

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock**

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

Gram-positive Stäbchenbakterien im Urin – eine epidemiologische und methodische Analyse

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock**

vorgelegt von

Kerstin Schwinge

aus Berlin

Rostock, 2019

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Schillingallee 70, 18057 Rostock

2. Gutachter: PD Dr. med. habil. Änne Glass

Universitätsmedizin Rostock, Institut für Biostatistik
und Informatik in Medizin und Altersforschung
Ernst-Heydemann-Str. 8 18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Dalpke

Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät
Carl Gustav Carus, Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Hygiene, Institut für Virologie
Fetscherstr. 74, 01307 Dresden

Jahr der Einreichung: 2019

Datum der Verteidigung: 17.03.2020

Gram-positive Stäbchenbakterien im Urin – eine epidemiologische und methodische Analyse

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5			
1.1	Humanpathogene Bedeutung coryneformer Bakterien	6			
1.2	Diagnostik bei Harnwegsinfektionen	8			
1.3	Mikromorphologie Gram-positiver Stäbchenbakterien	9			
1.4	Anzucht und Koloniemorphologie Gram-positiver Stäbchenbakterien	9			
1.5	Erregerdifferenzierung coryneformer Bakterien	10			
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	11			
2	Material und Methoden	13			
2.1	Bakterienstämme und Enzyme	13			
2.2	Nährmedien und Puffer	13			
2.3	Laborgeräte	13			
2.4	Verbrauchsmaterialien	14			
2.5	Chemikalien	14			
2.6	Software	15			
2.7	Versuchsaufbau	15			
2.7.1	Patientenkollektiv	16			
2.7.2	Ausgangsmaterial	16			
2.7.3	Einschlusskriterien	17			
2.7.4	Ausschlusskriterien	17			
2.7.5	Inkubationsbedingungen	17			
2.7.6	Makroskopische Selektion und Kultivierung der Referenzstämme	17			
2.8	Färbung nach Gram	17			
2.9	Erregerdifferenzierung mittels Massenspektrometrie	18			
2.10	Erregerdifferenzierung mittels biochemischer Stoffwechselreaktionen	18			
2.11	Erregerdifferenzierung durch molekularbiologische Methoden (PCR und Sequenzierung)	19			
2.12	Herstellung von tiefgefrorenen Referenzproben	19			
2.13	Ethik	19			
3	Ergebnisse	20			
3.1	Identifizierungen der Spezies unter Verwendung des Massenspektrometers (MALDI-TOF)	20			
3.1.1	Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Saramis-Datenbank	20			
3.1.2	Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Myla-Datenbank	21			
3.2	Erregerdifferenzierung nach Prüfung biochemischer Stoffwechselreaktionen (API Coryne)	22			
3.3	Erregerdifferenzierung mittels 16S rDNA-Gensequenzierung	23			
3.4	Methodenvergleich	26			
3.4.1	Vergleich der Differenzierungserfolge mittels Massenspektrometrie (Saramis-Datenbank) bzw. 16 rDNA-Gensequenzierung	26			
3.4.2	Vergleich der Differenzierungserfolge mittels Massenspektrometrie (Myla-Datenbank) bzw. 16S rDNA-Gensequenzierung	26			
3.4.3	Vergleich der Differenzierungserfolge mittels biochemischer Testung bzw. 16S rDNA-Gensequenzierung	27			
3.5	Beschreibung des Erregerspektrums in Bezug auf das Alter des Patienten	28			
3.6	Beschreibung des Erregerspektrums in Bezug auf das Geschlecht des Patienten	33			
3.7	Beschreibung des Erregerspektrums in Relation zur Art der untersuchten Urinproben	35			
3.8	Auswirkung der Inkubationszeit auf die Menge an bis zur Speziesebene differenzierten Gram-positiven Stäben	38			
3.8.1	Status am Tag 2 der Inkubation	38			
3.8.2	Status am Tag 4 der Inkubation	39			
4	Diskussion	41			
4.1	Betrachtungen zu den Genera <i>Actinobaculum/Actinotignum</i> , <i>Actinomyces</i> und <i>Corynebacterium</i>	42			
4.1.1	Erläuterungen zu assoziierten Erkrankungen und Harnwegsinfektionen	42			
4.1.2	Erläuterungen zu katheterassoziierten Infektionen	43			
4.1.3	Erläuterungen zu Assoziationen bezüglich des Alters der Patienten	44			
4.1.4	Erläuterungen zu Assoziationen bezüglich des Geschlechts der Patienten	44			
4.2	Betrachtungen zu den Differenzierungsmethoden (API Coryne, Massenspektrometrie, 16S rDNA-Gensequenzierung)	45			
4.3	Betrachtungen zur Verlängerung der Inkubationsdauer	47			
4.4	Aktuelle Entwicklungen	47			
5	Zusammenfassung	49			
	Anhang	50			
	Abkürzungen	50			
	Tabellenverzeichnis	51			
	Quellenverzeichnis	54			

1 Einleitung

Infektionen des Urogenitaltraktes zählen zu den häufigsten Infektionserkrankungen des Menschen. Es gibt eine Vielzahl von uropathogenen Erregern, wobei die Routinediagnostik auf das Erkennen der häufigsten Erreger spezialisiert ist. Dabei unterscheidet man die unkomplizierte von der komplizierten Infektion.

Von einer unkomplizierten Harnwegsinfektion wird ausgegangen, sobald eine manifeste Symptomatik besteht ohne das Vorliegen von funktionellen oder anatomischen Anomalien, Nierenfunktionsstörungen oder sonstigen Vor- oder Begleiterkrankungen, die die Entstehung einer Harnwegsinfektion begünstigen. Die typische Symptomatik ist dabei abhängig vom Ort der Infektion. Die untere Harnwegsinfektion betrifft die Blase und die Harnröhre und verursacht Alg- oder Pollakisurie und suprapubische Schmerzen. Bei einer Infektion der oberen Harnwege (Niere und Nierenbecken) wird Flankenschmerz, ein klopfschmerzhaftes Nierenlager sowie Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ beschrieben.

Wesentliche Unterschiede bestehen nicht nur in der betroffenen Anatomie und der Symptomatik, sondern auch im ursächlichen Keimspektrum. Dabei ist relevant, ob es sich um eine ambulant oder nosokomial in Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt oder dem Aufenthalt in einer Pflegeeinrichtung erworbene Infektion handelt.

Bei der unkomplizierten, häufig ambulant erworbenen Harnwegsinfektion wird in bis zu 80 % der Fälle *Escherichia coli* als Gram-negatives Stäbchenbakterium in der mit etablierten „klassischen“ Methoden durchgeführten Urinkultur gefunden (Ulett, G.C. et al., 2013). Seltener isoliert man Enterokokken, Staphylokokken, Klebsiellen und in unter 5 % der Infektionen *Proteus spp.*

Zu den häufigsten Genera der nosokomialen Harnwegsinfektionen zählen neben Enterokokken, Staphylokokken und einem breiteren Spektrum an Enterobakterien auch Nonfermenter wie z. B. Pseudomonaden und Pilze, hier vor allem *Candida spp.* Bezogen auf die typischerweise betroffenen Personen tritt die unkomplizierte Infektion eher bei nicht schwangeren Frauen in der Prämenopause, bei Schwangeren ohne begünstigende Begleiterkrankungen sowie bei Frauen in der Postmenopause auf. Eher von einer komplizierten Infektion betroffen sind Personen mit anatomischen und/oder funktionellen Anomalien des Urogenitalsystems, jüngere Männer, immunsupprimierte Personen sowie Diabetiker mit instabiler Stoffwechsellage.

Tatsächlich sind die Harnwege vom Orificium urethrae bis zum Nierenbecken wahrscheinlich bei allen Menschen physiologischerweise mit Mikroorganismen besiedelt. Dies ist allerdings nur durch molekulare Verfahren, sog. Metagenomics, nachweisbar (Aragon, I.M. et al., 2018; Santiago-Rodriguez, T.M. et al., 2015). Bei symptomatisch Harnwegserkrankten finden sich allerdings mittels Metagenom-Analysen die mit klassischen Kulturverfahren nachgewiesenen Erreger in stark erhöhter Menge (Moustafa, A et al., 2018), weswegen die Kulturverfahren bis auf weiteres als hinreichend sensitiv für die Untersuchung von Harnwegsinfektionen zu werten sind. Dies umso mehr, weil auch mit einer Verfeinerung der Kulturmethoden Informationsgewinne über das Niveau der klassischen Verfahren hinaus erzielt werden können (Hilt, E.E. et al., 2014).

Die Mikroorganismen im Urogenitaltrakt unterliegen bestimmten Einflüssen, die deren Zusammensetzung ändern und somit Erkrankungen fördern oder verhindern können. Morand et al. verglichen in ihrer Studie das Mikrobiom des Darmtraktes mit dem des Harntraktes (Morand, A. et al., 2019). Sie konnten zeigen, dass über 20 % der gefundenen Erreger in beiden Systemen zu finden sind und dass eine verminderte Diversität unter den Spezies und Grunderkrankungen

wie Nierensteine als Risikofaktoren für die Entwicklung von Harnwegsinfektionen gelten. Es ist bekannt, dass Probiotika und/oder eine Stuhltransplantation eine Re-Kolonisierung des Darmes nach langen Antibiotikatherapien mit protektiven Stämmen positiv beeinflussen können (Vidlock, E.J. et al., 2012; Xu, M. et al., 2015). Morand et al. führten an, dass Imbalancen im Mikrobiom des Harntraktes und dadurch bedingte rezidivierende Infektionen möglicherweise auch durch eine Stuhltransplantation therapierbar werden.

Ältere Patienten leiden aufgrund von niedriger Trinkmenge, eingeschränkter Nierenfunktion und/oder Inkontinenz häufig an Harnwegsinfektionen. Es findet sich hier meist ein anderes Keimspektrum als bei Jüngeren, was unter anderem mit der höheren Anzahl der Hospitalisierungen und der damit verbundenen Exposition zu einem anderen Keimspektrum sowie der zu Recht oder Unrecht erfolgten Antibiotikatherapien zusammenhängt (Cai, T. et al., 2015).

Ebenso spielt auch die sexuelle Aktivität bei der Entwicklung einer Harnwegsinfektion eine wichtige Rolle. So ist bei jungen Frauen die Infektion vor allem mit *Staphylococcus saprophyticus* als Honeymoon-Cystitis bereits seit längerem bekannt (Hovelius, B. et al. 1984).

In seltenen Fällen werden auch Gram-positive, coryneforme Bakterien aus der Urinkultur isoliert. Diese werden jedoch meist als Kontaminanten beziehungsweise Teil einer Gram-positiven Mischflora angesehen und werden deshalb häufig nicht weiter differenziert und getestet. Als potentielle Uropathogene können diese Spezies aber durchaus Relevanz haben.

Wie viele Harnwegsinfektionen wegen der ggf. falschen Einordnung von potentiellen Harnwegspathogenen als physiologische Standortflora nicht adäquat therapiert werden, lässt sich schwer abschätzen. Eine spezifischere Analyse der Mischflora wird bereits von einigen Autoren gefordert und ist technisch ohne weiteres möglich, jedoch in der Regel mit einem höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Dieser steht in direktem Kontrast zu dem Wunsch der behandelnden Ärzte nach zeitnahen Ergebnissen (Siegman-Igra, Y. et al. 1994).

Bei der Art der Probengewinnung unterscheidet man invasive von nicht-invasiven Methoden, wobei vor allem die Kontaminationsrate einen wesentlichen Faktor in der Wahl der Methode darstellt. Als gängige nicht-invasive Methode gilt hier die Gewinnung von Mittelstrahlurin durch den Patienten selbst, wobei jedoch aufgrund fehlerhafter Vorgehensweise mit einer hohen Kontaminationswahrscheinlichkeit mit Hautflora zu rechnen ist. Soll Urin aus dem oberen Harnwegstrakt gewonnen und eine Kontamination mit Vaginal-, Urethral- oder Hautflora minimiert werden, so ist eine invasive Gewinnung mittels suprapubischer Punktion erforderlich.

1.1 Humanpathogene Bedeutung coryneformer Bakterien

Zu den Genera, die überwiegend medizinisch relevante, coryneforme Spezies bilden, zählen z. B. die Corynebakterien, die *Actinomyceten* oder die *Actinobaculum/Actinotignum* spp.. Tabelle 1.1 im Anhang dieser Arbeit gibt einen Überblick über die taxonomische Einteilung dieser drei Genera, die in dieser Arbeit im Speziellen betrachtet werden. Zum Genus *Actinobaculum/Actinotignum* sind fünf Spezies bekannt, zu den *Actinomyces* 50 und *Corynebacterium* zählen aktuell 134 Spezies.

In der Regel sind coryneforme Bakterien apathogener Bestandteil der Haut- und Schleimhautflora des Menschen. Einige Arten sind als pathogen beschrieben, andere gelten als opportunistische

Krankheitserreger. Nicht alle Arten sind ubiquitär, das heißt hier an jeglichen anatomischen Oberflächen aller Menschen, vorhanden.

So befinden sich *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp. und *Corynebacterium amycolatum* und *striatum* vorwiegend auf der Haut. Im Bereich des Oropharynx werden häufig *Rothia dentocariosa* und *C. durum* isoliert. Fast ausschließlich in Abstrichen des äußeren Gehörgangs werden *C. auris* und *Turicella otitidis* gefunden. *C. macginleyi* wird vermehrt im Bereich des Auges, speziell auf der Konjunktiva, nachgewiesen (Joussen, A.M. et al., 2000).

Eine große klinische Bedeutung hat auch *C. diphtheriae*, welches als Erreger der Haut- und Respirationstrakt-Diphtherie bekannt ist. Bei Wundinfektionen werden *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. pseudotuberculosis* und *C. ulcerans* oder *Dermabacter* spp. isoliert. Fulminante Verläufe dieser Infektionen mit Ausbildung einer Endokarditis und Sepsis mit Todesfolge wurden für verschiedene *Corynebacterium* spp. beschrieben (Perez-Parra, S. et al., 2016; Belmares, J. et al., 2007; Rezaei Bookani, K. et al., 2018). Bei schweren Erkrankungen der unteren Atemwege konnten ebenso *Corynebacterium* spp. nachgewiesen werden (Díez-Aguilar, M. et al., 2012). *Actinomyces* spp. können eine Aktinomykose verursachen, die zur Abszessbildung im Oropharynx oder seltener im abdominogenitalen Bereich führt (Kononen, E. et al., 2015).

Besonders im Urogenitaltrakt wird *C. amycolatum*, *C. aurimucosum* und *C. glucuronolyticum* detektiert, die hier Harnwegsinfektionen hervorrufen können. Zu den bekannten Harnwegsinfektionserregern gehört auch *C. urealyticum*. Durch die hohe Ureaseaktivität dieser Bakterienspezies kann es zu einer Alkalisierung des Urins und damit zur Entstehung von Struvitsteinen im Harnwegssystem kommen (Soriano, F. et al., 2008; Stickler D.J. et al., 2014). Dies stellt eine Komplikation einer zunächst harmlos verlaufenden Infektion dar, die im Verlauf zu der Notwendigkeit operativer Intervention führen oder einen längeren stationären Aufenthalt wegen systemischer Infektion nach sich ziehen kann.

Für *Actinomyces* spp. werden opportunistische Infektionen des Urogenitaltrakts in Zusammenhang mit einer Verletzung der Haut- oder Schleimhautbarriere durch ein Trauma oder eine Operation beschrieben (Kononen, E. et al., 2015).

Als Uropathogen mit einem hohen Potential für komplizierte Krankheitsverläufe wurde *Actinotignum* beschrieben, da es eine Resistenz gegen einige Antibiotika aufweist (Lotte, R. et al., 2016; Nielsen, H.L. et al., 2010).

Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Erkrankungen, die in Zusammenhang mit coryneformen Bakterien stehen.

Tab. 1.2

Krankheitsassoziationen coryneformer Bakterien (Zasada, A.A. et al., 2018; Mosiej, E. et al., 2018; Leal, S.M. et al., 2016; Mushtaq, A. et al., 2016; Hacker, E. et al., 2016; Bittel, M. et al., 2018; Díez-Aguilar, M. et al., 2012; Clarke, T.M. et al., 2010; Yang, K. et al., 2018; Clarridge, J.E. et al., 2002; Pedersen, H. et al., 2017)

Spezies	Erkrankung
<i>A. radingae</i>	Abszesse
<i>A. turicensis</i>	Abszesse, Ulcera
<i>A. schaalii</i>	Urogenitalinfekte
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	nekrotisierende Faszitiis
<i>Arthrobacter</i> spp.	Bakteriämie, Wund- und Fremdkörperinfekte
<i>Brevibacterium</i> spp.	Bakteriämie, Fremdkörperinfekte
<i>C. accolens</i>	Pneumonie
<i>C. afermentans</i>	Lungenempyem
<i>C. amycolatum</i>	Wund- und Fremdkörperinfekte, Bakteriämie
<i>C. aurimucosum</i>	Urogenitalinfekte
<i>C. diphtheriae</i> (toxinpositiv)	Pharyngeal- und Hautdiphtherie
<i>C. diphtheriae</i> (toxinnegativ)	Endokarditis, Pharyngitis, Fremdkörperinfekte
<i>C. glucuronolyticum</i>	Urogenitalinfekte
<i>C. jeikeium</i>	Wundinfekte, Pneumonie, Endokarditis, Bakteriämie, Meningitis
<i>C. macginleyi</i>	Infektionen des äußeren Auges, Pneumonie
<i>C. propinquum</i>	Pneumonie, Exazerbation chronischer Atemwegserkrankungen
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Pneumonie, Exazerbation chronischer Atemwegserkrankungen
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Pneumonie, Diphtherie
<i>C. striatum</i>	Pneumonie, Lungenempyem, Exazerbation chronischer Atemwegserkrankungen
<i>C. tuberculostearicum</i>	Wund- und Katheterinfektionen, Bakteriämie, Endokarditis
<i>C. ulcerans</i>	Pneumonie, Diphtherie
<i>C. urealyticum</i>	Harnwegsinfekte, Pneumonie, Bakteriämie, Wundinfektionen, Osteomyelitis
<i>C. xerosis</i>	Pneumonie
<i>Dermabacter hominis</i>	Bakteriämie, Wundinfektionen

1.2 Diagnostik bei Harnwegsinfektionen

Bei Verdacht auf eine Infektion des Urogenitaltraktes wird zunächst eine Probe des Urins gewonnen und zur Kultivierung möglicher Bakterien ins mikrobiologische Labor geschickt. Nach Auftragen des Urins auf entsprechende Nährmedien, meist ein Universalmedium wie Columbia-Blut-Agar und ein Selektivmedium für Gram-negative Stäbchenbakterien, werden diese für 48 Stunden bei 36 +/- 1°C aerob inkubiert. Es folgt die Analyse und Bewertung durch das Laborpersonal. Hierfür werden mikrobiologische Qualitätsstandards herangezogen, sowie auch Hemmstofftests durchgeführt. Dabei geht auch die Leukozytenanzahl im Urin mit in die Bewertung ein.

1.3 Mikromorphologie Gram-positiver Stäbchenbakterien

Stäbchenbakterien können eine pleomorphe Gestalt in der Lichtmikroskopie aufweisen. Neben der einfachen Stabform gibt es eine keulenförmige (d. h. coryneforme) sowie als Palisaden erscheinende Morphen. Die letztere Morphe hat ihren Ursprung in einer besonderen Form der Zellteilung, die als Schnappteilung bezeichnet wird (Krulwich, T.A. et al., 1971). Die inneren Anteile der Zellwand teilen sich hierbei, während die äußeren Wandanteile bestehen bleiben, bis sie an einer Seite einreißen. An der gegenüberliegenden Seite bleiben die Zellen verbunden, was im mikroskopischen Bild zu der typischen v- oder palisadenartigen Struktur führt.

