNA Analysen konnte bei diesem Keim vermutet werden, dass er falsch der Spezies *N. vaccinii* zugeordnet wurde, da er nur 97,6% Übereinstimmung zu der Spezies *N. vaccinii* (DSM 43285T) aufwies. Eine zusätzliche Abgrenzung gelang mittels Durchführung biochemischer Analysen. Während eine biochemische Zuordnung zur Gattung *Nocardia* eindeutig nach den oben beschriebenen Methoden gelang, wies der Keim DSM 43406 ein zu allen bisher beschriebenen Nocardien Spezies abweichendes Muster bei der Assimilation von Kohlenhydraten und eine eigene Fettsäurestruktur auf. Auch DNA-DNA Hybridisierungen zwischen dem Stamm DSM 43406 und anderen *Nocardia*-Stämmen ergaben immer Werte unter 70% (Kim et al. 2002), was für eine Neubeschreibung ausreicht (Wayne et al. 1987). Aus dem phylogenetischen Stammbaum geht eine Verwandtschaft des Stammes DSM 43406 zu den Spezies *N. vaccinii*, *N. africana* und *N. veterana* hervor.

Die von Rainey et al. 1995 angestrebte Umbenennung der Spezies *N. corynebacterioides* und *N. globerula* zu der Gattung *Rhodococcus* wird durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützt. Aus den phylogenetischen Bäumen geht deutlich hervor, dass die Spezies *N. corynebacterioides* und *N. globerula* nicht mit anderen Nocardien clustern, sondern mit der Gattung *Rhodococcus* verwandt sind. So ist *N. globerula* in der 16S rDNA Sequenz bis auf 3 Basen identisch mit *R. globerulus* (GenBank: RG16SR) und *N. corynebacterioides* bis auf 7 Basenunterschiede mit *R. corynebacterioides* (GenBank: RCO16SR). Schon Rainey wies darauf hin, dass die Spezies *N. corynebacterioides* aufgrund biochemischer Untersuchungen in die Gattung Rhodococcus zu überführen sei (Rainey et al. 1995). Zwischenzeitlich ist die Spezies *N. corynebacterioides* von Yassin und Schaal als *Rhodococcus corynebacterioides* reklassifiziert worden (Yassin und Schaal, 2005). *Nocardia globerula* wurde 1980 in die Approved List of Bacterial Names (IJSB 35, 370) übernommen. Bei der Neubeschreibung der Spezies *Rhodococcus globerulus* (Goodfellow et al. 1982) wurde diese nicht gegenüber *N. globerula* abgegrenzt. Auch in diesem Fall steht der Beweis noch aus, dass *N. globerula* ein Stamm der Spezies *R. globerulus* ist.

4.3 Phylogenie der Gattung *Nocardia* basierend auf 16S-23S rDNA Spacer Daten

Bereits in vorangehenden Analysen des 16S-23S rDNA Spacers wurde das Auftreten von mehreren Operons, die sich in der Primärstruktur unterscheiden, festgestellt (Bercovier et al. 1986, Ji et al. 1994). Nur wenige Stämme der untersuchten Nocardien wiesen keine Interoperonvariabilität im Bereich des Spacers auf und ließen sich auch ohne Überlagerungen in der Sequenz direkt ohne Klonierung sequenzieren. Dies trifft für die Spezies *N. paucivorans* (DSM 44563) und *N. africana* (DSM 44491 T) zu. Im Gegensatz dazu wurden für den Keim *N. asteroides* S546 vier verschiedene und für *N. carnea* Genotyp II sogar fünf verschiedene Operons gefunden, die in ihrer Primärstruktur deutliche Unterschiede aufweisen. Die Interoperonvariabilität im Spacer, die bei den Nocardien festgestellt wurde, ist im Vergleich zu verwandten bereits untersuchten Gattungen wie *Nocardioides* oder *Streptomyces* sehr hoch (Yoon et al. 1998, Hain et al. 1997) und offenbart eine bislang nicht bekannte extrem hohe genetische Heterogenität dieser Gattung. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Vertreter der Gattungen *Tsukamurella* und *Corynebacterioides* zeigen nicht diese enorme Variabilität zwischen den einzelnen Operons. Nur die Stämme der Gattung *Rhodococcus* wiesen eine vergleichbar hohe Interoperonvariabilität wie die Nocardien auf.

Neben der Interoperonvariabilität tritt innerhalb der Spezies auch eine hohe Intraspeziesvariabilität auf. Im Vergleich der Sequenzen ist allerdings festzustellen, dass die einzelnen Operons sich in großen Bereichen ihrer Primärstruktur ähneln. So sind z.B. in der Spezies *N. farcinica* im vorderen Bereich des Spacers nur drei verschiedene Sequenzen zu finden. Auch im hinteren Bereich des Spacers treten nur drei verschiedene Sequenzen auf. Alle 16 sequenzierten Operons unterscheiden sich ausschließlich in der Anordnung dieser Sequenzen. Aufgrund der unterschiedlichen Kombinationen können rechnerisch neun kombinierte Sequenzen resultieren, die auch alle bei den Sequenzierungen gefunden wurden.

Während die hohe Variabilität in den Spacersequenzen der Nocardien für die Aufstellung von RFLP-Mustern oder für das Design von Sonden, die sogar eine Differenzierung auf Stammebene gewährleisten, hilfreich ist, behindert die Interoperonvariabilität doch eine direkte Sequenzierung ohne vorangegangene Klonierung. Die hohe Interspeziesvariabilität schränkt auch den Wert der Spacersequenzen in Datenbanken für die Identifizierung von Keimen z.B. mittels BLAST ein. Somit bietet sich der Spacer für eine Identifizierung basierend auf der Sequenzierung in der Routinediagnostik nur bedingt an.