1.4 Anzucht und Koloniemorphologie Gram-positiver Stäbchenbakterien

Um die Gram-positiven Stäbchenbakterien für die vorliegende Arbeit zu identifizieren, war Kenntnis über das Wachstumsverhalten und die Morphologie entsprechender Bakterien wichtig. So konnten charakteristische Kolonien gezielt isoliert und weiter differenziert werden.

Der überwiegenden Zahl von Gattungen unter den Gram-positiven Stäben reicht ein einfaches Nährmedium wie Columbia-Blut-Agar zum Wachstum aus. Sie bevorzugen meist ein Temperatur-optimum zwischen 35–37°C und kapnophile (d. h. eine Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt) Kulturbedingungen, tolerieren aber auch aerobe Kulturbedingungen. Nach zwei Tagen Inkubation sind einige Spezies auf dem Nährmedium bereits gut groß makroskopisch sichtbar, andere dagegen noch nicht oder nur in sehr zarten Kolonien. Hierbei spielt auch die Lipophilie der Spezies eine große Rolle, denn lipophile Spezies wie *C. glucuronolyticum* wachsen sichtbar auch nach 24-stündiger Inkubation, währenddessen nicht-lipophile Spezies erst nach längerer Inkubation in zarten Pinpoint-Kolonien kultivierbar sind.

In der Routinediagnostik ist es, bedingt durch das zarte Wachstum, oft erst nach vier Tagen Inkubation möglich, die coryneformen Erreger makroskopisch zu erkennen. Nicht selten sind sie auch von einem dominierenden Erreger wie *E. coli* so stark überwachsen, dass zeitintensive Subkulturen auf Selektivmedien für die Darstellung von Reinkulturen notwendig sind.

Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über ausgewählte Spezies coryneformer Bakterien und deren Koloniemorphologie, Koloniegröße und -farbe, sowie dem Hämolyseverhalten.

Tab. 1.3
Morphologie und Hämolyseverhalten ausgewählter coryneformer Bakterien (Funke, G. et al., 1996; Funke, G. et al., 1997)

Spezies	Koloniegröße in mm nach ca. 24 h Inkubation	Farbe	Kulturmorphologie	Hämolyseverhalten
<i>A. turicensis</i>	1	graubraun-creme	flach	k. A.
<i>A. schaalii</i>	<1	grau-weiß	glänzend, glatt	k. A.
<i>Brevibacterium</i> spp.	>2	weiß-grau oder gelb	erhaben, cremig, glatt, glänzend	k. A.
<i>C. amycolatum</i>	1 bis 2	grau-weiß	trocken, wachsartig, unregelmäßiger Rand	k. A.
<i>C. glucuronolyticum</i>	1 bis 1,5	weiß-gelb	erhaben, cremig	keine
<i>C. jeikeium</i>	0,5 bis 1	grau-weiß	leicht erhaben, glatter Rand	keine
<i>C. propinquum</i>	1 bis 2	weiß	trocken, matt, glatter Rand	keine
<i>C. xerosis</i>	1 bis 1,5	gelb pigmentiert	trocken, körnig, unregelmäßiger Rand	keine
<i>C. ulcerans</i>	1 bis 2	grau-weiß	trocken, wachsartig	schwache Betahämolyse
<i>Turicella otitidis</i>	1 bis 1,5	weiß	erhaben, cremig, glatter Rand	k. A.

k. A. = keine Angabe

1.5 Differenzierung coryneformer Bakterien

Um eine schnelle und kostengünstige Differenzierung coryneformer Spezies zu erzielen, kann eine massenspektrometrische Analyse aus Koloniematerial erfolgen. Hierbei wird eine kleine Probe der Bakterienkolonie auf einen speziellen Metall- oder Plastikträger aufgetragen, mit organischen Säuren angedaut, um dann mittels Laserbestrahlung in einem Vakuum verdampft zu werden. Die Bruchstücke der Zellbestandteile werden massenspektrometrisch getrennt. Die dabei mengenmäßig besonders stark vertretenen ribosomalen Proteine erzeugen in der Massendetektion ein spektrales Muster, welches mit einer Datenbank abgeglichen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Saramis-Datenbank als auch die Myla-Datenbank als Nachfolgeversion mit erweitertem Spektrenspeicher verwendet. Speziell im Bereich der coryneformen Bakterien sind die verfügbaren Datenbanken bisher unvollständig, was eine Limitation dieser Methode darstellt.

Klassisch werden Bakterien anhand charakteristischer biochemischer Stoffwechselformparameter identifiziert, so auch die coryneformen Bakterien. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte setzte sich für diesen Zweck die Verwendung kommerzieller präkonfektionierter Testgebilde durch. Konkret für Corynebakterien ist dies der API Coryne-Testkit. So ist z. B. die Aktivität bestimmter Enzyme wie der Katalase oder der Urease eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Genera. Eine Differenzierung in fermentativen und oxidativen Stoffwechsel ist ebenso zielführend wie auch die Säurebildung aus verschiedenen Zuckern. Eine Schwierigkeit für die Differenzierung mittels API Coryne-Testkit stellt die Herstellung einer sehr bakterienreichen Suspension (d. h. eine optische Dichte entsprechend dem McFarland Standard 6) dar. Durch das teilweise sehr zarte Wachstum

vieler Isolate war die Passage auf zahlreiche Columbia-Blut-Agar-Platten erforderlich, um genügend Material suspendieren zu können.

Charakteristische biochemische Stoffwechselformparameter sowie das Gattungs- bzw. Spezies-spezifische Verhalten ausgewählter Gram-positiver Spezies in den entsprechenden Tests sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

Tab. 1.4
Biochemische Stoffwechselformparameter ausgewählter coryneformer Bakterien (Funke, G. et al., 1997)

Spezies	Fermentation/Oxidation	Nitratreduktion	Urease	Esculinhydrolyse	Pyrazinamidase	Säurebildung aus					CAMP-Test	Katalase
						Glukose	Maltose	Xylose	Mannitol	Saccharose		
<i>C. ulcerans</i>	F	-	+	-	-	+	+	-	-	-	rev	+
<i>C. amycolatum</i>	F	v	v	-	+	+	v	-	-	v	-	+
<i>C. glucuronolyticum</i>	F	v	v	v	+	+	v	v	-	+	+	+
<i>C. jeikeium</i>	O	-	-	-	+	+	v	-	-	-	-	+
<i>C. propinquum</i>	O	+	-	-	v	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. xerosis</i>	F	v	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>T. otitidis</i>	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Brevibacterium</i> spp.	O	v	-	-	+	v	v	-	-	v	-	+

F = Fermentation

O = Oxidation

v = Ausprägung variabel

rev = reverse CAMP-Reaktion

Eine weitere Möglichkeit und der aktuelle Goldstandard zur Differenzierung coryneformer Spezies stellt die PCR-Amplifikation des 16S rDNA-Gens mit anschließender Sequenzierung dar. Die so erhaltene Sequenz kann mit den homologen DNA-Sequenzen von bekannten coryneformen Bakterien abgeglichen werden. Diese Methode besitzt eine hohe Aussagekraft, nimmt jedoch einige Tage bis zum Erhalt des Ergebnisses in Anspruch.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit betrachtet die Gram-positiven Stäbchenbakterien im menschlichen Urin, im Speziellen auch die coryneformen Arten. Dabei sollte auf die Gattungen *Corynebacterium*, *Actinomyces* und *Actinobaculum/Actinotignum* fokussiert werden. Die ebenfalls gram-positiven, stäbchenförmigen Laktobazillen und Gardnerellen sollten nicht Gegenstand der Untersuchung

sein, weil sie als Bestandteil der physiologischen Standortflora und speziell Laktobazillen eher als protektiv gegenüber Harnwegsinfektionen gelten (Grin, P.M. et al., 2013). *Gardnerella vaginalis* wird mit bakterieller Vaginose bei weitgehender Abwesenheit von physiologischen, protektiv wirkenden *Lactobacillus* spp. im Vaginaltrakt in Verbindung gebracht (Janulaitiene, M. et al., 2017).

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung der Bakterienstämme mittels Massenspektrometrie, biochemischer Analytik, sowie der PCR mit anschließender Sequenzierung.

Für die biochemische Analytik wurden bestimmte Enzymaktivitäten der in Suspension überführten Bakterienspezies anhand von Farbumschlägen in den Kavitäten des API Coryne-Kits zur biochemischen Differenzierung bestimmt. Das Vorgehen für die massenspektrometrische Analyse wurde oben beschrieben. Als aktueller Goldstandard in der Identifizierung unbekannter Spezies gilt die PCR-Amplifikation von universell vorhandenen Gensequenzen wie z. B. dem 16S rDNA-Gen mit Sequenzierung des Amplifikationsproduktes. Die so erzielte Sequenz wird im Anschluss mit homologen DNA-Sequenzen in internationalen Datenbanken abgeglichen werden.

Ferner sollte geprüft werden, ob es Assoziationen der aus dem Urin isolierten und bis auf Speziesebene differenzierten Gram-positiven Stäbchenbakterien zum Alter oder Geschlecht der betreffenden Patienten gibt.

Schließlich sollte analysiert werden, ob der Nachweis coryneformer Spezies mit bestimmten Verfahren der Uringewinnung assoziiert ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit von zwei auf insgesamt vier Tage die Ausbeute an coryneformen Bakterien aus Urinproben verbessert.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die in den Abschnitten 2.1–2.6 gelisteten Geräte und Materialien verwendet.

2.1 Bakterienstämme und Enzyme

Bakterienstamm/Enzym	Referenz
<i>E. coli</i> (MALDI-TOF)	ATCC 8739
<i>E. coli</i> (PCR)	ATCC 25922
HotStart Taq Polymerase	Qiagen, Hilden, D

2.2 Nährmedien und Puffer

Nährmedium/Puffer	Hersteller
Columbia-Agar, 5 % Schafsblut	bioMérieux, Nürtingen, D
CNA-Agar	bioMérieux, Nürtingen, D
TBE-Puffer 100-fach	Sigma-Aldrich, Hamburg, D

Der TBE-Puffer wurde seriell mit Aqua dest. auf die gewünschte 1-fache Gebrauchslösung verdünnt.

2.3 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Färbeautomat PREVI® Color V2	bioMérieux, Nürtingen, D
Mikroskop Typ BX41	Olympus, Hamburg, D
MALDI, Axima Assurance	Shimadzu, Kyoto, Japan
Vortex Genie 1 Touch-Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeschrank HeraCell	Heraeus, Hamburg, D
Densimat	bioMérieux, Nürtingen, D
Cycler Primus Evolution 25/96	MWG Biotech, Ebersberg, D
Gelelektrophorese Model 200	Biometra, Göttingen, D
Zentrifuge 5460 und 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank Öko Super	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heizblock TB1	Biometra, Göttingen, D

2.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, D
Impfösen 10 µl	Greiner, Frickenhausen, D
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (1-200 µl, 0,1-10 µl)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Target Vitek MS	bioMérieux, Nürtingen, D
API Coryne Kit	bioMérieux, Nürtingen, D
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Microbank	Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada
Kryoröhrchen	Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada
Immersionsöl Immoil-8CC	Olympus, Hamburg, D
QIAamp DNA Mini Kit 50	Qiagen, Hilden, D

2.5 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aqua dest.	Universitätsapotheke, Rostock, D
Ethanol 96 %	Universitätsapotheke, Rostock, D
NaCl 0,9 %	Universitätsapotheke, Rostock, D
Paraffinöl	Universitätsapotheke, Rostock, D
Kristallviolett Previ Color Gram	bioMérieux, Nürtingen, D
Jod-Kalium-Iodid-Komplex Previ Color Gram	bioMérieux, Nürtingen, D
Safranin-Fuchsin-Lösung Previ Color Gram	bioMérieux, Nürtingen, D
Alpha cyano-Matrix-Lösung	ripac labor, Potsdam-Golm, D
Methansäure 25 %	ripac labor, Potsdam-Golm, D
H ₂ O ₂ 3 %	Nährmedientechnik des IMIKRO, Rostock, D
dNTP-Satz	Qbiogene, Montreal, Canada
Primer 16S519 5'-gWATTACCGggCKgCTg	TIB MolBiol, Berlin, D
Primer 16S8_27 5'-AgAgTTTgATCMTggCTCAg	TIB MolBiol, Berlin, D
6x DNA-Loading-Dye	Fermentas, Burlington, Canada
100bp-DNA-Leiter (Größenstandard)	Fermentas, Burlington, Canada
Ethidiumbromid	Merck KG, Darmstadt, D
PCR-Wasser	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
PeqGold Universal Agarose 25 %	Peq-Lab, Erlangen, D

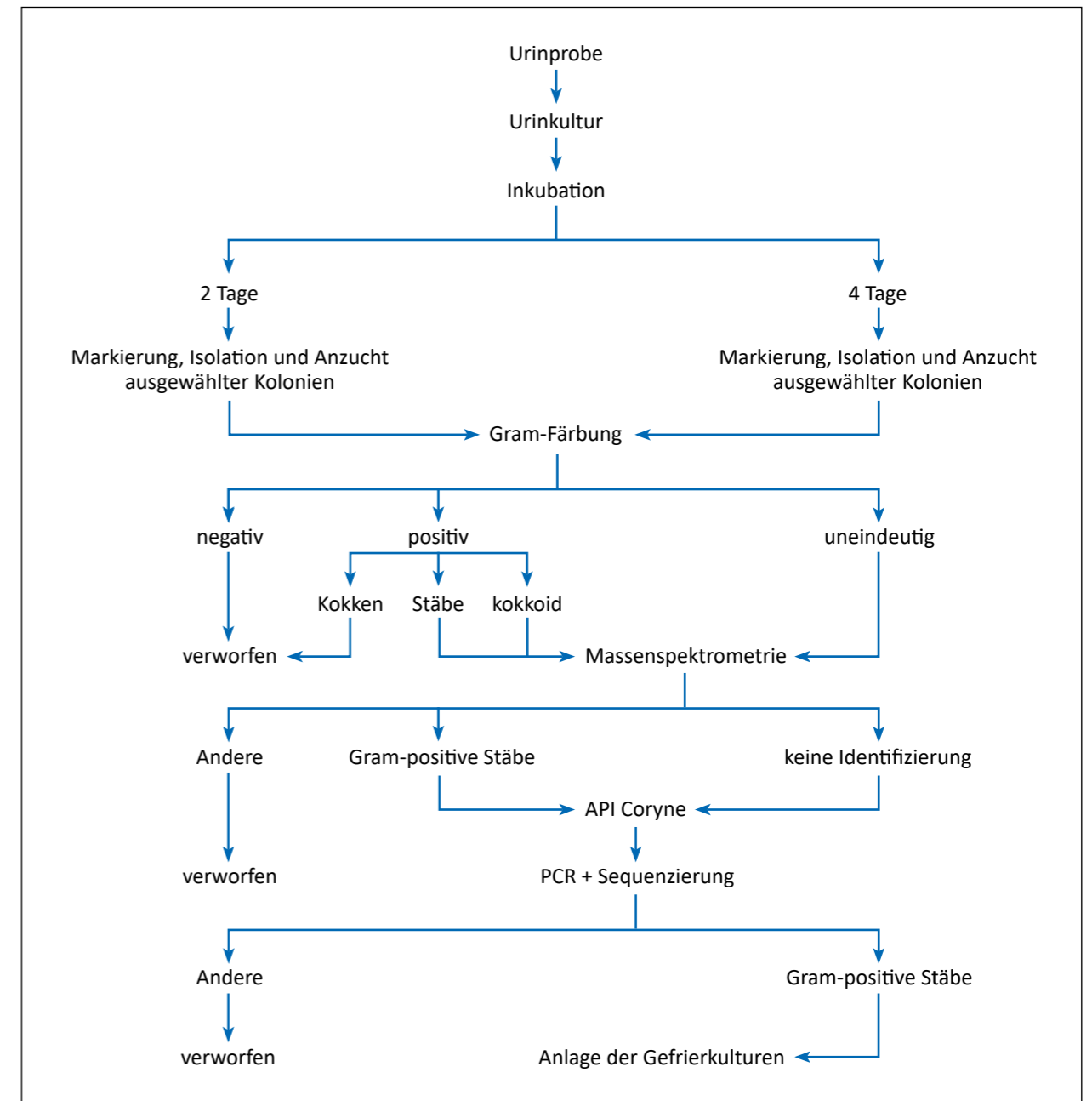
Der Mastermix für die PCR wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Das Agarosegel für die Gelelektrophorese wurde nach Herstellerangaben zubereitet.

2.6 Software

Software	Anbieter
https://apiweb.biomerieux.com	bioMérieux, Nürtingen, D
FinchTV Version 1.4.0	Geospiza, Inc., Seattle, USA
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=-BlastSearch	NCBI, Rockville Pike, USA
Saramis aktuelle Version (15.10.13–18.11.14)	bioMérieux, Nürtingen, D
Myla aktuelle Version (15.09.–24.11.2014)	bioMérieux, Nürtingen, D

2.7 Versuchsaufbau

Abb. 2.7 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.



2.7.1 Patientenkollektiv

Das untersuchte Kollektiv dieser Arbeit besteht aus Patienten der Universitätsmedizin Rostock mit Symptomen einer Harnwegsentzündung, dem Verdacht auf eine Infektion des Urogenitaltraktes oder der Indikation zur Prüfung eines Harnwegs-Therapieerfolgs nach Antibiotikatherapie.

Insgesamt wurden 1.170 Urinkulturen analysiert, welche im Zeitraum vom 02.10.2013 bis zum 22.05.2014 eingesandt wurden. Diese wurden aus Urinproben von 1.031 verschiedenen Patienten angelegt, da von 139 Patienten über den Sammelzeitraum hinweg mehrere Proben gewonnen wurden.

Die Verteilung von Geschlecht und Alter der probengebenden Patienten ist der Tabelle 2.8 zu entnehmen. Das Durchschnittsalter betrug 54 Jahre. Der jüngste Patient war <1 Jahr, der älteste Patient 96 Jahre alt. Insgesamt stammten mehr Proben von Männern als von Frauen.

Tab. 2.8
Verteilung von Geschlecht und Alter der probengebenden Patienten

	männlich	weiblich	gesamt
Anzahl der Urinproben	678	492	1.170
0–10 Jahre	56	33	89
11–20 Jahre	43	41	84
21–30 Jahre	18	25	43
31–40 Jahre	28	31	59
41–50 Jahre	69	60	129
51–60 Jahre	129	100	229
61–70 Jahre	104	57	161
71–80 Jahre	182	96	278
81–90 Jahre	49	38	87
90+ Jahre	0	11	11

2.7.2 Ausgangsmaterial

Von den Patienten der Untersuchungspopulation wurden 5–10 ml Urin im sterilen Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss zur regulären Diagnostik durch die behandelnden Ärzte ins Labor eingeschickt und vom Laborpersonal untersucht. Dabei betrug die durchschnittliche Transportzeit des Material maximal drei Stunden (gemessen durch Auftragseingabe auf der Station vs. Materialeingang im Labor). Die Proben wurden bei Raumtemperatur bzw. unter dem Einsatz von Kühlakkus transportiert.

Zur kulturellen Untersuchung wurden mit einer Impföse 10 µl des Urins in einer 1:100-Verdünnung mit Aqua dest. eingesetzt. Ein Mikroliter Aliquote sowohl des unverdünnten als auch des verdünnten Urins wurden auf jeweils einer Hälfte sowohl einer Columbia-Blut-Agar-Platte als auch einer MacConkey-Agar-Platte ausgestrichen und anschließend kapnophil (5 % CO₂-Atmosphäre) bei 36°C inkubiert. Nach 18–24 Stunden Inkubation erfolgte eine Zwischenauswertung durch das Laborpersonal, eine Endauswertung i. d. R. dann nach 48 Stunden.

2.7.3 Einschlusskriterien

In die weitere Untersuchung eingeschlossen wurden alle Columbia-Blut-Agar-Platten, die bereits in der Standardlaboranalytik durch das Laborpersonal evaluiert wurden. Dies schließt alle Platten mit Misch- und Reinkulturen sowie auch die Urinkulturen ein, die nach 48 Stunden Inkubation kein Bakterienwachstum aufwiesen.

2.7.4 Ausschlusskriterien

Von der weiteren Diagnostik ausgeschlossen wurden alle Urinkulturen, die makroskopisch mit Schimmelpilzspezies kontaminiert waren.

2.7.5 Inkubationsbedingungen

Die reguläre Inkubation von zwei Tagen wurde für diese Arbeit um zwei weitere Tage, insgesamt also auf vier Tage bei ansonsten unveränderten Bedingungen verlängert.

2.7.6 Makroskopische Selektion und Kultivierung der Referenzstämme

Der Fokus bei der makroskopischen Beurteilung lag auf den kleinen, zart wachsenden Kolonien. Diese wurden am Tag 2 der Inkubation markiert und beschrieben. Hierzu wurde mit einer Impföse Koloniematerial auf eine frische Columbia-Blut-Agar-Platte übertragen und diese zur weiteren Anzucht inkubiert. Am Tag 4 wurden zusätzlich alle Kolonien erfasst, die vorher noch nicht sichtbar waren und ebenso neu kultiviert.

Bei Überwachsen der Platte mit einem schnell wachsenden und große Kolonien bildendem Keim erfolgte ein Neuausstrich auf Columbia-Blut-Agar-Platten oder CNA-Platten und eine erneute Inkubation für zwei Tage mit nachfolgender visueller Selektion der Kolonien. Bei der anschließenden Gram-Färbung wurden die Kolonien nach Gram-positiven Stäbchenbakterien sortiert.

Jegliche coryneforme Stämme wurden auf frische Columbia-Blut-Agar-Platten aufgetragen, um ausreichend Material für die weitere Identifizierung mittels Massenspektrometrie, API Coryne und PCR mit Sequenzierung zu gewinnen.

2.8 Färbung nach Gram

Die Gramfärbung stellt eine Methode zur lichtmikroskopischen Einteilung von Bakterien in zwei Gruppen, Gram-positiv und Gram-negativ, dar.

Die Herstellung der Gram-Präparate wurde nach SAA 11 04 01 VR MS GR des nach DIN EN ISO 15189 akkreditierten Instituts durchgeführt. Auf einem Objektträger wurde mit einer Impföse ein Tropfen NaCl 0,9 % aufgetragen. Anschließend wurde eine gerade sichtbare Menge an Koloniematerial vom Columbia-Blut-Agar abgenommen und mit dem NaCl auf dem Objektträger vermischt. Das Präparat wurde bei Zimmertemperatur getrocknet, in den Gram-Färbautomat PREVI Color V2 (bioMérieux) eingelegt und in einem vierstufigen Färbeprozess nach Herstellerangaben automatisiert gefärbt. Die mikroskopische Beurteilung der gefärbten Präparate erfolgte bei 100facher Vergrößerung unter Nutzung von Immersionsöl.

Gram-negative Erreger und jegliche Kokken wurden von der weiteren Differenzierung ausgeschlossen. Gram-positive coryneforme Stäbe wurden dem gesamten o. g. Testverfahren

unterworfen. Auch bei unklarem Ergebnis bezüglich der Gram-Färbung oder kokkoider Morphologie wurde der Erreger weiter analysiert.

2.9 Erregerdifferenzierung mittels Massenspektrometrie

MALDI-TOF als Akronym steht für „matrix-assisted laser-desorption ionisation-time of flight“ und stellt ein Differenzierungssystem in der mikrobiologischen Diagnostik – basierend auf Massenspektrometrie – dar.

Die Präparation der Probenträger wurde nach der SAA 11 09 11 VR ID MA des nach DIN EN ISO 15189 akkreditierten Instituts durchgeführt. Die Identifizierung erfolgte mittels Doppelbestimmung. Hierzu wurde mit einer 100 µl-Pipettenspitze etwas Koloniematerial vom Agar abgetragen und anschließend vorsichtig auf eine definierten Stelle („Spot“) des Probenträgers möglichst homogen verteilt. Es folgte die Benetzung mit 0,5 µl Methansäure mit anschließender Trocknung bei Raumtemperatur. Danach wurden die „Spots“ mit 1 µl der Alpha-Cyano-Matrix überzogen und erneut luftgetrocknet. Insgesamt konnten auf einem Probenträger bis zu 24 verschiedene Kolonien aufgetragen und gemessen werden. Zur Kalibrierung erfolgte die Auftragung eines Referenzstammes von *E. coli*.

Nach der Messung wurde das spektrale Muster mit Hilfe der Vitek-MS-Referenzdatenbank „Saramis“ und „Myla“ abgeglichen.

Für die nachfolgende Differenzierung wurden nur Gram-positive Stäbchenbakterien bzw. Proben mit unbekanntem Massenspektrum weiter verwendet. Jegliche Kokken und Gram-negative Erreger sowie alle *Lactobacillus* spp. und *Gardnerella* spp. wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Im Fall von Ergebnissen, bei denen die ermittelte Spezies nicht mit dem beobachteten Wachstumsverhalten übereinstimmte, wurden die Bakterien ebenso weiteren Analysen unterzogen.

2.10 Erregerdifferenzierung mittels biochemischer Stoffwechselreaktionen

Das API Coryne-System stellt ein industriell gefertigtes Gebinde zur Analyse biochemischer Vorgänge wie Enzymaktivitäten und Abbau bestimmter Substrate in Bakterienarten dar. Anhand von Farbumschlägen in den einzelnen Kavitäten kann das Ergebnis der jeweiligen Reaktion beurteilt werden. Aus der Zusammenschau der insgesamt 20 Parameter erfolgt eine Spezies-Identifizierung.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde eine ausreichende Menge von zwei Tage alten Kolonien genutzt, um die empfohlene Dichte der Bakterien in einer Suspension mit Aqua dest. (McFarland Standard 6) herzustellen. Das Beimpfen des Teststreifens wurde nach Anleitung durchgeführt, wobei besonders auf den Wechsel der Pipettenspitzen nach jedem Pipettiervorgang geachtet wurde, um eine Kontamination der Suspension und des Teststreifens zu vermeiden. Die Kavitäten für Urease, die Negativkontrolle und die Fermentationsreihe wurden zwecks Luftabschlusses mit Paraffinöl überzogen. Der beimpfte Teststreifen wurde anschließend für 24 Stunden bei 36°C aerob inkubiert. Zur Reinheitskontrolle wurde eine Kultur des API GP Mediums und des API Suspensionsmediums nach Beimpfung mit dem Bakterienstamm auf Columbia-Blut-Agar angelegt und nach 48 Stunden der Inkubation auf Reinheit überprüft.

Für die Auswertung der Reaktionen für die Nitratreduktion, den Nachweis von Pyrazinamidase und für Pyrrolidonyl-Arylamidase wurden Nit 1- und Nit 2-Reagenz, PyzA-Reagenz und ZymA-

und ZymB-Reagenz verwendet. Der Farbumschlag in den Kavitäten wurde entsprechend des Auswerteschemas des Herstellers bewertet und die Ergebnisse in die APIweb-Software eingetragen. Diese lieferte eine Spezieszuordnung unter Angabe des Ausmaßes an Übereinstimmung mit der Referenzdatenbank und Hinweisen auf die ggf. diskrepant ausgefallenen Reaktionen.

Das Testsystem liefert in jedem Fall eine Spezieszuordnung innerhalb der coryneformen Stäbe, selbst vollkommen andere Spezies. Insofern kann auf dem Ergebnis der biochemischen Testung allein keine bindende Speziesdiagnose begründet werden. Diese ist nur in Verbindung mit anderen Kriterien wie Wachstumsverhalten auf Festmedien, Koloniemorphe und mikroskopischer Aspekt nach Gramfärbung möglich. Damit taugt die biochemische Analyse nicht zum Ausschluss von Isolaten aus der Gesamtauswertung.

2.11 Erregerdifferenzierung durch molekularbiologische Methoden (PCR und Sequenzierung)

Die 16S rDNA-PCR mit anschließender Sequenzierung des PCR-Produktes stellte über nahezu drei Jahrzehnte den Goldstandard in der Identifikation von Mikroorganismen dar (Rossen, J.W.A. et al., 2018). Aktuell tritt zunehmend die Gesamtgenomsequenzierung an deren Stelle.

Die DNA-Aufreinigung und PCR wurde nach der SAA MDASQA160201 und MDOMBA160318, sowie nach SAA MDKMSQ160401/Version 3 des nach DIN EN ISO 15189 akkreditierten Instituts durch Mitarbeiter des Moduls Molekulare Diagnostik am Institut für Mikrobiologie in Rostock durchgeführt.

Zunächst erfolgte die DNA-Extraktion aus einer frischen Reinkultur des zu identifizierenden Bakteriums. Anschließend wurde das Eluat mit dem PCR-Mastermix vermengt. Es folgte die Amplifikationsreaktion im Thermocycler. Als Einstellung wurde das Programm „HotStart-PCR „50NOHO40“ gewählt mit einer Gesamtdauer von 2:45 Stunden. Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation und Aufreinigung wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Durchführung der kommerziellen Einzelstrang-Sequenzierung erfolgte über die Firma SeqLab in Göttingen. Dabei wurde die Methode nach Sanger verwendet. Die Auswertung der resultierenden Sequenzen erfolgte über das Softwareprogramm FinchTV von Geospiza. Bis zum Erhalt der Ergebnisse wurden die Agarplatten im Kühlschrank bei 4–8°C gelagert.

2.12 Herstellung von tiefgefrorenen Referenzproben

Die nach der Sequenzierung verbliebenen Gram-positiven Stäbchenbakterien wurden auf Columbia-Blut-Agar passagiert, um frische Kolonien in ein Kryoröhrchen (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) überführen zu können. Hierzu wurde mit einer Impföse ein möglichst großer Teil der Kolonien abgenommen und mit der Flüssigkeit im Röhrchen vorsichtig vermengt. Nach Beschriftung des Röhrchens wurde die Kultur bei -80°C tiefgekühlt.

2.13 Ethik

Die Studie wurde unter der Nummer A2019-0021 von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock registriert.

3 Ergebnisse

3.1 Erregerdifferenzierungen unter Verwendung des Massenspektrometers (MALDI-TOF)

3.1.1 Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Saramis-Datenbank

Die massenspektrometrische Differenzierung erfolgte insgesamt mit dem Material von 502 unterschiedlichen Kolonien von 346 Blutagarplatten, die wiederum 346 Urinproben von 324 verschiedenen Patienten entsprechen. 61 dieser Isolate wurden von den weiteren Betrachtungen ausgeschlossen, da es sich nicht um Gram-positive Stäbe oder um *Bifidobacterium* spp., *G. vaginalis* beziehungsweise *Lactobacillus* spp. handelte.

Von den verbliebenen 441 Isolaten wurden 115 (26 %) als Gram-positive, coryneforme Stäbe identifiziert. Bei 90 (78 %) dieser Isolate gelang die Identifizierung auf Speziesebene, bei 25 (22 %) nur bis zur Genusebene. Bei 51 (44 %) Erregern konnte keine eindeutige Zuordnung zwischen *C. amycolatum* und *C. xerosis* getroffen werden. Bei einem Isolat war eine Unterscheidung zwischen *C. amycolatum*, *C. jeikeium* und *C. xerosis* nicht möglich. Tabelle 3.1 zeigt das Erreger-spektrum nach Identifizierung mittels Saramis-Datenbank.

Tab. 3.1
Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Saramis-Datenbank (n=441, Reihenfolge nach absteigender Häufigkeit)

Ergebnis	Anzahl	% von n
keine Identifikation	326	74
<i>C. amycolatum/xerosis</i>	51	12
<i>C. glucuronolyticum</i>	18	4
<i>Corynebacterium</i> sp.	18	4
<i>A. schaalii</i>	11	3
<i>Actinomyces</i> sp.	7	2
<i>A. neuii</i>	2	1
<i>A. turicensis</i>	2	1
<i>C. amycolatum</i>	1	0,2
<i>C. amycolatum/jeikeium/xerosis</i>	1	0,2
<i>C. jeikeium</i>	1	0,2
<i>C. macginleyi</i>	1	0,2
<i>C. urealyticum</i>	1	0,2
<i>D. hominis</i>	1	0,2

Von den getesteten 441 Isolaten konnten 326 (74 %) keinem gespeicherten Spektrum zugeordnet werden. Diese Stämme mussten zur Identifizierung molekularbiologisch weiter differenziert werden.

3.1.2 Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Myla-Datenbank

Die Differenzierung mit der Myla-Datenbank erfolgte mit ebenfalls 441 Isolaten.

Davon wurden 50 Isolate von der weiteren Identifizierung mittels PCR und Sequenzierung ausgeschlossen, da es sich um Kokken oder Gram-negative Bakterienspezies handelte. Es verblieben 391 Kulturen, wovon 302 von Gram-positiven Stäbchenbakterien stammten und 89 keinem Spektrum aus der Datenbank zugeordnet werden konnten. Von den 302 Stäben war eine Identifizierung bis zur Genusebene bei 88 Isolaten, sprich 29 % zu verzeichnen. Bei 85 Isolaten davon konnte die Myla-Datenbank nicht zwischen *C. amycolatum* und *C. xerosis* differenzieren. Bei einem Isolat konnte keine Differenzierung zwischen *Mycobacterium bovis*, *M. fortuitum* und *M. tuberculosis* erfolgen. Bei zwei Isolaten ergab die Massenspektrometrie zwei unterschiedliche Genera. Die restlichen 214 Erreger wurden bis zur Speziesebene differenziert (71 %). Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die mittels Myla-Datenbank identifizierten Spezies.

Tab. 3.2
Identifizierungen der Spezies unter Verwendung der Myla-Datenbank (n=391, Reihenfolge nach absteigender Häufigkeit)

Ergebnis	Anzahl	% von n
keine Identifikation	89	23
<i>C. amycolatum/xerosis</i>	85	22
<i>C. glucuronolyticum</i>	50	13
<i>A. turicensis</i>	38	10
<i>C. tuberculostearicum</i>	33	8
<i>A. neuii</i>	29	7
<i>C. coyleae</i>	11	3
<i>A. radingae</i>	10	3
<i>C. aurimucosum</i>	7	2
<i>C. jeikeium</i>	5	1
<i>Bacillus badius</i>	3	1
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	3	1
<i>A. cumminsii</i>	2	1
<i>C. freneyi</i>	2	1
<i>D. hominis</i>	2	1
<i>P. avidum</i>	2	1
<i>A. europaeus</i>	1	0,3
<i>A. radingae/Aerococcus viridans</i>	1	0,3
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	0,3
<i>C. aurimucosum/Rhodococcus erythropolis</i>	1	0,3
<i>C. confusum</i>	1	0,3
<i>C. macginleyi</i>	1	0,3
<i>C. mucifaciens</i>	1	0,3
<i>C. renale</i>	1	0,3

<i>C. striatum</i>	1	0,3
<i>C. xerosis</i>	1	0,3
<i>Clostridium cadaveris</i>	1	0,3
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	0,3
<i>Clostridium histolyticum</i>	1	0,3
<i>Listeria weishimeri</i>	1	0,3
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	0,3
<i>Microbacterium arborescens</i>	1	0,3
<i>Mycobacterium bovis/fortuitum/tuberculosis</i>	1	0,3
<i>Mycobacterium kansasii</i>	1	0,3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	0,3
<i>Paenibacillus durus</i>	1	0,3

3.2 Erregerdifferenzierungen nach Prüfung biochemischer Stoffwechselreaktionen (API Coryne)

Insgesamt wurde Material von 452 unterschiedlichen Kolonien aus 320 Urinproben von 302 verschiedenen Patienten mittels API Coryne-Teststreifen untersucht. Im Resultat sind *Corynebacterium* spp. und *Actinomyces* spp. mit 329 Stämmen (73 %) am häufigsten vertreten.

Bei 59 (13 %) der 452 Isolate war eine Identifizierung bis zur Genusebene möglich. Bei 48 Isolaten davon konnte API Coryne nicht zwischen 2 *Corynebacterium* spp. differenzieren. Bei 30 Stämmen zeigte API Coryne 2 oder mehr Genera an. Bis zur Speziesebene konnten 333 (74 %) der Erreger und bis zur Subspeziesebene noch einmal 29 (6 %) differenziert werden. Bei einem Stamm war der Teststreifen nicht auswertbar.

Tabelle 3.3 gibt einen detaillierten Überblick über die Identifizierungen, die mit APIweb ermittelt wurden.

Tab. 3.3
Identifizierung der Spezies nach Prüfung biochemischer Stoffwechselreaktionen (API Coryne)
(n=452, Reihenfolge nach absteigender Häufigkeit)

Ergebnis	Anzahl	% von n
<i>C. propinquum</i>	66	15
<i>C. glucuronolyticum</i>	55	12
<i>A. turicensis</i>	41	9
<i>C. striatum/amycolatum</i>	33	7
<i>Brevibacterium</i> spp.	30	7
<i>Arthrobacter</i> spp.	23	5
<i>C. jeikeium</i>	22	5
<i>C. argentoratense</i>	19	4
<i>A. neuui</i> ssp. <i>anitratum</i>	17	4
<i>C. auris</i> / <i>T. otitidis</i>	15	3

<i>G. vaginalis</i>	15	3
<i>C. afermentans/coyleae</i>	14	3
<i>A. neuui</i> ssp. <i>neuui</i>	12	3
<i>A. radingae</i>	12	3
<i>C. urealyticum</i>	9	2
<i>Cellulomonas</i> spp./ <i>Microbacterium</i> spp.	7	2
<i>Rhodococcus</i> spp.	7	2
<i>C. bovis</i>	6	1
<i>Corynebacterium</i> group G	6	1
<i>D. hominis</i>	6	1
<i>Corynebacterium</i> group F1	5	1
<i>C. pseudotuberculosis</i>	5	1
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	4	1
<i>E. rhusiopathiae</i>	4	1
<i>A. pyogenes</i>	2	0,4
<i>C. macginleyi</i>	2	0,4
<i>P. acnes</i>	2	0,4
<i>P. acnes</i> / <i>Arthrobacter</i> spp./ <i>A. radingae</i>	2	0,4
<i>P. avidum</i>	2	0,4
<i>Brevibacterium</i> spp./ <i>Arcanobacterium bernardiae</i> / <i>G. vaginalis</i>	1	0,2
<i>A. pyogenes</i> / <i>Brevibacterium</i> spp.	1	0,2
<i>Brevibacterium</i> spp./ <i>G. vaginalis</i> / <i>A. neuui</i> ssp. <i>anitratum</i>	1	0,2
<i>C. amycolatum/xerosis</i>	1	0,2
<i>C. glucuronolyticum</i> / <i>Arcanobacterium pyogenes</i> / <i>G. vaginalis</i> / <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	1	0,2
<i>G. vaginalis</i> / <i>E. rhusiopathiae</i> / <i>Brevibacterium</i> spp./ <i>L. monocytogenes/innocua</i> / <i>P. avidum</i>	1	0,2
<i>G. vaginalis</i> / <i>P. avidum</i>	1	0,2
<i>R. dentocariosa</i>	1	0,2
nicht auswertbar (" <i>Brevibacterium</i> spp. 0,0/0,0")	1	0,2

3.3 Erregerdifferenzierung mittels 16S rDNA-Gensequenzierung

Es wurden spezifische PCR-Produkte von 429 Isolaten sequenziert. Von den folgenden Betrachtungen wurden alle Isolate mit Kokkenmorphie sowie *Lactobacillus*-Stämme, insgesamt 17 Isolate, ausgeschlossen. Somit ergibt sich eine Anzahl von 412 Gram-positiven stabförmigen Isolaten aus 298 Urinproben von 282 verschiedenen Personen.