Trotz der beschriebenen Variabilität im Bereich der 16S-23S rDNA Spacersequenzen kommt es im phylogenetischen Baum zu der Ausbildung mehrerer speziesspezifischer Äste. Diese im Kapitel 3.3.3 dargestellten Verwandtschaften korrelieren in einigen Fällen mit dem phylogenetischen Baum, der basierend auf den 16S rDNA Sequenzen generiert wurde. Dies betrifft insbesondere die Verwandtschaft zwischen *N. sp* (DSM 43301) zur Spezies *N. farcinica*, *N. paucivorans* mit *N. brevicatena* (6), *N. carnea* mit *N. flavorosea* und *N. sp* (Biotyp II) (3), *N. crassostrae* zu *N. otitidiscaviarum*, *N. veterana* mit *N. vaccinii* und *N. africana* (7), *N. uniformis* mit *N. seriolae* und *N. sp* (DSM 43399) (8). Die Zahlen in den Klammern beziehen sich auf die Abbildung 4.

Andere Spezies bilden aufgrund ihrer hohen Interoperonvariabilität keine speziesstabilen Äste aus. Dies trifft im hohen Maße für *N. asteroides* (T), *N. nova*, *N. cyriacigeorgica* und *N. abscessus* zu. Allerdings bilden die einzelnen Operons dieser Keime wieder eigene Zweige aus, die aber an unterschiedlichen Stellen des Baumes aufzufinden sind. Diese Eigenschaft, die bei anderen den Nocardien nah verwandten Gattungen in dieser Form noch nicht analysiert wurde, erschwert die Interpretation des Baumes. Eine weitere deutliche Abweichung zum phylogenetischen Baum basierend auf 16S rDNA Sequenzen ist in der Spezies *N. otitidiscaviarum* aufzufinden. So weist *N. otitidiscaviarum* Genotyp II (DSM 44565) eine deutlich abweichende Position im Vergleich zu dem *N. otitidiscaviarum* type-strain Cluster auf. Dies korreliert auch mit dem aus der RFLP-Tabelle resultierenden

Schnittmuster von diesem Keim, welches als einziges nicht das typische *N. otitidiscaviarum* Muster besitzt.

Aufgrund der Heterogenität der Sequenzen im 16S-23S rDNA Spacer eignet sich dieser nur bedingt für phylogenetische Analysen. Aussagekräftige phylogenetische Ergebnisse lassen sich nur in Verbindung mit den zugehörenden 16S rDNA Sequenzen ziehen. Letztere sind aufgrund der höheren Konserviertheit für phylogenetische Analysen deutlich besser geeignet.

Trotz alledem bieten die ITS Sequenzen die Chance, Analysen zwischen sehr eng verwandten Organismen zu ermöglichen.

4.4 Nachweis der Nocardien mittels gattungsspezifischer PCR und RFLP-Analyse

Trotz der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen hochvariablen Spacersequenzen ließen sich auch konservierte Bereiche finden, die sich für die Entwicklung eines gattungsspezifischen Primers anboten. Insbesondere der Bereich am 3´ Ende des 16S-23S rDNA Spacers in Verbindung mit den ersten Basen der 23S rDNA bot eine gute Möglichkeit, um zwischen den Gattungen zu differenzieren. Mit Hilfe der Primer Sp3 / Sp4 konnte in allen Fällen, sowohl im Rahmen der Forschungsarbeit als auch anschließend in der Routinediagnostik, eine sichere Zuordnung auf Gattungsebene erzielt werden. Die Ergebnisse wurden durch anschließende Sequenzierungen bestätigt.

Durch die entwickelte gattungsspezifische PCR ist es möglich, innerhalb kürzester Zeit sichere Ergebnisse bezüglich der Gattung in der Diagnostik zu erzielen. Da die PCR mit den entwickelten Primern auch direkt mit klinischem Material durchgeführt werden könnte (z.B. im Sputum), ist eine Bestätigung einer Verdachtsdiagnose oder eine Identifizierung auf Gattungsebene sogar innerhalb weniger Stunden möglich, z.B. in Fällen mit einer verdächtigen Gramfärbung mit verzweigten grampositiven Stäbchen im Präparat.

Bereits 1999 wurde eine gattungsspezifische PCR für die Nocardien von Laurent et al. basierend auf 16S rDNA Sequenzen beschrieben. Dieses Verfahren kann zur Gattungsbestimmung der meisten Nocardien eingesetzt werden. Probleme ergeben sich allerdings bei einigen neuen Sequenzen, die den Autoren noch nicht zur Verfügung standen. So weist die Sequenz von *Nocardia sp*. DSM 46067 zwei Mismatches am 3´Ende des von Laurent et al. entwickelten Primers auf und würde daher bei den angegebenen Annealingtemperaturen nicht amplifiziert werden. Das die von Laurent et al. entwickelten Primer nicht alle Nocardien amplifizieren, wurde auch in der Studie von Alfaresi und Elkosh 2006 aufgezeigt. Zusätzlich ist die für die Nocardien als spezifisch dargestellte Sequenz des einen Primers auch bei einigen Rhodococcen (z.B. *R. equi* DSM 20307, AF490539)

aufzufinden. Unabhängig von diesen beschriebenen Widersprüchen, bietet das von Laurent et al. beschrieben Verfahren nicht die Möglichkeit einer anschließenden Speziesidentifikation. Während mit Hilfe der Primer Sp3 und Sp4 schon aus der Größe des Amplifikats oder dem Auftreten von Doppelbanden grobe Informationen über Speziesgruppen gewonnen werden können, ist dies mit der gattungsspezifischen PCR basierend auf der 16S rDNA nach Laurent et al. nicht möglich. So kann z.B. bei einem klinischen Verdacht auf *N. farcinica* bei einer Amplifikatgröße von unter 185 bp dieser schon ausgeschlossen werden.