Den Großteil der 412 Isolate stellt das Genus der Corynebakterien mit 254 Stämmen, was einem Anteil von 62 % entspricht. Die zweit- und drittgrößte Gruppe wird von *Actinomyces* (79 Isolate, 19 %) und *Actinobaculum/Actinotignum* spp. (29 Isolate, 7 %) gebildet.

376 der 412 Isolate (91 %) wurden bis zur Speziesebene differenziert. neun der 412 Isolate (2 %) konnten nur bis zum Genus (*Corynebacterium* spp.) identifiziert werden.

Bei 21 der 412 Erreger (5 %) konnte trotz mehrfacher Ansätze keine lesbare DNA-Sequenz generiert werden. Tabelle 3.4 zeigt die Differenzierungsergebnisse nach der 16S rDNA-Sequenzierung.

Tab. 3.4
Erregerdifferenzierungen nach PCR und 16S rDNA-Sequenzierung (n=412, geordnet nach absteigender Häufigkeit)

Spezies	Anzahl	% von n
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	67	16
<i>C. glucuronolyticum</i>	42	10
<i>C. pseudogenitalium</i>	29	7
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	26	6
ohne Ergebnis	21	5
<i>A. schaalii</i>	18	4
<i>A. turicensis</i>	17	4
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	12	3
<i>C. aurimucosum</i>	11	3
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	10	2
<i>A. omnicolens</i>	9	2
<i>Corynebacterium</i> sp.	9	2
<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931	9	2
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605	8	2
<i>C. amycolatum</i>	7	2
<i>A. radingae</i>	6	2
<i>Actinomyces</i> sp. SD1	5	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID281"	5	1
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085	5	1
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	5	1
<i>C. tuberculostearicum</i>	5	1
<i>A. europaeus</i>	4	1
<i>A. neuii</i>	4	1
<i>A. urogenitalis</i>	4	1
<i>C. imitans</i>	4	1
<i>Corynebacterium</i> sp. 31595	4	1
<i>Corynebacterium</i> sp. canine oral taxon 424, OH 977	4	1
<i>Bacterium Rauti</i>	3	1
<i>C. jeikeium</i>	3	1
<i>C. minutissimum</i>	3	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID245"	3	1
<i>Actinomyces</i> sp. 2234/04	2	1

<i>C. coyleae</i>	2	1
<i>Corynebacterium</i> sp. M3T9B3	2	1
<i>Corynebacterium</i> sp. R603	2	1
<i>C. urealyticum</i>	2	1
<i>C. ureicelerivorans</i>	2	1
<i>C. xerosis</i>	2	1
<i>D. hominis</i>	2	1
<i>A. albus</i>	1	0,2
<i>A. cumminsii</i>	1	0,2
<i>A. hominis</i>	1	0,2
<i>A. massiliense</i>	1	0,2
<i>Actinomyces</i> sp. 13-114	1	0,2
<i>Actinomyces</i> sp. S5-BM9	1	0,2
<i>Bacillus</i> sp. PD1B	1	0,2
<i>C. afermentans</i>	1	0,2
<i>C. confusum</i>	1	0,2
<i>C. macginleyi</i>	1	0,2
<i>C. massiliense</i>	1	0,2
<i>C. riegelii</i>	1	0,2
<i>C. simulans</i>	1	0,2
<i>C. singulare</i>	1	0,2
<i>Corynebacteriaceae bacterium</i> "ARUP UnID261"	1	0,2
<i>Corynebacteriaceae bacterium</i> "ARUP UnID268"	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID231"	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID60"	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012257588	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012259355	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. 59614	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. MOLA 35	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. NML90-0020	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. S504	1	0,2
<i>Dermabacter</i> sp. AD186	1	0,2
<i>P. bifida</i>	1	0,2
<i>P. faecalis</i>	1	0,2
<i>Zimmermannella</i> sp. "ARUP UnID673"	1	0,2

3.4 Methodenvergleich

3.4.1 Vergleich der Differenzierungserfolge mittels Massenspektrometrie (Saramis-Datenbank) bzw. 16S rDNA-Gensequenzierung

Die Massenspektrometrie unter Nutzung der Saramis-Datenbank ergab insgesamt eine hohe Anzahl an Stämmen, bei der eine Differenzierung selbst bis zur Genusebene nicht möglich war (326/441, 74 %). 284 Stämme davon konnten mittels Sequenzierung identifiziert werden. Bei zehn Analysen lieferten beide Verfahren Ergebnisse, die auf Genusebene nicht übereinstimmten. Von den 115 Gram-positiven Isolaten stimmen 75 (65 %) im Genus mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung überein. Tabelle 3.5 gibt einen Überblick der übereinstimmenden Ergebnisse beider Verfahren auf den jeweiligen Ebenen.

Tab. 3.5
Übereinstimmungen für GPS (n=115), die mittels der MS (Saramis-Datenbank) bzw. 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert wurden

Ebene	Übereinstimmungen	% von n
Genus	75	65
Spezies	25	22
kein Ergebnis	15	13

Die durch die Sequenzierung bestätigten Ergebnisse der Massenspektrometrie (Saramis-Datenbank) innerhalb dieser drei Genera auf den jeweiligen Ebenen ist der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Es zeigt sich, dass ca. 1/3 der *Corynebacterium* spp. korrekt bis zum Genuslevel mittels Saramis-Datenbank bestimmt werden.

Tab. 3.6
Korrekte Identifizierungen isolierter GPS unter Nutzung der MS (Saramis-Datenbank) i. Vgl. zur 16S rDNA-Sequenzierung

Genus	Genusebene	Speziesebene
<i>Actinobaculum/Actinotignum</i>	6/29 (21 %)	2/29 (7 %)
<i>Actinomyces</i>	10/79 (13 %)	3/79 (4 %)
<i>Corynebacterium</i>	84/254 (33 %)	15/254 (6 %)

3.4.2 Vergleich der Differenzierungserfolge mittels Massenspektrometrie (Myla-Datenbank) bzw. 16S rDNA-Gensequenzierung

Bei 89 der 391 (23 %) durch die Massenspektrometrie unter Nutzung der Myla-Datenbank analysierten Kulturen war eine Identifizierung nicht möglich. 75 dieser 89 Isolate (84 %) konnten erfolgreich sequenziert werden. Tabelle 3.7 zeigt die durch die Sequenzierung bestätigten Ergebnisse der Massenspektrometrie mittels Myla-Datenbank. Eine korrekte Identifizierung ist in über der Hälfte der analysierten Stämme erfolgt. Unterschiedliche Genera wurden bei 65 der 391 Analysen gefunden (17 %).

Tab. 3.7
Übereinstimmungen für GPS (n=302), die mittels der MS (Myla-Datenbank) bzw. 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert wurden

Ebene	Übereinstimmungen	% von n
Genus	159	53
Spezies	88	29
kein Ergebnis	6	2

Die durch die Sequenzierung bestätigten Ergebnisse der Massenspektrometrie (Myla-Datenbank) innerhalb der drei betrachteten Genera (*Actinobaculum/Actinotignum*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*) auf den jeweiligen Ebenen ist der Tabelle 3.8 zu entnehmen. Hierbei zeigt sich, dass für *Actinobaculum/Actinotignum* spp. keine Übereinstimmung im Genuslevel erzielt werden konnte. Bei den *Corynebakterien* und *Actinomyces* spp. ist bei mehr als 2/3 der Isolate eine korrekte Identifizierung bis zum Genuslevel erfolgt.

Tab. 3.8
Korrekte Identifizierungen isolierter GPS unter Nutzung der MS (Myla-Datenbank) i. Vgl. zur 16S rDNA-Sequenzierung

Genus	Genusebene	Speziesebene
<i>Actinobaculum/Actinotignum</i>	0/29 (0 %)	0/29 (0 %)
<i>Actinomyces</i>	60/79 (76 %)	23/79 (29 %)
<i>Corynebacterium</i>	181/254 (71 %)	17/254 (7 %)

3.4.3 Vergleich der Differenzierungserfolge mittels biochemischer Testung bzw. 16S rDNA-Gensequenzierung

In über der Hälfte der mittels API Coryne analysierten Stämme findet sich eine Übereinstimmung im Genus. Bei 115 der 452 getesteten Isolate (25 %) werden verschiedene Genera angezeigt. Tabelle 3.9 zeigt die durch die Sequenzierung bestätigten Identifizierungen mittels API Coryne auf den jeweiligen Ebenen.

Tab. 3.9
Übereinstimmungen für GPS (n=412), die mittels der API Coryne bzw. 16S rDNA-Sequenzierung identifiziert wurden

Ebene	Übereinstimmungen	% von n
Familie	2	1
Genus	212	52
Spezies	59	14

Betrachtet man die 3 häufigsten Genera, so wurden auf Genusebene ca. 2/3 der *Corynebacterium* spp. korrekt mit API Coryne erkannt. Hier waren es vor allem *C. glucuronolyticum* und *C. urealyticum*, die gut identifiziert wurden. Von den *Actinomyces* spp. wurden vor allem *A. turicensis* und *A. radingae* in vielen Fällen richtig detektiert. Von den sequenzierten *Actinobaculum/Actinotignum* spp. hat API Coryne keine nachgewiesen. Tabelle 3.10 gibt einen Überblick über die mittels Sequenzierung bestätigten Identifizierungen durch das API Coryne-Testsystem.

Tab. 3.10
Korrekte Identifizierungen isolierter GPS unter Nutzung von API Coryne i.Vgl. zur 16S rDNA-Sequenzierung

Genus	Genusebene	Speziesebene
<i>Actinobaculum/Actinotignum</i>	0/29 (0 %)	0/29 (0 %)
<i>Actinomyces</i>	36/79 (46 %)	18/79 (23 %)
<i>Corynebacterium</i>	172/254 (68 %)	40/254 (16 %)

3.5 Beschreibung des Erregerspektrums in Bezug auf das Alter der Patienten

Für die Beschreibung des Erregerspektrums in Bezug auf das Alter der Patienten wurden zehn Altersspannen im Abstand von jeweils zehn Jahren festgelegt. Die Ausbeute an coryneformen Erregern in den jeweiligen Dekaden wurde anhand des Quotienten aus der Gesamtzahl der Urinkulturen zur Anzahl der gefundenen Erreger berechnet. Je niedriger der Quotient, desto weniger Urinkulturen waren nötig, um einen coryneformen Keim zu finden. Um eine normierte Aussage zu den Häufigkeiten der drei häufigsten Genera in den Dekaden treffen zu können, wurde aus dem oben errechneten Quotienten der einzelnen Spezies der Mittelwert gebildet.

Der Nachweis an coryneformen Bakterien war dabei am häufigsten in den Altersspannen zwischen 31–40, 41–50 und 51–60 Jahren (pro 2,3 Urinkulturen ein coryneformer Erreger) und am seltensten bei den 81- bis 90-Jährigen (pro 4,1 Urinkulturen eine coryneforme Spezies). Tabelle 3.11 zeigt die Anzahl und Häufigkeiten der Gram-positiven Stäbe in den Dekaden.

Tab. 3.11
Anzahl und Häufigkeiten Gram-positiver Stäbe bei nach Alters-Dekaden geordneten Patienten

Alters-Dekade in Jahren	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	90+	gesamt
Anzahl UK	89	84	43	59	129	229	161	278	87	11	1.170
% von 1.170 UK	8	7	4	5	11	20	14	24	7	1	
Anzahl GPS	24	31	16	26	55	98	51	86	21	4	412
UK/GPS	3,7	2,7	2,7	2,3	2,3	2,3	3,2	3,2	4,1	2,8	

UK = Urinkulturen
GPS = Gram-positive Stäbe

Corynebakterien und *Actinomyces* spp. wurden in Patienten aller Dekaden detektiert. Eine Aussage zur Prädisposition zu einem bestimmten Alter kann nicht getroffen werden. *Actinobaculum* spp. beziehungsweise *Actinotignum* spp. waren vermehrt bei den über 30-Jährigen nachweisbar. Bei den unter 30-Jährigen stellt der Nachweis dieses Genus eine Seltenheit dar.

Die Tabelle 3.12 gibt einen Überblick über die nachgewiesenen Erreger, zugeordnet zu den nach Altersdekaden geordneten Patienten, und in Tabelle 3.13 wird eine Übersicht der Patientenzahlen in den Altersdekaden normierten Nachweishäufigkeiten der einzelnen Spezies gezeigt.

Tab. 3.12
Anzahl nachgewiesener Gram-positiver Spezies bei nach Alters-Dekaden geordneten Patienten

Spezies	Alters-Dekade in Jahren	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	90+	gesamt
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"		4	5	2	2	12	16	8	14	4	0	67
<i>C. glucuronolyticum</i>		3	3	3	2	5	10	7	9	0	0	42
<i>C. pseudogenitalium</i>		4	3	2	1	3	4	2	7	3	0	29
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"		1	2	0	2	6	7	5	3	0	0	26
ohne Ergebnis		0	1	0	3	1	8	1	5	3	0	22
<i>A. schaalii</i>		1	0	0	2	1	4	3	3	3	1	18
<i>A. turicensis</i>		3	2	1	4	0	1	2	4	0	0	17
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012		0	1	0	0	1	4	1	3	2	0	12
<i>C. aurimucosum</i>		0	0	0	1	1	4	1	3	1	0	11
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08		0	0	0	0	1	0	4	5	0	0	10
<i>Alloscardovia omnicoles</i>		0	1	1	1	2	2	0	2	0	0	9
<i>Corynebacterium</i> sp.		0	1	1	1	2	1	2	0	1	0	9
<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931		0	0	2	0	0	5	1	1	0	0	9
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605		0	0	0	1	1	5	0	1	0	0	8
<i>C. amycolatum</i>		0	1	0	0	1	1	0	3	1	0	7
<i>A. radingae</i>		0	0	0	0	2	0	1	3	0	0	6
<i>Actinomyces</i> sp. SD1		0	3	0	0	0	1	1	0	0	0	5
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID281"		0	1	0	0	2	2	0	0	0	0	5
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085		0	1	0	0	0	2	1	1	0	0	5
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865		0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	5
<i>C. tuberculostearicum</i>		0	1	1	0	0	0	1	2	0	0	5
<i>A. europaeus</i>		0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	4
<i>A. neuui</i>		0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	4
<i>A. urogenitalis</i>		1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	4
<i>C. imitans</i>		0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	4
<i>Corynebacterium</i> sp. 31595		2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4
<i>Corynebacterium</i> sp. canine oral taxon 424, OH 977		0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	4
<i>Bacterium Rauti</i>		1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3

<i>C. jeikeium</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	3
<i>C. minutissimum</i>	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID245"	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3
<i>Actinomyces</i> sp. 2234/04	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>B. paucivorans</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>Brevibacterium</i> sp. TSW19BA7	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>C. coyleae</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Corynebacterium</i> sp. M3T9B3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>Corynebacterium</i> sp. R603	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>C. urealyticum</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
<i>C. ureicelerivorans</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
<i>C. xerosis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>D. hominis</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
<i>A. massiliense</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. hominis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Actinomyces</i> sp. 13-114	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Actinomyces</i> sp. S5-BM9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>A. albus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. cummingsii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus</i> sp. PD1B	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium "ARUP UnID261"	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium "ARUP UnID268"	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>C. afermentans</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. confusum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>C. macginleyi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. massiliense</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>C. riegelii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. simulans</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. singulare</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID231"	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID60"	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012257588	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012259355	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. 59614	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. MOLA 35	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. NML90-0020	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. S504	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Dermabacter</i> sp. AD186	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. bifida</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>P. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Uncultured bacterium clone JSC7-39	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Zimmermannella</i> sp. "ARUP UnID673"	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Tab. 3.13

normierte Nachweishäufigkeiten (in %) der einzelnen Spezies bei in nach Alters-Dekaden gruppierten Patienten (n=412)

Spezies	Alters-Dekade in Jahren									
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	90+
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	1	1	1	1	3	4	2	3	1	-
<i>C. glucuronolyticum</i>	1	1	1	1	1	2	2	2	-	-
<i>C. pseudogenitalium</i>	1	1	1	0,2	1	1	1	2	1	-
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	0,2	1	-	1	1	2	1	1	-	-
ohne Ergebnis	-	0,2	-	1	0,2	2	0,2	1,2	1	-
<i>A. schaalii</i>	0,2	-	-	1	0,2	1	1	1	1	0,2
<i>A. turicensis</i>	1	1	0,2	1	-	0,2	1	1	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	-	0,2	-	-	0,2	1	0,2	1	1	-
<i>C. aurimucosum</i>	-	-	-	0,2	0,2	1	0,2	1	0,2	-
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	-	-	-	-	0,2	-	1	1,2	-	-
<i>A. omnicoles</i>	-	0,2	0,2	0,2	1	1	-	1	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	-	0,2	0,2	0,2	1	0,2	1	-	0,2	-
<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931	-	-	1	-	-	1	0,2	0,2	-	-
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605	-	-	-	0,2	0,2	1	-	0,2	-	-
<i>C. amycolatum</i>	-	0,2	-	-	0,2	0,2	-	1	0,2	-
<i>A. radingae</i>	-	-	-	-	1	-	0,2	1	-	-
<i>Actinomyces</i> sp. SD1	-	1	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID281"	-	0,2	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085	-	0,2	-	-	-	1	0,2	0,2	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
<i>C. tuberculostearicum</i>	-	0,2	0,2	-	-	-	0,2	1	-	-
<i>A. europaeus</i>	-	-	-	-	-	-	0,2	1	-	0,2
<i>A. neuui</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	1	0,2	-
<i>A. urogenitalis</i>	0,2	-	-	0,2	1	-	-	-	-	-
<i>C. imitans</i>	-	-	1	-	0,2	-	-	-	-	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. 31595	1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2
<i>Corynebacterium</i> sp. canine oral taxon 424, OH 977	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Bacterium Rauti</i>	0,2	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-
<i>C. jeikeium</i>	-	-	-	0,2	0,2	-	-	0,2	-	-
<i>C. minutissimum</i>	-	0,2	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID245"	-	-	-	-	-	-	1	0,2	-	-
<i>Actinomyces</i> sp. 2234/04	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-

▶ <i>B. paucivorans</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Brevibacterium</i> sp. TSW19BA7	-	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>C. coyleae</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. M3T9B3	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. R603	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-	-	-
<i>C. urealyticum</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>C. ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	0,2	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>D. hominis</i>	-	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-
<i>A. massiliense</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>A. hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>Actinomyces</i> sp. 13-114	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomyces</i> sp. S5-BM9	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>A. albus</i>	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>A. cumminsii</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. PD1B	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium "ARUP UnID261"	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium "ARUP UnID268"	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
<i>C. afermentans</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>C. confusum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
<i>C. macginleyi</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>C. massiliense</i>	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
<i>C. riegelii</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>C. simulans</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>C. singulare</i>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID231"	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID60"	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012257588	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012259355	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 59614	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. MOLA 35	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. NML90-0020	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. S504	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
<i>Dermabacter</i> sp. AD186	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>P. bifida</i>	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>P. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Uncultured bacterium clone JSC7-39	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zimmermannella</i> sp. "ARUP UnID673"	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-

3.6 Beschreibung des Erregerspektrums in Bezug auf das Geschlecht der Patienten

Von den insgesamt 412 ermittelten Erregern stammten 228 (55 %) von Personen männlichen Geschlechts und 184 (45 %) aus Urinproben weiblicher Patienten.

Corynebacterium spp. wurden zu über 2/3 aus Urinproben von Frauen isoliert. Hier waren es vor allem *C. aurimucosum* und *C. „Smarlab Biomol“*, die aus dem Urin von Frauen isoliert wurden. *C. glucuronolyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudogenitalium* und *C. tuberculostearicum* zeigten eher eine Assoziation mit dem männlichen Geschlecht.

Der Anteil von *Actinomyces* spp., die aus dem Urin von Männern isoliert wurden, beträgt 22 %. Hier wurden vor allem *A. radingae* und *A. turicensis* gefunden. Eine Assoziation bestimmter Spezies dieses Genus zum weiblichen Geschlecht war nicht erkennbar.

Actinobaculum spp. beziehungsweise *Actinotignum* spp. zeigten bezogen auf die Nachweis Häufigkeit nach Geschlecht nur einen geringen Unterschied. Vermehrt wurde dabei *A. schaalii* bei Personen männlichen Geschlechts gefunden, wohingegen für die Frauen keine spezielle Assoziation erkennbar war.

Tabelle 3.14 gibt einen Überblick über das Erregerspektrum aus den Urinproben männlicher und weiblicher Patienten und Tabelle 3.15 zeigt die normierten Nachweis Häufigkeiten der drei häufig nachgewiesenen Genera nach Geschlecht.

Tab. 3.14
Erregerspektrum in Assoziation zum Geschlecht der Patienten (geordnet nach absteigender Häufigkeit)

Spezies	gesamt	männlich	weiblich
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	67	11	56
<i>C. glucuronolyticum</i>	42	38	4
<i>C. pseudogenitalium</i>	29	24	5
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	26	15	11
ohne Ergebnis	22	11	11
<i>A. schaalii</i>	18	12	6
<i>A. turicensis</i>	17	13	4
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	12	12	0
<i>C. aurimucosum</i>	11	3	8
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	10	5	5
<i>A. omnicoles</i>	9	4	5
<i>Corynebacterium</i> sp.	9	9	0
<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931	9	1	8
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605	8	5	3
<i>C. amycolatum</i>	7	1	6
<i>A. radingae</i>	6	6	0
<i>Actinomyces</i> sp. SD1	5	5	0
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID281"	5	1	4
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085	5	2	3
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	5	5	0
<i>C. tuberculostearicum</i>	5	4	1
<i>A. europaeus</i>	4	2	2

A. neuii	4	2	2
A. urogenitalis	4	2	2
C. imitans	4	2	2
Corynebacterium sp. 31595	4	3	1
Corynebacterium sp. canine oral taxon 424, OH 977	4	3	1
Bacterium Rauti	3	2	1
C. jeikeium	3	3	0
C. minutissimum	3	2	1
Corynebacterium sp. "ARUP UnID245"	3	0	3
Actinomyces sp. 2234/04	2	0	2
B. paucivorans	2	2	0
Brevibacterium sp. TSW19BA7	2	0	2
C. coyleae	2	1	1
Corynebacterium sp. M3T9B3	2	0	2
Corynebacterium sp. R603	2	1	1
C. urealyticum	2	0	2
C. ureicelerivorans	2	1	1
C. xerosis	2	2	0
D. hominis	2	2	0
A. massiliense	1	0	1
A. hominis	1	0	1
Actinomyces sp. 13-114	1	0	1
Actinomyces sp. S5-BM9	1	0	1
A. albus	1	0	1
A. cumminsii	1	0	1
Bacillus sp. PD1B	1	1	0
Corynebacteriaceae bacterium "ARUP UnID261"	1	0	1
Corynebacteriaceae bacterium "ARUP UnID268"	1	1	0
C. afermentans	1	1	0
C. confusum	1	0	1
C. macginleyi	1	0	1
C. massiliense	1	0	1
C. riegelii	1	0	1
C. simulans	1	0	1
C. singulare	1	1	0
Corynebacterium sp. "ARUP UnID231"	1	1	0
Corynebacterium sp. "ARUP UnID60"	1	1	0
Corynebacterium sp. 2012257588	1	1	0
Corynebacterium sp. 2012259355	1	1	0
Corynebacterium sp. 59614	1	0	1
Corynebacterium sp. MOLA 35	1	0	1
Corynebacterium sp. NML90-0020	1	1	0
Corynebacterium sp. S504	1	0	1
Dermabacter sp. AD186	1	1	0
P. bifida	1	0	1
P. faecalis	1	1	0
Uncultured bacterium clone JSC7-39	1	0	1
Zimmermannella sp. "ARUP UnID673"	1	0	1

Tab. 3.15

normierte Nachweishäufigkeiten der 3 häufig nachgewiesenen Genera nach dem Geschlecht der Patienten in % aller GPS (n=412)

Genus/Geschlecht	männlich	weiblich
Actinobaculum/Actinotignum	8	7
Actinomyces	22	16
Corynebacterium	60	64

3.7 Beschreibung des Erregerspektrums in Relation zur Art der untersuchten Urinproben

1.029 der 1.170 Urinproben (88 %) und damit der überwiegende Anteil wurde über nicht-invasive bzw. wenig invasive Verfahren wie Mittelstrahlurin, Erststrahlurin, Topfurin, Beutelurin oder durch Kathetersysteme gewonnen (s. Tab. 3.16). Aus Fistelurin wurden 18 der 1.170 Urinproben (2 %) und aus Conduiturin 13 der 1.170 Urinproben (1 %) angelegt, wobei hier jeweils ein Gram-positiver Erreger isoliert werden konnte. Diese Methoden der Probengewinnung gelten in der gängigen Praxis als wenig belastende Verfahren für den Patienten.

Die Uringewinnung über invasive Techniken, wie z. B. der Blasenpunktion (sechs der 1.170 Urinproben, 1 %) oder der Punktion von Nierenbeckenurin (zwei der 1.170 Urinproben, 0,2 %), erfolgte in deutlich geringerem Umfang. Bei 102 der 1.170 eingesendeten Urinproben (9 %) wurden zur Methode der Probengewinnung keine Angaben gemacht.

Tab. 3.16

Aufschlüsselung der Urinproben nach der Art ihrer Gewinnung in Kombination mit der Anzahl 16S rDNA-sequenzierter GPS aus dem jeweiligen Material

Abnahmemethode	Gesamtzahl der UK	Anzahl GPS
Mittelstrahlurin	795	358
DKU	147	4
keine Angaben	102	38
Beutelurin	38	7
EK-Urin	20	0
„Katheter“	18	0
Fistelurin	18	1
Conduiturin	13	1
Topfurin	10	1
Blasenpunktion	6	0
Nierenbeckenurin	2	0
Erststrahlurin	1	2
gesamt	1170	412

UK = Urinkultur

DKU = Dauerblasenkatheterurin

EK-Urin = Einmalkatheterurin

GPS = Gram-positive Stäbe

Aus knapp der Hälfte aller 795 Mittelstrahlurinproben waren Gram-positive Stäbchenbakterien nachweisbar. Auf fünf der 1.170 Urinkulturen (0,4 %), die aus Katheterurinen angelegt wurden, konnten insgesamt fünf Erreger detektiert werden, wobei sich ein Isolat nach der Gramfärbung nicht weiter kultivieren ließ. Somit stammten vier (1 %) aller Gram-positiven Erreger der vorliegenden Arbeit aus Katheterurinen.

Die invasiven Methoden der Uringewinnung nehmen, bezogen auf den Anteil an Gram-positiven Stäbchenbakterien, eine untergeordnete Position ein. So konnte von den Urinkulturen aus Blasenpunktionsurin und denen aus Nierenbeckenurin kein coryneformer Erreger kultiviert werden.

Bemerkenswert ist, dass die Gram-positiven Stäbchenbakterien dieser Studie überproportional häufig aus Mittelstrahl-Urinproben gewonnen wurden. Nahezu jede zweite dieser Proben enthielt rechnerisch ein solches Bakterium, während aus allen Materialien nur in etwas mehr als 10 % der Fälle diese Keime nachgewiesen wurden.

Tab. 3.17
normierte Nachweishäufigkeiten der drei häufig nachgewiesenen Genera in Relation zur Abnahmemethode in % aller GPS (n=412)

Genus/Methode	MSU	Katheterurine	andere
<i>Actinobaculum/Actinotignum</i>	25 (6 %)	1 (0,2 %)	3 (1 %)
<i>Actinomyces</i>	65 (16 %)	1 (0,2 %)	13 (3 %)
<i>Corynebacterium</i>	223 (54 %)	1 (0,2 %)	30 (7 %)

MSU = Mittelstrahlurin

Tabelle 3.18 zeigt die Verteilung der nachgewiesenen Spezies jeweils in absoluten Zahlen nach der Methode der Probengewinnung.

Tab. 3.18
Verteilung der analysierten Spezies in absoluten Zahlen nach der Methode der Probengewinnung

Spezies	gesamt	MSU	k. A.	BU	DKU	CU	EU	FU	TU
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	67	59	6	0	1	0	0	1	0
<i>C. glucuronolyticum</i>	42	39	3	0	0	0	0	0	0
<i>C. pseudogenitalium</i>	29	25	1	2	0	1	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	26	22	2	1	0	0	1	0	0
ohne Ergebnis	22	18	4	0	0	0	0	0	0
<i>A. schaalii</i>	18	16	1	0	1	0	0	0	0
<i>A. turicensis</i>	17	12	1	3	1	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	12	11	0	0	0	0	1	0	0
<i>C. aurimucosum</i>	11	8	3	0	0	0	0	0	0
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	10	8	2	0	0	0	0	0	0
<i>A. omnicoles</i>	9	7	2	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp.	9	9	0	0	0	0	0	0	0

<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931	9	9	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605	8	6	2	0	0	0	0	0	0
<i>C. amycolatum</i>	7	6	1	0	0	0	0	0	0
<i>A. radingae</i>	6	5	1	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. SD1	5	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID281"	5	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085	5	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	5	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. tuberculostearicum</i>	5	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>A. europaeus</i>	4	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. neuii</i>	4	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. urogenitalis</i>	4	2	1	1	0	0	0	0	0
<i>C. imitans</i>	4	3	1	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 31595	4	3	0	0	0	0	0	0	1
<i>Corynebacterium</i> sp. canine oral taxon 424, OH 977	4	4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacterium Rauti</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. jeikeium</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. minutissimum</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID245"	3	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. 2234/04	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. paucivorans</i>	2	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp. TSW19BA7	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. coyleae</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. M3T9B3	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. R603	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. urealyticum</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. ureicelerivorans</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. xerosis</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>D. hominis</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. massiliense</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. hominis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. 13-114	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces</i> sp. S5-BM9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. albus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. cummingsii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> sp. PD1B	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacteriaceae bacterium</i> "ARUP UnID261"	1	1	0	0	0	0	0	0	0

<i>Corynebacteriaceae bacterium</i> "ARUP UnID268"	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. afermentans</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. confusum</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. macginleyi</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. massiliense</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. riegelii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. simulans</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. singulare</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID231"	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID60"	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012257588	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 2012259355	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. 59614	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. MOLA 35	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. NML90-0020	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp. S504	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dermabacter</i> sp. AD186	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. bifida</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. faecalis</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Uncultured bacterium clone JSC7-39	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zimmermannella</i> sp. "ARUP UnID673"	1	1	0	0	0	0	0	0	0

MSU = Mittelstrahlurin

BU = Beutelurin

DKU = Dauerblasenkatheterurin

CU = Conduiturin

EU = Erststrahlurin

FU = Fistelurin

TU = Topfurin

3.8 Auswirkung der Inkubationszeit auf die Menge an bis zur Speziesebene differenzierten Gram-positiven Stäben

3.8.1 Status am Tag 2 der Inkubation

Die Protokollierung des Ergebnisses nach zweitägiger Inkubation der Kulturmedien ist der Befundung des IMIKRO-Routinelabors entnommen. Zur besseren Übersicht werden diese Daten in der vorliegenden Arbeit in „bewachsen“ und „nicht bewachsen“ untergliedert, wovon bei den bewachsenen Agarplatten solche mit typischen Kontaminanten (Urethral- bzw. Mischflora) gesondert ausgewiesen werden. Außerdem werden alle nicht weiter analysierten Erreger nach Morphologie (Kokken oder Stäbe) und Gram-Färbeverhalten (Gram-positiv oder Gram-negativ) eingeteilt. Agarplatten mit Pilzkolonien wurden unter „andere“ zusammengefasst.

Von den insgesamt 1.170 Urinkulturen waren nach zwei Tagen 723 (62 %) bewachsen. Urethral- und Mischflora zeigten sich bei 408 (35 %), Gram-positive Kokken und Gram-negative Stäbe bei 305 (26 %) der Urinkulturen. Pilzspezies wurden von zehn (1 %) der bewachsenen Agarplatten isoliert. Kein erkennbares Bakterienwachstum zeigte sich bei 447 (38 %) aller Urinkulturen.

Am Tag 2 erfolgte nach spätestens sechs Stunden Lagerung der Columbia-Blut-Agar-Platten bei Zimmertemperatur eine Reevaluation mit Markierung und Erfassung weiterer Kolonien, die potentiell coryneformen Bakterien zuzuordnen waren. Bei 90 Urinkulturen, die zuvor als unbewachsen eingestuft wurden, konnten nach dieser Zeit winzige Kolonien detektiert werden. Dementsprechend reduzierten sich nach der Reevaluation die nicht bewachsenen Platten von 447 auf 357 (38 % auf 30 %). Der Anteil bewachsener Columbia-Blut-Agar-Platten erhöhte sich von 723 auf 813 (62 % auf 70 %).

3.8.2 Status am Tag 4 der Inkubation

Von den am Tag 2 unbewachsenen Urinkulturen blieben 308 (86 %) auch nach vier Tagen der Inkubation ohne erkennbares Koloniewachstum. Auf 49 (14 %) der zuvor unbewachsenen Columbia-Blut-Agar-Platten waren nun Kolonien sichtbar, wovon auf 35 Agarplatten Gram-positive Stäbchenbakterien nach der Gram-Färbung darstellbar waren. Auf zehn dieser Agarplatten waren *Lactobacillus* spp. nachweisbar, weshalb keine weitere Differenzierung erfolgte. Bei vier Urinkulturen wuchsen diese neu entdeckten Bakterien auch nach wiederholter Passage auf ein frisches Medium nicht an und entzogen sich so der Differenzierung.

Von den insgesamt 1.170 analysierten Urinkulturen verblieben demnach 21 (2 %) mit insgesamt 26 coryneformen Spezies, welche erst nach viertägiger Inkubation sichtbar wurden. 13 (50 %) dieser Spezies gehörten zum Genus der Corynebakterien, jeweils vier waren *Actinomyces* und *Actinotignum* spp. (je 15 %). Die Tabelle 3.19 zeigt das ermittelte Erregerspektrum in der Übersicht.

Tab. 3.19

Erregerspektrum von Medien, auf denen kein Wachstum an Tag 2, aber ein Wachstum von GPS an Tag 4 der Inkubation nachweisbar war

Spezies	Anzahl
<i>A. schaalii</i>	3
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	3
<i>C. glucuronolyticum</i>	3
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	3
<i>A. omnicoles</i>	2
<i>C. pseudogenitalium</i>	2
ohne Ergebnis	2
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	1
<i>A. turicensis</i>	1
<i>Bacterium Rauti</i>	1
<i>C. imitans</i>	1
<i>Corynebacterium</i> sp.	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	1
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	1
<i>C. tuberculostearicum</i>	1

Auf 124 der 813 am Tag 2 bereits bewachsenen Festmedien (15 %) waren am Tag 4 insgesamt 90 neue Erreger detektierbar. 58 davon (64 %) gehörten zum Genus der Corynebakterien, 19 (21 %) der Isolate waren *Actinomyces* spp. und vier (4 %) waren *Actinotignum* spp.. Die Tabelle 3.20 gibt einen Überblick über das Erregerspektrum.

Tab. 3.20
Erregerspektrum von Medien, auf denen am Tag 2 der Inkubation Wachstum und zusätzliches Wachstum von GPS an Tag 4 der Inkubation nachweisbar war

Spezies	Anzahl
<i>Corynebacterium</i> sp. "Smarlab Biomol"	15
<i>C. glucuronolyticum</i>	13
<i>A. turicensis</i>	6
<i>C. pseudogenitalium</i>	6
<i>Actinomyces</i> sp. "ARUP UnID60"	5
ohne Ergebnis	4
<i>Actinomyces</i> sp. 13-605	3
<i>C. amycolatum</i>	3
<i>Corynebacterium</i> sp. 707471/2012	3
<i>Corynebacterium</i> sp. R-45865	3
<i>A. schaalii</i>	2
<i>Actinobaculum</i> sp. V04 257809/08	2
<i>Actinomyces</i> sp. SD1	2
<i>Corynebacterium</i> sp.	2
<i>Corynebacterium</i> sp. 31595	2
<i>A. europaeus</i>	1
<i>A. omnicoles</i>	1
<i>A. urogenitalis</i>	1
<i>Actinomyces</i> sp. 2234/04	1
<i>Bacillus</i> sp. PD1B	1
<i>Brevibacterium</i> sp. TSW19BA7	1
<i>C. afermentans</i>	1
<i>C. aurimucosum</i>	1
<i>C. massiliense</i>	1
<i>C. singulare</i>	1
<i>C. urealyticum</i>	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID245"	1
<i>Corynebacterium</i> sp. "ARUP UnID60"	1
<i>Corynebacterium</i> sp. ATCC 6931	1
<i>Corynebacterium</i> sp. NML90-0020	1
<i>Corynebacterium</i> sp. NML96-0085	1
<i>Corynebacterium</i> sp. R603	1
<i>P. bifida</i>	1
<i>P. faecalis</i>	1

4 Diskussion

Harnwegsinfektionen zählen zu den häufigsten und zudem in aller Regel gut therapierbaren Infektionserkrankungen des Menschen. Damit kommt der Diagnostik eine besondere Bedeutung zu. Meist ist eine Infektion mit *E. coli* ursächlich, jedoch gibt es im klinischen Alltag immer wieder Patienten, bei denen die Therapie nach Antibiogramm des *E. coli*-Stamms nicht greift oder es nach Beendigung der Antibiotikatherapie zu einem klinischen Rezidiv kommt. In diesen Fällen besteht die Vermutung, dass bisher nicht erfasste Erreger die Infektion (mit)verursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich explizit auf Gram-positive Stäbchenbakterien im Urin fokussiert, um nach deren Anzucht und Identifizierung deren epidemiologische Bedeutung zu erheben. Hierzu wurden Urinproben von Patienten der Universitätsmedizin Rostock untersucht. Die Effekte von unterschiedlichen Bebrütungszeiten wurden evaluiert und die hierbei gefundenen Isolate mit verschiedenen Methoden differenziert. Ebenso wurde erfasst, auf welche Art der Urin gewonnen wurde und ob eine geschlechts- oder altersabhängige Assoziation der Patienten zu coryneformen Erregern in deren Harnwegen besteht.