Das auf dem *65-kDa heat shock* Protein basierende Nachweisverfahren (Steingrube et al. 1995) bietet nach dem Schneiden mit Restriktionsenzymen die Möglichkeit einer Speziesdifferenzierung, kann aber keine Informationen über die Gattung aus der vorausgehenden PCR liefern. Dadurch wird eine schnelle und sichere Identifizierung der Gattung beim Auftreten von neuen Mustern verhindert.

Aufgrund der hohen Intraspezies- und Interoperonvariabilität im Bereich des PCR-Amplifikats fiel es schwer, geeignete Enzyme für die Identifizierung mittels RFLP-Analyse zu finden. Bei der Auswahl mussten viele sonst für RFLP-Muster bewährte Enzyme wie *Cfo*I oder *Hae*III (Roth et al. 2000) aus der ersten Wahl ausgeschlossen werden, da diese das relativ kleine Amplifikat nur sehr selten schnitten und somit eine Differenzierung in nur wenigen Fällen zuließen. Das als erstes ausgewählte Enzym *Mva*I bietet bereits die Möglichkeit, fünf Spezies und vier Genotypen eindeutig zu identifizieren. Da auch 14 von 16 analysierten Stämmen der Spezies *N. cyriacigeorgica* mit Hilfe von *Mva*I im RFLP identifiziert werden konnten, bietet dieses Enzym gerade für diese klinisch bedeutsame Spezies eine gute Zuordnungsmöglichkeit (Schlaberg et al. 2008). Die so gewonnenen RFLP-Muster sind allerdings nicht innerhalb einer Spezies identisch. Auch wenn z.B. alle Vertreter der Spezies *N. farcinica* eindeutig mit Hilfe des Enzyms *Mva*I nachgewiesen werden können, besitzen diese zwei unterschiedliche Schnittmuster. Dies resultiert daraus, dass z.B. dem Stamm DSM 43131 ein Operon fehlt, welches für die ungeschnittene Bande verantwortlich ist. Die Instabilität der RFLP-Muster innerhalb einiger Spezies korreliert mit den phylogenetischen Ergebnissen basierend auf den Spacersequenzen. Aus diesen folgt auch, dass für die Spezies *N. brasiliensis* und *N. cyriacigeorgica* kein Enzym gefunden werden konnte, welches ein für diese Spezies eindeutiges RFLP-Muster liefert. Im Vergleich zu den Nocardien ist bei den Mykobakterien eine deutlich höhere Speziesstabilität innerhalb der RFLP-Muster festzustellen (Roth et al. 2000). Auch wenn insbesondere bei den schnell wachsenden Mykobakterien Interoperonvariabilität im Spacer aufzufinden ist, ist diese deutlich geringer als bei den Nocardien.

Auf der anderen Seite bietet die hohe Sequenzvariabilität bei den Nocardien zwischen den Stämmen in einigen Fällen die Möglichkeit, sogar zwischen den Genotypen einer Spezies zu unterscheiden. So lassen sich *N. carnea* 16S Genotyp I und II und auch die beiden Genotypen der Spezies *N. cyriacigeorgica* basierend auf dem RFLP bis zum Genotyp differenzieren. Diese Unterscheidung gelingt allerdings nicht für die Genotypen in den Spezies *N. nova* und *N. farcinica*.

Durch anschließenden Restriktionsverdau mit dem Enzym *Msp*I lassen sich 18 von 24 untersuchten Spezies eindeutig identifizieren. Nur die sechs klinisch unbedeutenderen Spezies *N. veterana* (T), *N. crassostreae* (T), *N. uniformis*, *N. soli*, *N. fluminea* und *N. cummidelens* und sieben *N. sp*. Stämme können auch jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden. Um auch eine Differenzierung zwischen diesen Spezies zu ermöglichen, wurden die Enzyme *Dde*I und *Hae*III eingesetzt. Nur die beiden untersuchten Referenzstämme *N. soli* DSM 44488 und *N. cummidelens* DSM 44490 ließen sich auch so nicht unterscheiden, diese haben aber keinerlei medizinische Bedeutung. Die verwendeten Referenzstämme wiesen im Unterschied zu ihrer Beschreibung (Maldonado et al. 2000) allerdings die gleiche 16S rDNA Sequenz auf, was auf einen Fehler in der Kultur hinweist.

Für den Routinegebrauch genügen in der Regel zwei Enzyme, da mit diesen die wichtigsten Vertreter der Gattung *Nocardia* identifiziert werden können. Von den 13 *MvaI*-Mustern (siehe Tabelle 12) sind 11 von medizinischer Bedeutung (A, B, E, F bis M), wobei A von geringer Bedeutung ist. Vier dieser 11 Muster sind speziesspezifisch (E und G bis I) und 5 Muster sind nach einem weiteren Enzym speziesspezifisch (B, F, J, L und M; Muster B, F, J und L nach *MspI*- und Muster M nach *DdeI*-Einsatz). Insofern bleiben nur zwei Muster übrig, bei denen die Identifizierung aufwendiger ist (Muster A und K), weil hier alle drei zusätzlichen Enzyme benutzt werden müssen. Ausgenommen davon sind *N. abscessus* (*MspI* 120/65/55 bp) und *N. cyricigeorgica* Genotyp II (*DdeI* 100/ 80 bp). Somit betreffen diese Schwierigkeiten lediglich eine Gruppe von Spezies, die entweder sehr eng miteinander verwandt sind und bei denen zum Teil noch eine Klärung der taxonomischen Verhältnisse aussteht (*N. nova*, *N. africana* und *N. veterana*), d. h. den heterogenen sogenannte *N. nova*-Komplex (Conville et al. 2004), oder *N. sp*. Stämme, deren Spezieszuordnung und klinische Bedeutung noch geklärt werden muss. Das bedeutet, dass beim Auftreten dieser Identifizierungsmuster eine Sequenzierung des 16S rDNA Gens sinnvoll erscheint, weil die Differenzen in den Fragmentlängen zur Unterscheidung der Muster hier recht gering sind. Allerdings lassen sich Unterschiede von 10 bp unter Einsatz von Markern in gut auftrennenden Gelen vom geübten Untersucher

erkennen, was z.B. in der Abbildung 8 zu sehen ist (die Doppelbande bei *N. farcinica* beruht auf einem Größenunterschied von nur 11 Basen).

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte RFLP-Verfahren bietet die Möglichkeit, zwischen 24 anerkannten Spezies und weiteren 17 *N. sp* Stämmen zu unterscheiden. Im Vergleich dazu gelingt es mit der auf der 16S rDNA basierenden Restriktionsanalyse (Conville et al. 2000) nur neun Spezies eindeutig zu identifizieren. Eine Ergänzung der RFLP-Tabelle von Conville et al. wäre allerdings für neue Spezies denkbar, da diese aus den zu den neuen Spezies veröffentlichten 16S rDNA Sequenzen ermittelt werden könnten. Eine Publikation dieser Werte wurde allerdings nicht durchgeführt. Das von Steingrube et al. 1995 entwickele auf dem *65-kDa heat shock* Protein basierende Verfahren bietet nicht die Möglichkeit neue Spezies der Gattung *Nocardia* voneinander zu unterscheiden (Rodriguez-Nava et al. 2006), da Sequenzinformationen für das *65-kDa heat shock* Protein von neu beschriebenen Spezies nicht vorliegen.

Nach Beendigung der experimentellen Arbeit wurden weitere neue Spezies in der Gattung *Nocardia* beschrieben. Eine Ergänzung der Tabelle für die Restriktionsanalyse mit diesen Keimen wäre z.B. im Rahmen der Neubeschreibung durchaus möglich.

Ein Nachteil des Verfahrens ist, dass in der RFLP-Analyse neue Genotypen (z.B. klinische Isolate) oder neue Spezies, wie sie in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, unbekannte Muster aufweisen können und somit eine Spezieszuordnung erschweren. Diese Problematik taucht allerdings auch bei den bereits beschriebenen Nachweisverfahren (Steingrube et al. 1995, Conville et al. 2000) auf. Im Vergleich zu letzteren besitzt die hier entwickelte Methode den großen Vorteil, dass aufgrund der vorangehenden gattungsspezifischen PCR trotzdem eine sichere Gattungszuordnung erfolgen kann.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelte Methode bietet im Vergleich zu vorangehenden Verfahren (Steingrube et al. 1995, Laurent et al. 1999, Conville et al. 2000) als einzige die Möglichkeit, anhand von nur einer PCR sowohl eine sichere Gattungszuordnung als auch durch anschließende RFLP-Analyse des PCR-Produkts eine Speziesidentifizierung zu erhalten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, anhand der hier beschriebenen Ergebnissen und gewonnenen Sequenzdaten des Spacers, in Zukunft weitere modernere molekularbiologische Nachweisverfahren zu entwickeln. So kann z.B. der gattungsspezifische Primer Sp3 als Sonde auf Biochips oder als Primer in Multiplex PCRs eingesetzt werden. Gerade die Region am Ende des 16S-23S rDNA Spacers und der Anfang der 23S rDNA bieten sich für die Entwicklung gattungsspezifischer Primer oder Sonden an. So gelang es z.B. unter Einsatz

zweier gattungsspezifischer Primer und weiterer speziesspezifischer Primer, deren Sequenzen z.T. aus der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, eine Multiplex PCR zu entwickeln, die schnell und zuverlässig zwischen 13 Mykobakterien Spezies und 7 klinisch relevanten Nocardien Spezies unterscheiden kann (Roth et al. 2004). Auch erste erfolgreiche Versuche zum Einsatz von speziesspezifischen Oligonukleotiden auf Biochips zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Nocardien, die im Anschluss zu dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten die Einsatzmöglichkeit des 16S-23S rDNA Spacers in der klinischen Molekularbiologie auf.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Speziesidentifikation basierend auf biochemischen, morphologischen, chemotaxonomischen oder physiologischen Untersuchungen ist für die zu der Gruppe der langsam wachsenden gram positiven Bakterien gehörenden Nocardien zu zeitaufwändig und unsicher.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein sicheres und leistungsstarkes molekularbiologisches Verfahren zu entwickeln, mit dem alle bekannten Nocardien Spezies sowohl auf Gattungs- als auch Speziesebene schnell und sicher identifiziert werden können.

Zur Identifizierung der verwendeten Stämme wurde für 63 Stämme aus 26 anerkannten Spezies die annähernd komplette und für weitere 65 Stämme die partielle 16S rDNA bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden etliche Stämme reklassifiziert und die Spezies *N. pseudovaccinii* (Kim et al. 2002) neu beschrieben. Durch phylogenetische Analysen gelang es, insbesondere auch durch die Einbeziehung neuer Spezies und klinischer Isolate, die Verwandtschaften zwischen den einzelnen Spezies auch im taxonomisch noch ungeklärten *N. asteroides* Komplex zu durchleuchten. Die aus diesem Teil der Arbeit resultierenden Ergebnisse wurden von Roth et al. 2003 publiziert. Die Sequenzierung der 16S rDNA hat sich als ein leistungsstarkes und zuverlässiges Verfahren sowohl für die Identifikation als auch für die phylogenetische Analyse der Nocardien bewährt. Insbesondere partielle Sequenzierungen bieten schon innerhalb kurzer Zeit die Möglichkeit einer zuverlässigen Diagnose.