Es ist bekannt, dass Gram-positive Stäbchenbakterien ein Teil der physiologischen Standortflora des Menschen sind und sich besonders auf der Haut und Schleimhaut – auch des Urogenitaltrakts – befinden (Kogan, M.I. et al., 2015). Dort haben sie Einfluss auf die Funktion der lokalen Immunabwehr und so mittelbar wie zudem auch unmittelbar Einfluss auf die Zusammensetzung des lokalen Mikrobioms. Bei einer nicht-invasiven Urinprobengewinnung gelangen sie mit großer Wahrscheinlichkeit in die Probe. Bei einem Nachweis aus Proben von an Harnwegsinfektionen leidenden Patienten stellt sich angesichts der wachsenden Erkenntnis der ubiquitären Gegenwart von Corynebakterien in den Harnwegen einerseits und einer potentiellen Rolle als Pathogen andererseits die Frage nach der ätiologischen Bedeutung des Nachweises.

Die potentiell pathogenen coryneformen, Gram-positiven Bakterien werden aufgrund ihres häufig langsamen Wachstums im Vergleich zu klassischen uropathogenen Spezies schwerer bzw. seltener erkannt, weil ihre Kolonien von anderen Spezies überwachsen werden oder in einem Bebrütungszeitraum von 48 Stunden keine makroskopische Sichtbarkeit erlangen.

Es gibt von verschiedenen Fachkollegen Anregungen, Mischflora aus Urin nicht als Kontamination anzusehen, sondern immer eine Identifikation aller Spezies anzustreben (Siegman-Igra, Y. et al., 1993; Siegman-Igra, Y. et al., 1994). Ein Argument dafür ist, dass es durch inadäquate, weil nicht umfassende Therapien zur Urosepsis kommen kann. Es wurde ebenso erklärt, dass Patienten mit einer Dauerkatheterisierung nahezu immer ein breiteres Erregerspektrum in ihrem Urogenitalsystem aufweisen. Die genaue Speziesidentifikation ist besonders bei dieser Patientenklientel wichtig, da die Integrität des Urogenitaltraktes gestört und ein fulminanter Verlauf einer Infektion daher wahrscheinlicher ist.

In einer aktuellen Studie wurden die isolierten Gram-positiven Stäbchenbakterien aus verschiedenen menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten in 18 % der Fälle als ätiologisch relevant und 82 % bei fehlender Symptomatik als Kontaminanten angesehen (Leal, S.M. Jr. et al., 2016). Dort wird die Vermutung geäußert, dass mehrere Bakterienspezies zusammen einen pathogenen Synergismus entwickeln. Die verschiedenen Spezies können zum Beispiel spezielle Nahrungsbestandteile bereitstellen oder aber auch Mechanismen als zusätzlichen Schutz vor den Komponenten des Immunsystems entwickeln (Kononen, E. et al., 2015).

4.1 Betrachtungen zu den Genera *Actinobaculum/Actinotignum*, *Actinomyces* und *Corynebacterium*

4.1.1 Erläuterungen zu assoziierten Erkrankungen und Harnwegsinfektionen

Ein in der vorliegenden Studie seltener nachgewiesenes Genus stellt *Actinobaculum* dar, wovon einzelne Spezies mit chronischen Harnwegsinfektionen in Zusammenhang gebracht wurden (Greub, G. et al., 2002). Das Genus *Actinobaculum* wurde 2015 in *Actinotignum* und *Actinobaculum* geteilt (Yassin, A.F. et al., 2015). So wurde auch *Actinobaculum schaalii* als *Actinotignum schaalii* neu eingeordnet. Diese Spezies ist in der Literatur als Uropathogen mit einem hohen Potential für besonders komplizierte Krankheitsverläufe beschrieben, da es Resistenzen gegen etablierte Harnwegs-Antibiotika aufweist (Nielsen, H.L. et al., 2010; Lotte, R. et al., 2016). Dazu zählen z. B. Sulfamethoxazol/Trimethoprim oder auch Fluorchinolone der 2. Generation wie Ciprofloxacin oder Ofloxacin.

Ältere Patienten mit bestehenden Risikofaktoren (Operation im Urogenitalbereich, Dauerblasenkatheteranlage, Karzinome, Inkontinenz, angeborene Fehlbildungen, Prostatahyperplasie etc.) sind oft mit *A. schaalii* besiedelt (Pedersen, H. et al., 2017). Sofern das Bakterium dann Ursache einer Infektion ist und diese falsch therapiert wird, resultiert eine Mortalität von 16 % (Bank, S. et al., 2010). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass diese Patientenklientel bereits eine hohe Komorbidität aufweist, was ebenso einen Einfluss auf die Mortalität hat (Pedersen, H. et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde *A. schaalii* wie in den o. g. Publikationen vorwiegend bei Personen ab dem 60. Lebensjahr gefunden.

Actinomyces spp. wurden ebenfalls meist in Einzelfallstudien in Verbindung mit Urethritiden und Zystitiden gebracht (Graevenitz, A. et al., 2012; Sabbe, L.J. et al., 1999; Kononen, E. et al., 2015).

Der Großteil der in der vorliegenden Arbeit isolierten Spezies gehört dem Genus *Corynebacterium* an. Diese Bakterien wurden bisher vor allem aus Blut- und Urinproben von Risikopatientengruppen nachgewiesen, beispielsweise aus den Bereichen der Hämatologie und Onkologie (Sato, K. et al., 2012). Wegen ihres Potentials als Erreger von Infektionen wie der Endokarditis oder auch einer Bakteriämie sollen entsprechende Spezies bei Verdacht gezielt identifiziert werden und eine Resistenztestung erfolgen.

Es sind Spezies dieses Genus wie *C. glucuronolyticum* bekannt, die klar in Verbindung mit Harnwegsinfektionen gebracht werden können und auch in der vorliegenden Arbeit detektiert wurden (Gherardi, G. et al., 2015). Als mögliches Pathogen ist diese Spezies vor allem im männlichen Urogenitaltrakt beschrieben worden, was sich auch mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit bestätigen lässt. Die Bedeutung eines Nachweises aus Harnwegsmaterialien von Frauen ist noch ungeklärt. Bisher wurde *C. glucuronolyticum* in einem Fallbericht bei einer Frau mit bakterieller Vaginose nachgewiesen (Devriese, L.A. et al., 2000).

Ebenso wurde in der vorliegenden Arbeit *C. pseudogenitalium* detektiert. Dieses Bakterium ist als Kommensale im männlichen und weiblichen Urogenitaltrakt seit Ende der 70er Jahre bekannt und zudem als Uropathogen beschrieben (Furness, G. et al., 1979; Vedel, G. et al., 2006). Vor allem die hohe Urease-Aktivität mit der daraus folgenden Alkalisierung des Urins fördert unter anderem die Entstehung von Harnsteinen, was als sekundäre Komplikationen zu schwerwiegenden Infektionen des Harntraktes und schmerzhaften Koliken führen kann.

Neben *C. pseudogenitalium* wird auch *C. urealyticum* sowohl bei akuten als auch bei chronischen Harnwegsinfektionen nachgewiesen (Salem, N. et al., 2015). Auch diese Spezies wurde in der vorliegenden Studie gefunden. Über weitere hier detektierte *Corynebacterium* spp. wie *C. aurimucosum* sind in der Literatur nur Einzelfallberichte zu Erkrankungen des Urogenitaltraktes bekannt (Lo, S. et al., 2015).

Neben den oben beschriebenen 3 Genera, die den Hauptanteil der gefundenen Gram-positiven Stäbe ausmachen, wurden auch weitere Spezies aus den Genera *Alloscardovia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudoclavibacter* und *Zimmermannella* in geringer Anzahl identifiziert. Wegen der geringen Anzahl sind hier belastbare Aussagen zu Assoziationen bezüglich Geschlecht, Alter oder Abnahmemethode nicht zu treffen.

4.1.2 Erläuterungen zu katheterassozierten Infektionen

In der vorliegenden Studie wurde analysiert, ob coryneforme Stäbchenbakterien gehäuft in Urinen nachzuweisen sind, die über Kathetersysteme gewonnen wurden, denn die häufigste katheterassozierte Infektion in Kliniken ist die des Harnwegssystems (Romling, U. et al., 2014; Kline, K.A. et al., 2016). Es sind vor allem Urease-produzierende Bakterien wie *Klebsiella* oder *Proteus*, aber auch *Corynebacterium*, die Katheterschläuche mit kristallinem Material verschließen können und zu schwer therapierbaren Harnwegsinfektionen mit komplikationsreichem Verlauf führen (Stickler, DJ et al., 2014).

In der aktuellen Arbeit wurden 185 Urine über Kathetersysteme gewonnen. Von diesen 185 Urinen stammte der Großteil mit 147 Urinen aus Dauerblasenkathetern, die restlichen 38 Urinproben von Einmalblasenkathetern und „Kathetern“ ohne nähere Angaben. Die hieraus isolierten Coryneformen stellen mit 4 Stämmen (1 %) nur einen geringen Teil der Gesamtzahl der isolierten Gram-positiven Stäbe. Dabei wurden sämtliche detektierten Gram-positiven Stäbe aus den Dauerblasenkathetern isoliert. Gefunden wurden *A. schaalii*, *A. turicensis*, *B. paucivorans* und *C. „Smarlab Biomol“*.

Speziell zu *A. schaalii* gibt es eine Studie, die den Urin von insgesamt 37 Patienten mit liegenden Dauerblasenkathetern untersuchte (Bank, S. et al., 2011). Hierbei wurde bei 22 % (n=8) der Patienten diese Spezies nachgewiesen und in sieben dieser acht Fälle trat es in Kombination mit anderen Uropathogenen auf. Die Autoren schlussfolgerten, dass der Erreger bei älteren und multimorbiden Patienten bevorzugt nachzuweisen ist und hier auch Harnwegsinfektionen verursachen kann. Es konnte dabei nicht festgestellt werden, dass *A. schaalii* besonders häufig aus Dauerblasenkathetern isoliert werden kann. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. Zwar stellt diese Spezies einen von vier der in Dauerblasenkathetern gefundenen Erreger dieser Arbeit, jedoch ist hier die Probenanzahl für eine allgemeingültige Aussage zu gering. Gleichermaßen verhält es sich mit den anderen Spezies, die in der aktuellen Studie aus liegenden Dauerblasenkathetern isoliert wurden. Auch *A. turicensis*, *B. paucivorans* und *C. „Smarlab Biomol“* wurden bisher nicht in Verbindung mit urinkatheterassozierten Infektionen gebracht.

In einer älteren Studie wurde Urin von 13 Patienten mit einliegendem Dauerblasenkatheter in bestimmten Zeitabständen durch suprapubische Punktion gewonnen und mikrobiologisch untersucht (Sapico, F.L. et al., 1976). In 68 % der Fälle wurden vor allem Gram-negative Stäbe wie *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* und *Pseudomonas* nachgewiesen und nur bei zwei Patienten die Gram-positiven Stäbe *Bifidobacterium* und *Clostridium*. Die Bedeutung der Gram-positiven Stäbe

konnte nicht erklärt werden und es konnte auch kein Zusammenhang zum einliegenden Dauerblasenkatheter hergestellt werden.

Aus den erhobenen Daten der aktuellen Studie ist zu schlussfolgern, dass coryneforme Erreger vor allem aus Mittelstrahlurin gewonnen werden. Mit einem Anteil von 86 % (n=354) an allen gefundenen Gram-positiven Erregern ist diese Methode für den Nachweis Gram-positiver Spezies zwar geeignet, jedoch ist hierbei auch die hohe Kontaminationswahrscheinlichkeit durch die physiologische Harnröhrenflora der Patienten zu berücksichtigen.

4.1.3 Erläuterungen zu Assoziationen bezüglich des Alters der Patienten

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse möglicher Assoziationen coryneformer Spezies aus Urinproben zum Alter der Patienten. In Studien wurde bereits festgestellt, dass sich das Mikrobiom des Urogenitaltraktes mit zunehmendem Alter verändert (Lewis, D.A. et al., 2013). Hier lässt sich feststellen, dass Gram-positive Erreger aus den Urinproben jeglicher Patienten isoliert werden, aber vermehrt bei Personen fortgeschrittenen Lebensalters (>60 Jahre) (Sánchez-Martín, F.M. et al., 2016; Kramer, H. et al., 2016). Dieser Fakt wurde bei *Actinotignum* spp. beziehungsweise *Actinobaculum* spp. am deutlichsten, da hier ungefähr 2/3 aller detektierten *Actinobaculum*/*Actinotignum* spp. im Urin von Patienten über 60 Jahren gefunden wurden, was sich auch mit den Erkenntnissen aus der Studie von Olsen, A.B. et al. deckt (Olsen, A.B. et al., 2013).

Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit diese Gattungen/Arten auch gehäuft aus Urinproben von Kindern <10 Jahren nachgewiesen. Mögliche Begründungen für beide Altersextreme sind zum einen ein technisches Problem einer sauberen Probengewinnung bei besonders jungen und alten Patienten und zum anderen in diesen Altersstufen besondere Mikrobiom-Konstellationen, ggf. gepaart mit besonderen funktionalen Konstellationen der lokalen Wirtsabwehr. *Actinobaculum* spp. als Uropathogen wurden für Kinder auch in der Literatur bereits diskutiert (Andersen, L.B. et al., 2012; Zimmermann, P. et al., 2012).

4.1.4 Erläuterungen zu Assoziationen bezüglich des Geschlechts der Patienten

Eine generelle Assoziation zwischen dem Auftreten Gram-positiver Stäbe und dem Geschlecht des Patienten konnte nicht gezeigt werden, obwohl die Studien von Lewis, DA et al. und Moustafa, A.L. et al. bestimmte Gram-positive Erreger eher bei Frauen (*Lactobacillus* und *Prevotella*), andere eher bei Männern fanden (*Enterococcus* und *Pseudomonaden*). Coryneforme Spezies wurden hier jedoch nicht betrachtet. Nur für einzelne Spezies verschiedener Genera bestand eine Präferenz. *A. radingae* und *A. turicensis*, *A. schaalii* sowie *C. glucuronolyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudogenitalium* und *C. tuberculostearicum* fanden sich eher in den Proben männlicher Personen, wohingegen *C. aurimucosum* und *C. „Smarlab Biomol“* vermehrt bei Frauen isoliert wurden. Dabei sind die geringen Fallzahlen vor allem bei *Actinomyces* spp., *Actinotignum* spp., *C. aurimucosum*, *C. jeikeium* und *C. tuberculostearicum* zu beachten.

In der Literatur wird für *Corynebacterium* spp. eine gewisse Präferenz zum männlichen Geschlecht bei verschiedenen Grunderkrankungen beschrieben (Belmares, J. et al., 2007; Stamm, W.E. et al., 1979; Carvalho, R.V. et al., 2018). Bucevic Popovic, V. et al. untersuchten das Mikrobiom gesunder Männer im Vergleich zu dem von Männern mit Blasenkarzinom. Die Autoren merkten an, dass Corynebakterien vermehrt bei gesunden Männern isoliert wurden. Eine große Vielfalt im Mikrobiom des Harntraktes scheint hier eine protektive Rolle einzunehmen (Bucevic Popovic, V. et al., 2014).

4.2 Betrachtungen zu den Differenzierungsmethoden (API Coryne, Massenspektrometrie, 16S rDNA-Sequenzierung)

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Leistungsfähigkeit verschiedener Differenzierungsmethoden der mikrobiologischen Routinediagnostik wie die Massenspektrometrie mit unterschiedlichen Datenbanken und biochemischen Testverfahren wie dem API Coryne-System im Vergleich zur 16S rDNA-Sequenzierung. Vergleicht man die Anzahl der mittels Massenspektrometrie (MS) mindestens bis zur Genusebene differenzierten Gram-positiven Stäbe unter Einsatz beider Datenbanken, so ist die Myla-Datenbank der Saramis-Datenbank etwa um den Faktor 3 überlegen. Die Sequenzierung weist einen noch größeren Anteil an bis zur Speziesebene differenzierten Isolaten auf und gilt deswegen weiterhin als Goldstandard.

Als ein Vorteil der MS ist anzuführen, dass ein Ergebnis bereits nach kurzer Zeit vorliegt, währenddessen die PCR mit Sequenzierung mit dem in diesem Routinelabor etablierten Verfahren bis zu fünf Tage in Anspruch nehmen kann.

Betrachtet man isoliert die Massenspektrometrie, so ist diese eine gute Methode, um *Corynebacterium* spp. zu identifizieren (Vila, J. et al., 2012; Leal, S.M. et al., 2016; Barberis, C. et al., 2014; Mushtaq, A. et al., 2016; Alatoom, A.A. et al., 2012). Mit der Saramis-Datenbank wurde etwa ein Drittel der *Corynebacterium*-Stämme korrekt auf Genusebene und ein kleiner Teil auf Speziesebene erkannt. Die Ergebnisse mittels Myla-Datenbank wurden für über 2/3 der Spezies auf Genusebene und zu einem geringen Teil als korrekt auf Speziesebene durch die Sequenzierung bestätigt. Die Myla-Datenbank ist der Saramis-Datenbank in Hinblick auf die Identifizierung des Genus *Corynebacterium* daher deutlich überlegen, in der Differenzierung bis zur Speziesebene zeigen sich jedoch keine großen Unterschiede.

Auch andere klinisch relevante Gram-positive Stäbchenbakterien wie *Actinomyces* spp. sind durch die Massenspektrometrie gut bis zur Genusebene identifizierbar, wie die o. g. Publikationen ebenfalls zeigen. Auch hier ist die Myla-Datenbank der Saramis-Datenbank überlegen ist. Von allen *Actinomyces*-Isolaten wurde ungefähr jeder 8. Erreger korrekt mit der Saramis-Datenbank erkannt, wohingegen die Myla-Datenbank weit 3/4 richtig erfasste. Auf der Speziesebene wurden mittels 16S rDNA-Sequenzierung die Ergebnisse der Saramis-Datenbank nur zu einem sehr kleinen Teil bestätigt, die der Myla-Datenbank aber zu etwa einem Drittel. Von den *Actinotignum* Stämmen erkannte die Saramis-Datenbank ungefähr jeden 5. Stamm korrekt auf Genusebene und in geringem Umfang auch bis zur korrekten Spezies. Mit der Myla-Datenbank wurde auf Genusebene mit der verwendeten Version keine Übereinstimmung erzielt. Auffällig ist des Weiteren, dass für 51 der *Corynebacterium*-Isolate durch die MS Saramis und für 86 der Isolate mit der MS Myla keine eindeutige Zuordnung zwischen *C. amycolatum* und *C. xerosis* getroffen werden konnte.

Dieses Problem wurde auch in der Literatur bereits beschrieben (Funke, G. et al., 1996). So wurden in einer neueren Studie in 95 von 295 Fällen *Corynebacterium* spp. aus verschiedenen Körperflüssigkeiten des Menschen isoliert, bei denen eine Split-Identifizierung zwischen *C. amycolatum* und *C. xerosis* zu verzeichnen war (Leal, S.M. et al., 2016). Eine Erklärung hierfür sahen die Autoren in einem Fehler der Datenbank. Möglicherweise ist das erhaltene Spektralmuster aus den Flugzeiten der Moleküle sehr ähnlich, sodass keine eindeutige Zuordnung getroffen werden kann. Hier lässt sich aufgrund von Häufigkeiten und bekannten Habitaten der wahre Erreger nur vermuten. Im Falle einer Split-Identifizierung wird daher die Anwendung einer PCR mit anschließender

Sequenzierung oder auch die biochemische Differenzierung mittels API Coryne zur genauen Speziesbestimmung empfohlen. Ein weiterer Beleg für die lückenhafte Datenbank im Bereich der coryneformen Spezies ist die Tatsache, dass die Differenzierung von ca. 2/3 der Proben mit der MS Saramis und in ca. 1/3 der Fälle mit der MS Myla in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, da kein passendes Spektrum gefunden werden konnte.