Da viele Laboratorien nicht über Sequenziermöglichkeiten verfügen, wurde im Rahmen der Arbeit ein neues Verfahren zur Gattungs- und Speziesidentifikation der Nocardien erarbeitet. Dazu wurden der für die Nocardien noch nicht analysierte 16S-23S rDNA Spacer aus 22 Spezies kloniert und 131 Klone komplett sequenziert und veröffentlicht. Zur Entwicklung der gattungsspezifischen Primer wurden auch die Sequenzen nah verwandter Gattungen ermittelt. Bei der Analyse der Sequenzdaten konnte eine im Vergleich zu verwandten Gattungen sehr hohe Interoperonvariabilität festgestellt werden. Bis zu vier unterschiedliche Operons mit einer Abweichung von bis zu 49,6% in der Primärstruktur konnten für einen Stamm gefunden werden. Neben der Interoperonvariabilität wurde auch eine hohe Interspeziesvariabilität im Bereich des 16S-23S rDNA Spacers von bis zu 65% festgestellt.

Auch wenn der phylogenetische Stammbaum basierend auf den Spacersequenzen Verwandtschaften erkennen lässt und in Bereichen mit den Ergebnissen aus der 16S rDNA

Analyse korreliert, bietet sich der Spacer bei den Nocardien aufgrund der enormen Variabilität in der Primärstruktur nur bedingt für phylogenetische Zwecke an. Im Gegensatz dazu bieten die Spacersequenzen gegenüber den konservierten 16S rDNA Sequenzen die Möglichkeit zur Entwicklung eines für die Speziesidentifizierung aller untersuchten Stämme geeigneten RFLP- Schemas.

Das im Rahmen der Arbeit entwickelte Primerpaar Sp3 / Sp4 wurde an 128 Nocardien und 256 Stämmen aus 16 nah verwandten Gattungen evaluiert. Während alle Nocardien von den neuen Primern amplifiziert wurden, fiel die PCR bei allen anderen untersuchten Gattungen negativ aus.

Anhand der gewonnenen Sequenzdaten wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die für die Entwicklung eines RFLP-Schemas basierend auf dem Sp3/4 PCR Amplifikat geeignet erschienen. Unter Einsatz der Enzyme *Mva*I, *Msp*I, *Dde*I und *Hae*III gelang es, alle Spezies der Gattung *Nocardia* eindeutig zu identifizieren. In einigen Fällen gelingt mit Hilfe der RFLP-Analyse nicht nur eine Speziesidentifikation, sondern auch die Zuordnungen von Genotypen.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode gelingt im Gegensatz zu bereits beschriebenen Nachweisverfahren neben der sicheren Gattungsidentifikation auch die Speziesidentifikation. Auch wenn neue Spezies oder Genotypen mit neuen RFLP-Mustern auftreten, ist zumindest die Zuordnung zu der Gattung *Nocardia* mit dieser Methode eindeutig gewährleistet. Eine abschließende Speziesidentifikation kann dann über eine Sequenzierung erfolgen. Da die PCR durch ihre Gattungsspezifität auch erfolgreich aus Patientenmaterialien durchgeführt werden könnte, besteht die Möglichkeit im Falle einer Verdachtsdiagnose einer Nocardiose das molekulargenetische Verfahren für den Direktnachweis einzusetzen.

Durch die entwickelten gattungsspezifischen Primer Sp3 / Sp4 in Kombination mit der RFLP-Analyse wird ein leistungsstarkes, präzises, zeit- und kostensparendes diagnostisches Verfahren zur Identifikation von Nocardien bis zur Spezies- oder gar Subspezies-Ebene für das Routinelabor ohne die Notwendigkeit einer kostenintensiver Sequenzierung zur Verfügung gestellt.

6. VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse der Forschungsarbeit wurden auf folgenden Kongressen in Form von Postern oder Abstracts vorgestellt:

- Präsentation zum Thema „Neue Verfahren zur Speziesidentifikation von Nocardien mittels gattungsspezifischer PCR des 16S-23S rDNA Spacers und RFLP“ auf dem 9. klinisch-mikrobiologisch-infektiologischen Symposium der DGHM in Berlin am 30. November 2000.
- Andrees, S., Roth, A., Reischl, U., Harmsen, D., Kroppenstedt, R.M., Mauch, H. (2001): Novel genus-specific PCR for rapid identification of *Nocardia* based on 16S-23S rDNA spacer sequences and restriction endonucleases. Clinical Microbiology and Infection, Volume 7, Supplement 1: 330. Poster und Abstract im Rahmen des 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Istanbul, Türkei, 1.-4. April 2001
- Präsentation von Teilergebnissen auf der 53. Tagung der DGHM in Aachen zum Thema „Identification of *Nocardia*: reassessment of 16S rDNA sequences and development of a new 16S-23S rDNA based rapid PCR-RFLP diagnostic scheme”, Oktober 2001
- Roth, A., Landt, O., Andrees, S., Mauch, H. (2004): Reliable and rapid detection of clinically relevant Mycobacterium and *Nocardia* species using a multiplex-PCR with genus- and species specific primers. Clinical Microbiology and Infection, Volume 10, Supplement 3: 175-176. Poster und Abstract im Rahmen des 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Prag, Tschechien, 2004

Publikationen:

- Kim, K. K., Roth, A., Andrees, S., Lee, S. T., Kroppenstedt R. M. (2002): *Nocardia pseudovaccinii* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1825-1829
- Mellmann, A., Cloud, J. L., Andrees, S., Blackwood, K., Carroll, K., Kabani, A., Roth, A., Harmsen, D. (2003): Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. Int. J. Med. Microbiol. 293(5): 359-370
- Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R.M., Harmsen, H., Mauch, H. (2003): Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. J. Clin. Microbiol. 41: 851-856