Weitere Limitationen, aber auch Vorteile der Massenspektrometrie gegenüber anderen Verfahren zur Erregeridentifizierung wurden in der Vergangenheit beschrieben (Kline, K.A. et al., 2016). So ist beispielsweise die Überlegenheit der Massenspektrometrie gegenüber phänotypischen Methoden wie der Morphologie, der Gram-Färbung, der Katalase-Aktivität, der Lipophilie bei *Corynebacterium* spp. und den biochemischen Testverfahren wie dem API Coryne-Testkit bekannt (Soto, A. et al., 1994; Funke, G. + Renaud, F.N. et al., 1997). Nicht nur bezogen auf die Identifizierungsrate, sondern auch in Hinblick auf die niedrigeren Kosten und die schneller vorliegenden definitiven Ergebnisse hat die MS einen Vorteil. Trotzdem sind die Datenbanken noch unvollständig, weshalb die Sequenzierung zur sicheren Identifizierung eines Erregers weiterhin der Goldstandard ist (Bizzini, A. et al., 2011).

Die biochemische Differenzierung mittels des API Coryne-Systems zeigte eine Übereinstimmung mit den Sequenzierungsergebnissen auf dem Genuslevel in etwa der Hälfte der Fälle. Damit erzielte das biochemische Testsystem die höchste Übereinstimmung auf Genusebene der drei hier angewendeten Verfahren. Auf Speziesebene wurde ungefähr jeder 7. Erreger korrekt erkannt, wodurch diese Methode der Diagnostik nur noch von der MS Myla mit 21 % an richtigen Ergebnissen übertroffen wird. Bei 30 (7 %) der untersuchten Stämme wurde mittels API Coryne kein eindeutiges Ergebnis erzielt. Nur in einem Fall lieferte der API-Testkit kein auswertbares Ergebnis. Diese im Vergleich zu den Datenbanken der MS niedrige Zahl an ergebnislosen Identifizierungen ist damit zu erklären, dass das API Coryne-Testsystem stets ein – nicht zwingend richtiges – Ergebnis aus dem Bereich der coryneformen Spezies liefert und nur im Falle einer Kontamination ungültig wird.

Corynebacterium spp. stellen den Hauptteil der durch das API Coryne-System ermittelten Ergebnisse und einige Spezies werden von diesem bekanntermaßen auch gut erkannt (Hinic, V. et al., 2012). Für eine eindeutige Identifizierung sind jedoch meist noch zusätzliche Tests erforderlich (Freney, J. et al., 1991). Von den Corynebakterien wurden circa 2/3 korrekt bis zum Genus und ungefähr jeder 7. Erreger richtig bis zur Spezies bestimmt. Anzumerken ist, dass besonders häufig *C. glucuronolyticum* und *C. urealyticum* korrekt identifiziert werden konnten. Etwas weniger als die Hälfte der ermittelten *Actinomyces* spp. wurden korrekt auf Genusebene erkannt und jede 5. Identifizierung gelang richtig bis zur Speziesebene. Hier waren es vor allem *A. radingae* und *A. turicensis*, die identifiziert wurden. *Actinobaculum/Actinotignum* spp. wurden durch das API Coryne-System in der vorliegenden Arbeit in keinem Fall erkannt, da diese Spezies nicht in der Datenbank hinterlegt sind und als Gardnerellen und Arcanobakterien fehlgedeutet werden (Reinhard, M. et al., 2005). Aufgrund der geringen Fallzahl lässt sich hier keine allgemeingültige Aussage treffen. Sollte daher der klinische Verdacht auf eine Infektion mit *Actinobaculum/Actinotignum* spp. bestehen, ist nur die Differenzierung mittels Massenspektrometrie oder PCR zielführend.

Limitierende Faktoren des API Coryne-Systems stellen der hohe Zeitaufwand zur Präparation der Kavitäten und die Inkubationszeit von 24 Stunden dar und die zum Teil nicht eindeutig zu beurteilenden Farbreaktionen. Ein weiteres Problem ist die von den Herstellern geforderte sehr hohe Keimdichte entsprechend einem McFarland Standard 6 für die Inokulation der Kavitäten.

4.3 Betrachtungen zur Verlängerung der Inkubationsdauer

Mit der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin der Einfluss der Inkubationsdauer der beimpften Medien auf den Nachweis von coryneformen Bakterien untersucht werden. Daher wurde die Inkubationsdauer bei ansonsten identen Bedingungen um zwei Tage auf insgesamt vier Tage verlängert.

Da mehr als die Hälfte der nach vier Tagen der Inkubation neu detektierten Erreger Gram-Positive Stäbe waren, kann man schlussfolgern, dass eine längere Inkubation den Nachweis von Gram-positiven Erregern in geringem Maße verbessern kann. Bezogen auf *Actinobaculum*, *Actinomyces* und *Arcanobacterium* spp. gibt es Publikationen, die eine Inkubationszeit von bis zu fünf Tagen für die Anzucht verwendeten, um eine optimale Ausbeute zu erzielen (Sarkonen, N. et al., 2001; Hansen, J.M. et al., 2009). Speziell für *Actinomyces* spp. und *Corynebacterium* spp. lässt sich in der aktuellen Arbeit im Vergleich dazu feststellen, dass die 2-tägige Inkubation für den Nachweis ausreichend ist, da bereits ein großer Teil dieser Spezies nach zwei Tagen makroskopisch gut sichtbar ist.

Bezogen auf *Actinobaculum/Actinotignum* spp. zeigt sich, dass jedes 7. Isolat dieser Spezies erst nach vier Tagen der Inkubation sichtbar wird. Somit erhöht die 4-tägige Inkubation die Nachweiswahrscheinlichkeit dieser Spezies und sollte in Betracht gezogen werden, sofern gezielt nach diesem Genus gesucht wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit keinen nennenswerten Informationsgewinn bringt, da nahezu 80 % der Gram-positiven Stäbe auch schon nach zwei Tagen nachweisbar waren und somit nur bei speziellen Verdachtsmomenten (z. B. Infektion mit *Actinotignum* spp.) die 4-tägige Inkubation sinnvoll erscheint.

4.4 Aktuelle Entwicklungen

Der Wunsch nach schnellen Ergebnissen und Standardisierung bzw. Ökonomisierung in der mikrobiologischen Routinediagnostik führte zur Entwicklung von Automaten zur Urinanalyse in den letzten Jahren. Diese Automaten schaffen optimale Inkubationsbedingungen, reduzieren die Inkubationszeit und versprechen schnellere Ergebnisse bei minimiertem Arbeitsaufwand für das Laborpersonal. Lainhart, W. et al. (2018) stellten in ihrer Studie dazu fest, dass die automatische Analyse die Identifizierung von anspruchsvollen Uropathogenen verbessern kann, was die Autoren auf die stabilen Inkubationsbedingungen und die Verwendung eines größeren Urinvolumens zurückführten. Die häufigsten Uropathogene (*Enterobacteriaceae* und Gram-positive Kokken) wurden gleichermaßen vom Automaten und vom Massenspektrometer erkannt. Gram-positive Stäbe wurden hier nicht explizit aufgeführt.

In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass signifikant mehr *Actinomyces* spp., *A. schaalii*, *Alloscardovia omnicoles*, Corynebakterien, Gardnerellen sowie Lactobazillen durch den Automaten nachweisbar waren (Klein, S. et al., 2018). Dieses Ergebnis konnte durch die Autoren nicht erklärt werden, lässt aber einen potentiellen Vorteil der Automaten bei der Analyse Gram-positiver Stäbe vermuten. Einen klinisch relevanten Zeitgewinn bis zum Erhalt der Ergebnisse konnte für den Automaten nicht gezeigt werden, was von Theparee, T. et al. (2018) auch bestätigt wird. Vor allem langsam wachsende Bakterien werden nicht suffizient erfasst aufgrund der kürzeren Inkubationszeit.

Zu diesem Aspekt lässt sich abschließend sagen, dass das automatisierte Verfahren eine Ergänzung für die konventionelle Urindiagnostik sein kann, da es speziell für die Detektion von Gram-positiven Stäben einen Vorteil zu haben scheint. Hier sollten jedoch zunächst weitere Studien erfolgen um eine valide Aussage treffen zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 1.170 Urinproben von Patienten der Universitätsmedizin Rostock gezielt auf das Vorhandensein von Gram-positiven Stäbchenbakterien untersucht. Hierbei wurden verschiedene Differenzierungsmethoden, i. e. die Gram-Färbung, das API Coryne-Testsystem zur Prüfung der biochemischen Eigenschaften, die Massenspektrometrie mit zwei verschiedenen Datenbanken (Myla und Saramis) und die 16S rDNA-Gensequenzierung als Differenzierungsmethoden angewandt.

Aus Mittelstrahlurinen wurden mit 86 % aller gefundenen coryneformen Spezies die meisten Erreger isoliert, wobei man ggf. als ursächlich eine hohe Kontaminationswahrscheinlichkeit postulieren muss. Eine gehäufte Assoziation Gram-positiver Stäbe aus Urin mit Kontakt zu Fremdmaterialien wie z. B. Katheterschläuchen konnte ausgeschlossen werden.

Der altersabhängig gehäufte Nachweis Gram-positiver Stäbe aus Urinproben war für das fortgeschrittene Lebensalter (>60 Jahre) zu verzeichnen, insbesondere für die Genera *Actinobaculum* und *Actinotignum*.

Bezüglich des Geschlechts konnte kein genereller Zusammenhang zu coryneformen Erregern in Urinproben gefunden werden. Lediglich für einzelne Spezies ist eine Assoziation zum Geschlecht zu vermuten, bei geringer Fallzahl jedoch vorsichtig zu interpretieren.

Durch die Arbeit konnte gezeigt werden, dass zur Identifizierung coryneformer Bakterien die Massenspektrometrie mittels Myla-Datenbank eine zuverlässige Methodik ist, wenn schnelle und auch belastbare Ergebnisse benötigt werden. Ansonsten ist die 16S rDNA-Gensequenzierung bezüglich der Identifikation weiterhin als Goldstandard anzusehen.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit der beimpften Kulturmedien auf vier Tage bringt nur wenig Informationsgewinn, da der Großteil der Gram-positiven Stäbe auch schon nach zwei Tagen nachweisbar war. Somit ist eine routinemäßige Verlängerung der Inkubationszeit zur Detektion Gram-positiver Stäbe aus Urin nicht generell zu fordern, kann aber bei speziellen Verdachtsmomenten eine sinnvolle Ergänzung der Routinediagnostik darstellen.

Anhang

Abkürzungen

API	Analytical Profile Index
BU	Beutelurin
CNA	Colistin-Nalidixinsäure
CU	Conduiturin
D	Deutschland
dest.	destilliert
DK	Dauerblasenkatheter
DKU	Dauerblasenkatheterurin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einmalkatheter
EU	Erststrahlurin
FU	Fistelurin
GNK	Gram-negative Kokken
GNS	Gram-negative Stäbe
GPK	Gram-positive Kokken
GPS	Gram-positive Stäbchenbakterien
k. A.	keine Angabe
kw	kein Wachstum
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionisation-time of flight
MF	Mischflora
MS	Massenspektrometrie
MSU	Mittelstrahlurin
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
sp.	Spezies
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TU	Topfurin
UF	Urethralflora
w	Wachstum

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1

Taxonomische Übersicht der Genera *Actinobaculum*, *Actinotignum*, *Actinomyces* und *Corynebacterium* (Johanna Lenc, Leibnitz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland)

<i>Actinobaculum</i>	<i>A. johnsonii</i>
<i>A. massiliense corrig.</i>	<i>A. liubingyangii</i>
<i>A. suis</i>	<i>A. marimammalium</i> ≡ <i>Boudabousia marimammalium</i>
<i>Actinotignum</i>	<i>A. massiliensis</i>
<i>A. sanguinis</i>	<i>A. meyeri</i> ≡ <i>Schaalia meyeri</i>
<i>A. schaalii</i>	<i>A. naeslundii</i>
<i>A. urinale</i>	<i>A. nasicola</i> ≡ <i>Bowdeniella nasicola</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>A. naturae</i> ≡ <i>Schaalia naturae</i>
<i>A. bernardiae</i> ≡ <i>Trueperella bernardiae</i>	<i>A. neuii</i> ≡ <i>Winkia neuii</i>
<i>A. bovis</i>	<i>A. neuii ssp. neuii</i> ≡ <i>Winkia neuii</i>
<i>A. bowdenii</i>	<i>A. neuii ssp. anitratus</i> ≡ <i>Winkia neuii ssp. anitrata</i>
<i>A. canis</i> ≡ <i>Schaalia canis</i>	<i>A. odontolyticus</i> ≡ <i>Schaalia odontolytica</i>
<i>A. cardiffensis</i> ≡ <i>Schaalia cardiffensis</i>	<i>A. oricola</i>
<i>A. catuli</i>	<i>A. oris</i>
<i>A. coleocanis</i> ≡ <i>Gleimia coleocanis</i>	<i>A. pyogenes</i> ≡ <i>Trueperella pyogenes</i>
<i>A. dentalis</i>	<i>A. radidentis</i>
<i>A. denticolens</i>	<i>A. radingae</i> ≡ <i>Schaalia radingae</i>
<i>A. europaeus</i> ≡ <i>Gleimia europaea</i>	<i>A. ruminicola</i>
<i>A. funkei</i> ≡ <i>Schaalia funkei</i>	<i>A. slackii</i>
<i>A. gaoshouyii</i>	<i>A. suimastitidis</i> ≡ <i>Schaalia suimastitidis</i>
<i>A. georgiae</i> ≡ <i>Schaalia georgiae</i>	<i>A. tangfeifanii</i>
<i>A. gerencseriae</i>	<i>A. timonensis</i>
<i>A. graevenitzii</i>	<i>A. turicensis</i> ≡ <i>Schaalia turicensis</i>
<i>A. haliotis</i>	<i>A. urogenitalis</i>
<i>A. hominis</i> ≡ <i>Gleimia hominis</i>	<i>A. vaccimaxillae</i> ≡ <i>Schaalia vaccimaxillae</i>
<i>A. hongkongensis</i> ≡ <i>Pauljensenia hongkongensis</i>	<i>A. viscosus</i>
<i>A. hordeovulneris</i> ≡ <i>Buchananella hordeovulneris</i>	<i>A. vulturis</i>
<i>A. howellii</i>	<i>A. weissii</i>
<i>A. humiferus</i> ≡ <i>Cellulomonas humilata</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>A. hyovaginalis</i> ≡ <i>Schaalia hyovaginalis</i>	<i>C. accolens</i>
<i>A. israelii</i>	<i>C. afermentans</i>

<i>C. afermentans</i> ssp. <i>lipophilum</i>
<i>C. ammoniagenes</i>
<i>C. amycolatum</i>
<i>C. appendicis</i>
<i>C. aquaticum</i> ≡ <i>Leifsonia aquatica</i>
<i>C. aquatimens</i>
<i>C. aquilae</i>
<i>C. argentoratense</i>
<i>C. atrinae</i>
<i>C. atypicum</i>
<i>C. aurimucosum</i>
<i>C. auris</i>
<i>C. auriscanis</i>
<i>C. belfantii</i>
<i>C. betae</i> = <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
<i>C. beticola</i>
<i>C. bovis</i>
<i>C. callunae</i>
<i>C. camporealensis</i>
<i>C. canis</i>
<i>C. capitovis</i>
<i>C. casei</i>
<i>C. caspium</i>
<i>C. ciconiae</i>
<i>C. confusum</i>
<i>C. coyleae</i>
<i>C. crudilactis</i>
<i>C. cystitidis</i>
<i>C. deserti</i>
<i>C. diphtheriae</i>
<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>lausannense</i>
<i>C. doosanense</i>
<i>C. durum</i>
<i>C. efficiens</i>
<i>C. epidermidicanis</i>
<i>C. equi</i> = <i>Rhodococcus hoagii</i>

<i>C. faecale</i>
<i>C. falsenii</i>
<i>C. fascians</i> ≡ <i>Rhodococcus fascians</i>
<i>C. felinum</i>
<i>C. flaccumfaciens</i> ≡ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
<i>C. flaccumfaciens</i> ssp. <i>flaccumfaciens</i>
<i>C. flaccumfaciens</i> ssp. <i>oortii</i>
<i>C. flaccumfaciens</i> ssp. <i>poinsettiae</i>
<i>C. flaccumfaciens</i> ssp. <i>betae</i>
<i>C. flavescens</i> corrig.
<i>C. fournieri</i> corrig.
<i>C. frankenforstense</i>
<i>C. freiburgense</i>
<i>C. freneyi</i>
<i>C. glaucum</i>
<i>C. glucuronolyticum</i>
<i>C. glutamicum</i>
<i>C. glyciniphilum</i>
<i>C. godavarianum</i>
<i>C. gottingense</i>
<i>C. guangdongense</i>
<i>C. hadale</i>
<i>C. halotolerans</i>
<i>C. hansenii</i>
<i>C. hoagii</i> ≡ <i>Rhodococcus hoagii</i>
<i>C. humireducens</i>
<i>C. ilicis</i>
<i>C. imitans</i>
<i>C. insidiosum</i> ≡ <i>Clavibacter insidiosus</i>
<i>C. iranicum</i> ≡ <i>Rathayibacter iranicus</i>
<i>C. jeddahense</i>
<i>C. jeikeium</i>
<i>C. kroppenstedtii</i>
<i>C. kutscheri</i>
<i>C. lactis</i>
<i>C. lilium</i>

<i>C. lipophiloflavum</i>
<i>C. liquefaciens</i> = <i>Glutamicibacter nicotianae</i>
<i>C. lowii</i>
<i>C. lubricantis</i>
<i>C. macginleyi</i>
<i>C. marinum</i>
<i>C. maris</i>
<i>C. massiliense</i>
<i>C. mastitidis</i>
<i>C. matruchothii</i>
<i>C. michiganense</i> ≡ <i>Clavibacter michiganensis</i>
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>insidiosum</i> ≡ <i>Clavibacter insidiosus</i>
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>tessellarius</i> ≡ <i>Clavibacter tessellarius</i>
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>Nebraskense</i> ≡ <i>Clavibacter nebraskensis</i>
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>sepedonicum</i> ≡ <i>Clavibacter sepedonicus</i>
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>michiganense</i> ≡ <i>Clavibacter michiganensis</i>
<i>C. minutissimum</i>
<i>C. mucifaciens</i>
<i>C. mustelae</i>
<i>C. mycetoides</i>
<i>C. nasicanis</i>
<i>C. nebraskense</i> ≡ <i>Clavibacter nebraskensis</i>
<i>C. nuruki</i>
<i>C. oculi</i>
<i>C. oortii</i> = <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
<i>C. otitidis</i>
<i>C. paurometabolum</i> ≡ <i>Tsukamurella paurometabola</i>
<i>C. pelargi</i>
<i>C. phocae</i>
<i>C. pilbarensis</i>
<i>C. pilosum</i>
<i>C. poinsettiae</i> = <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
<i>C. pollutisoli</i>
<i>C. propinquum</i>