7. LITERATUR

1. Alfaresi, M., Elkosh, A. (2006): Rapid identification of clinically relevant Nocardia species using real-time PCR with SYBR Green and melting-curve analysis. J. Med. Microbiol. 55: 1711-1715
2. Alphey, L.: DNA-Sequenzierung. Heidelberg 1998
3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410
4. Ambaye, A., Kohner, P.C., Wollan, P.C., Roberts, K.L., Roberts, G.D., Cockerill, F.R. (1997): Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-Test and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. J. Clin. Microbiol. 35: 847-852
5. Baba, T., Nishiuchi, Y.,Yano, I. (1997): Composition of mycolic acid species as a criterion in nocardial classification. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 795-801
6. Baracco, G. J., Dickinson, G. M. (2001): Pulmonary nocardiosis. Curr. Infect. Dis. Rep. 3: 286-292
7. Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F. (1991): The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods Appl. 1:51-56
8. Beaman, B.L., Saubolle, M.A., Wallace, R.J. (1995): *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia* and other aerobic actinomycetes of medical importance. In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. 6. Edition
9. Bercovier, H., Kafri, O., Sela, S. (1986): *Mycobacteria* possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 1136-1141
10. Böttger, E.C. (1991): Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie Mycobacteriaceae. Immun. Infekt. 19: 143-152
11. Boiron, P., Provost, F., Chevrier, G., Dupont, B. (1992): Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11: 709-14
12. Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., Pulverer, G.: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart 1994
13. Brown, J.M., McNeil, M.M., Desmond, E.P. (1999): *Nocardia, Rhodococcus, Gordona, Actinomadura, Streptomyces* and other actinomycetes of medical

importance. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Yolken, R.H.: Manual of clinical microbiology. 7. Auflage. Washington 1999

14. Brown-Elliott, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J. (2006): Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 19: 259-282
15. Burkhardt, F.: Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart 1992
16. Carroll, N., Adamson, P., Okhravi, N. (1999): Elimination of bacterial DNA from *Taq* DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. J. Clin. Microbiol. 37: 3402-3404
17. Choi B.K., Wyss C., Göbel U.B. (1996): Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. J. Clin. Microbiol. 34:1922-1925.
18. Chun, J., Goodfellow, M. (1995): A. phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 240-245
19. Chun, J., Seong, C.-N., Bae, K. S., Lee, K.-J., Kang, S. O., Goodfellow, M., Hah, Y. C. (1998): *Nocardia flavorosea* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol.. 48: 901-905
20. Clarridge, J.E. (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev., 17:840-862
21. Cline, J., Braman, J.C., Hogrefe, H.H. (1996): PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res 24(18): 3546-3551
22. Cloud, J. L., Conville, P. S., Croft, A., Harmsen, D., Witebsky, F. G., Carroll, K. C. (2004). Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. J. Clin. Microbiol. 42: 578-584
23. Conville, P. S., Brown, J. M., Steigerwalt, A. G., Lee, J. W., Byrer, D. E., Anderson, V. L., Dorman, S. E., Holland, S. M., Cahill, B., Carroll, K. C., Witebsky, F. G. (2003): *Nocardia veterana* as a pathogen in North American patients. J. Clin. Microbiol. 41: 2560-2568.
24. Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P., Witebsky, F. G. (2000): Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rDNA gene. J. Clin. Microbiol. 38:158-164
25. Conville, P. S., Witebsky, F. G. (2004): Current issues pertaining to the *Nocardia* species. Clin. Microbiol. Newsl. 26: 57-62

26. Conville, P. S., Witebsky, F. G. (2005): Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. J. Clin. Microbiol. 43: 2881-5
27. Conville, P. S., Witebsky, F. G. (2007). Organisms designated as *Nocardia asteroides* Drug Pattern Type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. J. Clin. Microbiol. 45: 2257-2259
28. Corti, M. E., Villafane-Fioti, M. F. (2003): Nocardiosis: a review. Int. J. Infect. Dis. 7: 243-250
29. Couble, A., Rodriguez-Nava, V., de Montclos, M. P., Boiron, P., Laurent, F. (2005) : Direct detection of *Nocardia* spp. in clinical samples by a rapid molecular method. J. Clin. Microbiol. 43: 1921-1924
30. De La Iglesia, P., Viejo, G., Gomez, B., De Miguel, D., Del Valle, A., Otero, L. (2002): Fatal pulmonary *Nocardia farcinica* infection. J. Clin. Microbiol. 40: 1098-1099
31. DSMZ (2002): Catalogue of Strains. Braunschweig: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
32. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Böttger E. C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 17: 7843-7853
33. Eisenblätter, M., Disko, U., Stoltenburg-Didinger, G., Scherübl, H., Schaal, K. P., Roth, A., Ignatius, R., Zeitz, M., Hahn, H., Wagner, J. (2002): Isolation of *Nocardia paucivorans* from the cerebrospinal fluid of a patient with relapse of cerebral Nocardiosis. J. Clin. Microbiol. 40: 3532-3534
34. Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17: 368-376
35. Fux, C., Bodmer, T., Ziswiler, H. R., Leib, S. L. (2003): *Nocardia cyriacigeorgici*: First report of invasive human infection. Dtsch.. Med. Wochenschr. 128: 1038-1041
36. Garcia-Martinez, J., Bescos, I., Rodriguez-Sala, J. J., Rodriguez-Valera, F. (2001): RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. Nucleic Acids Res 29: 178-180
37. Göbel, U. B. (1996): Possibilities and limits of molecular genetic detection methods in medical microbiology. Wishful thinking and reality. Internist (Berl). 37: 919-925

38. Goodfellow, M., Lechevalier, M. P. (1989): Genus *Nocardia* Trevisan 1889. Seiten 2350-2361. In: Holt, J.G., Williams, S.T., Sharpe, M.E. (Herausgeber): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4., Williams und Wilkins, Baltimore, Md.
39. Graham, T. A., Golsteyn-Thomas, E. J., Thomas, J. E., Gannon, V. P. (1997): Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rDNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 863-869
40. Gürtler, V., Stanisich, A. (1996): New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142: 3-16
41. Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., Rainey, F. A. (1997): Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 202-206
42. Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nuc. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98
43. Hamid, M. E., Maldonado, L., Sharaf Eldin, G. S., Mohamed, M. F., Saeed, N. S., Goodfellow, M. (2001): *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. J. Clin. Microbiol. 39: 625-30
44. Harmsen, D., Rothgänger, J., Frosch, M., Albert, J. (2002): RIDOM: ribosomal differentiation of medical microorganisms database. Nuc. Acids Res. 30: 416-417
45. Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680
46. Hollick, G. (1995): Isolation and identification of aerobic actinomycetes. Clin. Microbiol. Newsl. 17: 25-32
47. Isik, K., Chun, J., Hah, Y. C., Goodfellow, M. (1999a): *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 833-837
48. Isik, K., Chun, J., Hah,Y. C., Goodfellow, M. (1999b): *Nocardia uniformis* nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1227-1230
49. Ji, Y.E., Colston, M. J., Cox, R. A. (1994): The ribosomal RNA (rrn) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to rrn operons of pathogenic slow-growers. Microbiology. 140: 2829-2840
50. Ji, Y. E., Kempsell, K. E., Colston, M. J., Cox, R. A. (1994): Nucleotide sequences of the spacer-1, spacer-2 and trailer regions of the rrn operons and secondary structures

of precursors 23S rRNAs and precursors 5S rRNAs of slow-growing mycobacteria. Microbiology 140: 1763-1773

51. Kim, K. K., Roth, A., Andrees, S., Lee, S. T., Kroppenstedt R. M. (2002): *Nocardia pseudovaccinii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1825-1829
52. Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111-120
53. Kiska, D. L., Hicks, K., Pettit, D. J. (2002): Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. J. Clin. Microbiol. 40: 1346-51
54. Kroppenstedt, R. M. (1985): Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics* 20: 173-199
55. Kudo, T., Hatai, K., Seino, A. (1988): *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 173-178
56. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(20): 6955-6959
57. Laurent, F. J., Provost, F., Boiron, P. (1999): Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by16S rDNA gene PCR. J. Clin. Microbiol. 37: 99-102
58. Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. (1970): A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales*:* 393-405
59. Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A. (1970): Chemical comparison as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 435-443
60. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. Darnell, J.: Molekulare Zellbiologie. 2. Auflage. Berlin 1996
61. Lowe, T.M., Eddy, S. R. (1997): tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nuc. Acids Res. 25: 955-964
62. Maldonado, L., Hookey, J. V., Ward, A. C., Goodfellow, M. (2000): The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. Ant. Leeuwenhoek 78: 367-377
63. Mari, B., Monton, C., Mariscal, D., Lujan, M., Sala, M., Domingo, C. (2001): Pulmonary nocardiosis: clinical experience in ten cases. Respiration 68: 382-388

64. Meier, A., Persing, D., Finken, M., Böttger, E. (1993): Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. J. Clin. Microbiol. 31: 646-652
65. Mellmann, A., Cloud, J. L., Andrees, S., Blackwood, K., Carroll, K., Kabani, A., Roth, A., Harmsen, D.(2003): Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and GenBank services in the molecular identification of *Nocardia* species. Int. J. Med. Microbiol. 293: 359-370
66. Mendoza, M., Meugnier, H., Bes, M., Etienne, J., Freney, J. (1998): Identification of *Staphylococcus* spezies by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1049-1055
67. Minero, M.V., Marín, M., Cercenado, E., Rabadán, P.M., Bouza, E., Muñoz, P. (2009): Nocardiosis at the turn of the century. Medicine. 88(4): 250-261
68. Morgan, E.A. (1986): Antitermination mechanisms in rRNA operons of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 168: 1-5
69. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Biotechnology. 24:17-27
70. Muňoz, J., Mirelis, B., Aragon, L. M., Gutierrez, N., Sanchez, F., Espanol, M., Esparcia, O., Gurgui, M., Domingo, P., Coll, P. (2007): Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. J. Med. Microbiol. 56: 545-550
71. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Yolken, R. H.: Manual of clinical microbiology. 7. Auflage. Washington 1999
72. Newton, C.R., Graham, A.: PCR. 2. Auflage. Heidelberg 1994
73. Patel, J.B. (2001): 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol. Diagn. 6: 313-321
74. Patel, J. B., Wallace, R. J. Jr., Brown-Elliott, B. A., Taylor, T., Imperatrice, C., Leonard, D. G. B., Wilson, R. W., Mann, L., Jost, K. C., Nachamkin, I. (2004): Sequence-based identification of aerobic Actinomycetes. J. Clin. Microbiol. 42: 2530-2540
75. Pottumarthy, S., Limaye, A. P., Prentice, J. L., Houze, Y. B., Swanzy, S. R., Cookson, B. T. (2003): *Nocardia veterana*, a new emerging pathogen. J. Clin. Microbiol. 41:1705-1709
76. Rainey, F. A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., Stackebrandt, E. (1995): Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the

evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. Microbiology 141: 523-528

77. Rodriguez-Nava, V., Couble, A., Devulder, G., Flandrois, J., Boiron, P., Laurent, F. (2006): Use of PCR-Restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of Nocardia species. J. Clin. Microbiol. 44: 536-546
78. Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, H., Mauch, H. (2003): Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. J. Clin. Microbiol. 41: 851-856
79. Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W., Mauch, H. (1998): Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rDNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 36: 139-147
80. Roth, A., Reischl, U., Kroppenstedt, R., Mauch, H. (2000): Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. J. Clin. Microbiol. 38: 1094-1104
81. Roth, A., Landt, O., Andrees, S., Mauch, H. (2004): Reliable and rapid detection of clinically relevant Mycobacterium and *Nocardia* species using a multiplex-PCR with genus- and species specific primers. Clinical Microbiology and Infection, Volume 10, Supplement 3: 175-176.
82. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425
83. Saubolle, M. A., Sussland, D. (2003): Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience. J. Clin. Microbiol. 41: 4497-4501
84. Schaal, K. P.: Die Aktinomyzeten. in: Brandis, H., Eggers, H. J., Köhler, W., Pulverer, G. (Hrsg.): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart 1994: 563-580
85. Schaal, K. P.: Pathogene, aerobe Aktinomyzeten. in: Burkhardt, F. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart 1992: 258-268
86. Schlaberg, R., Huard, R. C., Della-Latta, P. (2008): *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. J. Clin. Microbiol. 46: 265-273

87. Schuppler M., Mertens F., Schon G., Göbel U.B. (1995): Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. Microbiology 141:513-521
88. Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (1980): Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420
89. Steingrube, V. A., Brown, B. A., Gibson, J. L., Wilson, R. W., Brown, J., Blacklock, Z., Jost, K., Locke, S., Ulrich, R. F., Wallace, R.J. (1995): DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. J. Clin. Microbiol. 33:3096-3101
90. Steingrube, V. A., Wilson, R. W., Brown, B. A., Kenneth, C. J., Blacklock, Z., Gibson, J. L., Wallace, R.J. (1997): Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. J. Clin. Microbiol. 35: 817-822
91. Tsukamura, M. (1982): Numerical analysis of the taxonomy of *Nocardiae* and *Rhodococci*. Microbiol. Immunol. 26: 1101-19
92. Turenne, C. Y.,Tschetter, L. Wolfe, Y., Kabani, A. (2001): Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 39: 3637-3648
93. Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994): TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Appl. Biosci.10(5): 569-570
94. Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1997): Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. Comput. Appl. Biosci. 13(3): 227-230
95. Wallace, R. J., Jr., Steele, L. C., Sumter, G., Smith, J. M. (1988a): Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1776-1779
96. Wallace, R. J., Jr., Steele. L. S. (1988b): Susceptibility testing of *Nocardia* species for the clinical laboratory. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 9: 155-166
97. Wallace, R. J., Jr., Tsukamura, M., Brown, B., Brown, J., Steingrube, V., Zhang, Y., Nash, D. (1990): Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica.* J. Clin. Microbiol. 28: 2726-2732

98. Wallace, R. J., Jr., Brown, B. A., Tsukamura, M., Brown, J. M., Onyi, G. O. (1991): Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. J. Clin. Microbiol. 29: 2407-2411

99. Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L., Goodfellow. M. (2001): *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1783-1788

100. Wauters, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Vaneechoutte, M., Delmee, M. (2005): Distribution of Nocardia species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. J. Clin. Microbiol. 43: 2624-2628

101. Wayne, L. G., Brenner, D., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Starr, M. P., Trüper, H. G. (1987): Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. .J Syst. Bacteriol. 37: 463-464

102. Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173(2): 697-703

103. Wilson, K., Blitchington, R., Greene, R. (1990): Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 1942-1946

104. Wink, M., Wehrle, H.: PCR im medizinischen und biologischen Labor. Darmstadt 1994

105. Xiao, M., Kong, F., Sorrell, T., Cao, Y., Lee, O. C., Liu, Y., Sintchenko,V., Chen, S. (2010): Identification of pathogenic *Nocardia* species by reverse line blot hybridization targeting the 16S rRNA and 16S-23S rRNA gene spacer regions. J. Clin. Microbiol. 48: 503-511

106. Yano, I., Imaeda, T., Tsukamura M.(1990): Characterization of *Nocardia nova*. Int. J. Sys. Bacteriol. 40: 170-174

107. Yassin, A. F., Rainey, F. A., Burghardt, J., Brzezinka, H., Mauch, M., Schaal, K. P. (2000a): *Nocardia paucivorans* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 803-809

108. Yassin, A. F., Rainey, F. A., Steiner, U. (2001): *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1419-1423

109. Yassin, A. F., Rainey, F. A., Mendrock, U., Brzezinka, H., Schaal, K. P. (2000b): *Nocardia abscessus* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1487-1493

110. Yassin, A. F., Schaal, K. P. (2005): Reclassification of Nocardia corynebacterioides Serrano et al. 1972 (Approved Lists 1980) as Rhodococcus corynebacterioides comb. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1345-1348.

111. Yoon, H. J., Lee, S. T., Kim, S. B., Goodfellow, M., Park, Y.H. (1997): Inter- and intraspecific genetic analysis of the genus *Saccharomomospora* with 16S to 23S ribosomal (rDNA) an 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 661-669

112. Yoon, H. J., Lee, S.T., Park, Y.H. (1998): Genetic analyses of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S-23S rDNA inteDNAlly transcribed spacer sequences. Int. J. Syst. Bacteriol 48: 641-650

ERKLÄRUNG

„Ich, Sebastian Andrees, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen des 16S-23S rDNA Spacers der Gattung *Nocardia* und seine Bedeutung für die Speziesidentifizierung mittels gattungsspezifischer PCR und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum Unterschrift

LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

DANKSAGUNGEN

- Prof. Dr. Harald Mauch und Dr. Andreas Roth Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin, HELIOS Klinikum Emil von Behring, Berlin für die fachliche Beratung und kritische Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit
- Dr. Dag Harmsen für die Unterstützung bei der partiellen Sequenzierung der 16S rDNA
- Dr. Udo Reischl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg für die Möglichkeit zur Hospitation und Mitarbeit an seinem Institut im Rahmen der Klonierung und Sequenzierung von 16S-23S rDNA Spaceramplifikaten
- Prof. Dr. Pauli, Dr. Goltz und Herrn Pociulli, Robert Koch Institut Berlin, Abteilung DNA Sequenzierung, für die Sequenzierungsläufe sowohl einiger 16S rDNA Sequenzen als auch ITS Sequenzen
- Prof. Dr. Reiner Maria Kroppenstedt, DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig für die Bereitstellung von Referenzstämme aus der Gattung *Nocardia* und weiterer naher verwandter Gattungen
- Olfert Land, Tib Molbiol, Berlin für die Bereitstellung von PCR- und Sequenzierungsprimern