<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
<i>C. pseudotuberculosis</i>
<i>C. pyogenes</i> ≡ <i>Trueperella pyogenes</i>
<i>C. pyruviciproducens</i>
<i>C. rathayi</i> ≡ <i>Rathayibacter rathayi</i>
<i>C. renale</i>
<i>C. resistens</i>
<i>C. riegelii</i>
<i>C. sepedonicum</i> ≡ <i>Clavibacter sepedonicus</i>
<i>C. simulans</i>
<i>C. singulare</i>
<i>C. sphenisci</i>
<i>C. spheniscorum</i>
<i>C. sputi</i>
<i>C. stationis</i>
<i>C. striatum</i>
<i>C. suicordis</i>
<i>C. sundsvallense</i>
<i>C. tapiri</i>
<i>C. terpenotabidum</i>
<i>C. testudinoris</i>
<i>C. thomssenii</i>
<i>C. timonense</i>
<i>C. trachiae</i>
<i>C. tritici</i> ≡ <i>Rathayibacter tritici</i>
<i>C. tuberculostearicum</i>
<i>C. tuscaniense</i> corrig.
<i>C. ulcerans</i>
<i>C. ulceribovis</i>
<i>C. urealyticum</i>
<i>C. ureicelerivorans</i>
<i>C. uropygiale</i>
<i>C. uterequi</i>
<i>C. variabile</i> corrig.
<i>C. vitaeruminis</i> corrig.
<i>C. xerosis</i>

Quellenverzeichnis

- Alatoom, A.A.; Cazanave, C.J.; Cunningham, S.A.; Ihde, S.M.; Patel, R. (2012): Identification of Non-diphtheriae *Corynebacterium* by Use of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry. In: *Journal of Clinical Microbiology* 50, S. 160–163
- Andersen, L.B.; Bank, S.; Hertz, B.; Soby, K.M.; Prag, J. (2012): *Actinobaculum schaalii*, a Cause of Urinary Tract Infections in Children? In: *Acta Paediatrica* 101, S. 232–234
- Aragon, I.M.; Herrera-Imbroda, B.; Queipo-Ortuno, M.I.; Castillo, E.; Del Moral, J.S.-G.; Gomez-Millan, J. et al. (2018): The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. In: *European Urology Focus* 4, S. 128–138
- Bank, S.; Hansen, T.M.; Soby, K.M.; Lund, L.; Prag, J. (2011): *Actinobaculum schaalii* in Urological Patients, Screened with Real-time Polymerase Chain Reaction. In: *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 45, S. 406–410
- Bank, S.; Jensen, A.; Hansen, T.M.; Soby, K.M.; Prag, J. (2010): *Actinobaculum schaalii*, a Common Uropathogen in Elderly Patients, Denmark. In: *Emerging Infectious Diseases* 16, S. 76–80
- Barberis, C.; Almuzara, M.; Join-Lambert, O.; Ramirez, M.S.; Famiglietti, A.; Vay, C. (2014): Comparison of the Bruker MALDI-TOF Mass Spectrometry System and Conventional Phenotypic Methods for Identification of Gram-positive Rods. In: *PloS one* 9
- Belmares, J.; Dettlerline, S.; Pak, J.B.; Parada, J.P. (2007): *Corynebacterium* Endocarditis Species-specific Risk Factors and Outcomes. In: *BMC Infectious Diseases* 7, S. 4
- Bittel, M.; Gastiger, S.; Amin, B.; Hofmann, J.; Burkovski, A. (2018): Surface and Extracellular Proteome of the Emerging Pathogen *Corynebacterium ulcerans*. In: *Proteomes* 6
- Bizzini, A.; Jatton, K.; Romo, D.; Bille, J.; Prod'homme, G.; Greub, G. (2011): Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-to-identify Bacterial Strains. In: *Journal of Clinical Microbiology* 49, S. 693–696
- Bucevic Popovic, V.; Situm, M.; Chow, C.-E. T.; Chan, L.S.; Roje, B.; Terzic, J. (2018): The Urinary Microbiome Associated with Bladder Cancer. In: *Scientific Reports* 8, Artikelnummer 12157
- Cai, T.; Nesi, G.; Mazzoli, S.; Meacci, F.; Lanzafame, P.; Caciagli, P. et al. (2015): Asymptomatic Bacteriuria Treatment is Associated with a Higher Prevalence of Antibiotic Resistant Strains in Women with Urinary Tract Infections. In: *Clinical Infectious Diseases* 61, S. 1655–1661
- Carvalho, R.V. de Lima; F.F. da Silva; Santos, C.S.D.; Souza, M.C. de; Silva, R.S. da; Mattos-Guaraldi, A.L. de (2018): Central Venous Catheter-related Infections Caused by *Corynebacterium amycolatum* and Other Multiresistant Non-diphtherial *Corynebacteria* in Paediatric Oncology Patients. In: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 22, S. 347–351
- Clarke, T.M.; Citron, D.M.; Towfigh, S. (2010): The Conundrum of the Gram-positive Rod. Are We Missing Important Pathogens in Complicated Skin and Soft-tissue Infections? A Case Report and Review of the Literature. In: *Surgical Infections* 11, S. 65–72

- Clarridge, J.E.; Zhang, Q. (2002): Genotypic Diversity of Clinical *Actinomyces* Species. Phenotype, Source, and Disease Correlation Among Genospecies. In: *Journal of Clinical Microbiology* 40, S. 3442–3448
- Devriese, L.A.; Riegel, P.; Homme, J.; Vanechoutte, M.; Baere, T. de; Haesebrouck, F. (2001): Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* Strains from the Urogenital Tract of Humans and Pigs. In: *Journal of Clinical Microbiology* 39, S. 1686
- Diez-Aguilar, M.; Ruiz-Garbajosa, P.; Fernandez-Olmos, A.; Guisado, P.; Del Campo, R.; Quereda, C. et al. (2013): Non-diphtheriae *Corynebacterium* Species. An Emerging Respiratory Pathogen. In: *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 32, S. 769–772
- Freney, J.; Duperron, M.T.; Courtier, C.; Hansen, W.; Allard, F.; Boeufgras, J.M. et al. (1991): Evaluation of API Coryne in Comparison with Conventional Methods for Identifying Coryneform Bacteria. In: *Journal of Clinical Microbiology* 29, S. 38–41
- Funke, G.; Graevenitz, A. von; Clarridge, J.E.; Bernard, K.A. (1997): Clinical Microbiology of Coryneform Bacteria. In: *Clinical Microbiology Reviews* 10, S. 125–159
- Funke, G.; Lawson, P.A.; Bernard, K.A.; Collins, M.D. (1996): Most *Corynebacterium xerosis* Strains Identified in the Routine Clinical Laboratory Correspond to *Corynebacterium amycolatum*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 34, S. 1124–1128
- Funke, G.; Renaud, F.N.; Freney, J.; Riegel, P. (1997): Multicenter Evaluation of the Updated and Extended API (RAPID) Coryne database 2.0. In: *Journal of Clinical Microbiology* 35, S. 3122–3126
- Furness, G.; Sambury, S.; Evangelista, A.T. (1979): *Corynebacterium pseudogenitalium* sp. nov. Commensals of the Human Male and Female Urogenital Tracts. In: *Investigative Urology* 16, S. 292–295
- Gherardi, G.; Di Bonaventura, G.; Pompilio, A.; Savini, V. (2015): *Corynebacterium glucuronolyticum* Causing Genitourinary Tract Infection. Case Report and Review of the Literature. In: *IDCases* 2, S. 56–58
- Graevenitz, A. von; et al. (2011): *Actinomyces neuui*. Review of an Unusual Infectious Agent. In: *Infection* 39, S. 97–100
- Greub, G.; Raoult, D. (2002): „*Actinobaculum massiliae*,“ a New Species Causing Chronic Urinary Tract Infection. In: *Journal of Clinical Microbiology* 40, S. 3938–3941
- Grin, P.M.; Kowalewska, P.M.; Alhazzan, W.; Fox-Robichaud, A.E. (2013): *Lactobacillus* for Preventing Recurrent Urinary Tract Infections in Women. Meta-analysis. In: *Canadian Journal of Urology* 20, S. 6607–6614
- Hacker, E.; Antunes, C.A.; Mattos-Guaraldi, A.L.; Burkovski, A.; Tauch, A. (2016): *Corynebacterium ulcerans*, an Emerging Human Pathogen. In: *Future Microbiology* 11, S. 1191–1208
- Hansen, J.M.; Fjeldsoe-Nielsen, H.; Sulim, S.; Kemp, M.; Christensen, J.J. (2009): *Actinomyces* Species. A Danish Survey on Human Infections and Microbiological Characteristics. In: *The Open Microbiology Journal* 3, S. 113–120

Hilt, E.E.; McKinley, K.; Pearce, M.M.; Rosenfeld, A.B.; Zilliox, M.J.; Mueller, E.R. et al. (2013): Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques to Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. In: *Journal of Clinical Microbiology* 52, S. 871–876

Hinic, V.; Lang, C.; Weisser, M.; Straub, C.; Frei, R.; Goldenberger, D. (2012): *Corynebacterium tuberculostearicum*. A Potentially Misidentified and Multiresistant *Corynebacterium* Species Isolated from Clinical Specimens. In: *Journal of Clinical Microbiology* 50, S. 2561–2567

Hovellius B.; Mårdh P.A. (1984): *Staphylococcus saprophyticus* as a Common Cause of Urinary Tract Infections. In: *Reviews of Infectious Diseases* 6, S. 328–337

Janulaitiene M.; Paliulyte V.; Grinceviciene S. et al. (2017): Prevalence and Distribution of *Gardnerella vaginalis* Subgroups in Women With and Without Bacterial Vaginosis. In: *BMC Infectious Diseases* 17, S. 394

Joussen, A.M.; Funke, G.; Joussen, F.; Herbertz, G. (2000): *Corynebacterium macginleyi*. A Conjunctiva Specific Pathogen. In: *The British Journal of Ophthalmology* 84, S. 1420–1422

Klein, S.; Nurjadi, D.; Horner, S.; Heeg, K.; Zimmermann, S.; Burckhardt, I. (2018): Significant Increase in Cultivation of *Gardnerella vaginalis*, *Alloscardovia omnicolens*, *Actinotignum schaalii*, and *Actinomyces* spp. in Urine Samples With Total Laboratory Automation. In: *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37, S. 1305–1311

Kline, K.A.; Lewis, A.L. (2016): Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. In: *Microbiology Spectrum* 4

Kogan, M.I.; Naboka, Y.L.; Ibishev, K.S.; Gudima, I.A.; Naber, K.G. (2015): Human Urine is Not Sterile – Shift of Paradigm. In: *Urologia Internationalis* 94, S. 445–452

Kononen, E.; Wade, W.G. (2015): *Actinomyces* and Related Organisms in Human Infections. In: *Clinical Microbiology Reviews* 28, S. 419–442

Kramer, H.; Kuffel, G.; Thomas-White, K.; Wolfe, A.J.; Vellanki, K.; Leehey, D.J. et al. (2018): Diversity of the Midstream Urine Microbiome in Adults With Chronic Kidney Disease. In: *International Urology and Nephrology* 50, S. 1123–1130

Krulwich, T.A.; Pate, J.L. (1971): Ultrastructural Explanation for Snapping Postfission Movements in *Arthrobacter crystallopoietes*. In: *Journal of Bacteriology* 105, S. 408–412

Lainhart, W.; Burnham, C.-A.D.; Onderdonk, A.B. (2018): Enhanced Recovery of Fastidious Organisms from Urine Culture in the Setting of Total Laboratory Automation. In: *Journal of Clinical Microbiology* 56

Leal, S.M.; Jones, M.; Gilligan, P.H. (2016): Clinical Significance of Commensal Gram-Positive Rods Routinely Isolated from Patient Samples. In: *Journal of Clinical Microbiology* 54, S. 2928–2936

Lewis, D.A.; Brown, R.; Williams, J.; White, P.; Jacobson, S.K.; Marchesi, J.R.; Drake, M.J. (2013): The Human Urinary Microbiome; Bacterial DNA in Voided Urine of Asymptomatic Adults. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, S. 41

Lo, S.; Thiam, I.; Fall, B.; Ba-Diallo, A.; Diallo, O.F.; Diagne, R. et al. (2015): Urinary Tract Infection With *Corynebacterium aurimucosum* After Urethroplasty Stricture of the Urethra. A Case Report. In: *Journal of Medical Case Reports* 9, S. 156

Lotte, R.; Lotte, L.; Ruimy, R. (2016): *Actinotignum schaalii* (Formerly *Actinobaculum schaalii*). A Newly Recognized Pathogen-review of the Literature. In: *Clinical Microbiology and Infection* 22, S. 28–36

Morand, A.; Cornu, F.; Dufour, J.-C.; Tsimaratos, M.; Lagier, J.-C.; Raoult, D.; Kraft, C.S. (2019): Human Bacterial Repertoire of the Urinary Tract. A Potential Paradigm Shift. In: *Journal of Clinical Microbiology* 57

Moustafa, A.; Li, W.; Singh, H.; Moncera, K.J.; Torralba, M.G.; Yu, Y. et al. (2018): Microbial Metagenome of Urinary Tract Infection. In: *Scientific Reports* 8, S. 4333

Mushtaq A.; Chen D.J.; Strand G.J.; Dylla B.L.; Cole N.C.; Mandrekar J.; Patel R. (2016): Clinical Significance of Coryneform Gram Positive Rods from Blood Identified by Maldi-TOF Mass Spectrometry. In: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85, S. 372–376

Nielsen, H.L.; Soby, K.M.; Christensen, J.J.; Prag, J. (2010): *Actinobaculum schaalii*. A Common Cause of Urinary Tract Infection in the Elderly Population. Bacteriological and Clinical Characteristics. In: *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 42, S. 43–47

Olsen, A.B.; Andersen, P.K.; Bank, S.; Soby, K.M.; Lund, L.; Prag, J. (2013): *Actinobaculum schaalii*, a Commensal of the Urogenital Area. In: *BJU International* 112, S. 394–397

Pedersen, H.; Senneby, E.; Rasmussen, M. (2017): Clinical and Microbiological Features of *Actinotignum* Bacteremia. A Retrospective Observational Study of 57 Cases. In: *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 36, S. 791–796

Perez-Parra, S.; Pena, A.; Blanca, E.; Garcia, F. (2016): Lethal Endocarditis Due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. In: *Revista Chilena de Infectologia* 33, S. 229–231

Reinhard, M.; Prag, J.; Kemp, M.; Andresen, K.; Klemmensen, B.; Højlyng, N. et al. (2005): Ten Cases of *Actinobaculum schaalii* Infection. Clinical Relevance, Bacterial Identification, and Antibiotic Susceptibility. In: *Journal of Clinical Microbiology* 43, S. 5305–5308

Rezaei Bookani, K.; Marcus, R.; Cheikh, E.; Parish, M.; Salahuddin, U. (2018): *Corynebacterium jeikeium* Endocarditis. A Case Report and Comprehensive Review of an Underestimated Infection. In: *IDCases* 11, S. 26–30

Romling, U.; Kjelleberg, S.; Normark, S.; Nyman, L.; Uhlin, B.E.; Akerlund, B. (2014): Microbial Biofilm Formation. A Need to Act. In: *Journal of Internal Medicine* 276, S. 98–110

Rossen, J.W.A.; Friedrich, A.W.; Moran-Gilad, J. (2018): Practical Issues in Implementing Whole-genome-sequencing in Routine Diagnostic Microbiology. In: *Clinical Microbiology and Infection* 24, S. 355–360

Sabbe, L.J.; van de Merwe, D.; Schouls, L.; Bergmans, A.; Vanechoutte, M.; Vandamme, P. (1999): Clinical Spectrum of Infections Due to the Newly Described *Actinomyces* Species *A. turicensis*, *A. radingae*, and *A. europaeus*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 37, S. 8–13

Salem, N.; Salem, L.; Saber, S.; Ismail, G.; Bluth, M.H. (2015): *Corynebacterium urealyticum*. A Comprehensive Review of an Understated Organism. In: *Infection and Drug Resistance* 8, S. 129–145

Sánchez-Martín, F.M.; López-Martínez, J.M.; Kanashiro-Azabache, A.; Moncada, E.; Angerri-Feu, O.; Millán-Rodríguez, F.; Villavicencio-Mavrich, H. (2016): *Corynebacterium urealyticum*: Increased Incidence of Infection and Encrusted Uropathy. In: *Actas Urológicas Españolas* 40, S. 102–107

Santiago-Rodríguez, T.M.; Ly, M.; Bonilla, N.; Pride, D.T. (2015): The Human Urine Virome in Association With Urinary Tract Infections. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 14

Sapico, F.L.; Wideman, P.A.; Finegold, S.M. (1976): Aerobic and Anaerobic Flora in Bladder Urine of Patients With Indwelling Urethral Catheters. In: *Urology* 7, S. 382–384

Sarkonen, N.; Kononen, E.; Summanen, P.; Kononen, M.; Jousimies-Somer, H. (2001): Phenotypic Identification of Actinomyces and Related Species Isolated from Human Sources. In: *Journal of Clinical Microbiology* 39, S. 3955–3961

Sato, K.; Uchiyama, M. (2012): *Corynebacterium jeikeium* Bacteremia and Pulmonary Infiltrates in a Patient With Acute Myelogenous Leukemia. In: *BMJ Case Reports* 2012

Siegman-Igra, Y. et al. (1994): The Significance of Urine Culture With Mixed Flora. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 3, S. 656–659

Siegman-Igra, Y.; Kulka, T.; Schwartz, D.; Konforti, N. (1993): The Significance of Polymicrobial Growth in Urine. Contamination or True Infection. In: *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 25, S. 85–91

Soriano, F.; Tauch, A. (2008): Microbiological and Clinical Features of *Corynebacterium urealyticum*. Urinary Tract Stones and Genomics as the Rosetta Stone. In: *Clinical Microbiology and Infection* 14, S. 632–643

Soto, A.; Zapardiel, J.; Soriano, F. (1994): Evaluation of API Coryne System for Identifying Coryneform Bacteria. In: *Journal of Clinical Pathology* 47, S. 756–759

Stamm, W.E.; Tompkins, L.S.; Wagner, K.F.; Counts, G.W.; Thomas, E.D.; Meyers, J.D. (1979): Infection Due to *Corynebacterium* Species in Marrow Transplant Patients. In: *Annals of Internal Medicine* 91, S. 167–173

Stickler, D.J. et al. (2014): Clinical Complications of Urinary Catheters Caused by Crystalline Biofilms. Something Needs to be Done. In: *Journal of Internal Medicine* 276, S. 120–129

Theparee, T.; Das, S.; Thomson, R.B. (2018): Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround Times in the Clinical Microbiology Laboratory. A Retrospective Analysis. In: *Journal of Clinical Microbiology* 56

Ulett, G.C.; Totsika, M.; Schaale, K.; Carey, A.J.; Sweet, M.J.; Schembri, M.A. (2013): Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence and Innate Immune Responses During Urinary Tract Infection. In: *Current Opinion in Microbiology* 16, S. 100–107

Vedel, G.; Toussaint, G.; Riegel, P.; Fouilladieu, J.-L.; Billöet, A.; Poyart, C. (2006): *Corynebacterium pseudogenitalium* Urinary Tract Infection. In: *Emerging Infectious Diseases* 12, S. 355–356

Vila, J.; Juiz, P.; Salas, C.; Almela, M.; La Fuente, C.G. de; Zboromyrska, Y. et al. (2012): Identification of Clinically Relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry. In: *Journal of Clinical Microbiology* 50, S. 1745–1747

Yang, K.; Kruse, R.L.; Lin, W.V.; Musher, D.M. (2018): *Corynebacteria* as a Cause of Pulmonary Infection. A Case Series and Literature Review. In: *Pneumonia (Nathan Qld.)* 10, S. 10

Yassin, A.F.; Sproer, C.; Pukall, R.; Sylvester, M.; Siering, C.; Schumann, P. (2015): Dissection of the Genus *Actinobaculum*. Reclassification of *Actinobaculum schaalii* Lawson et al. 1997 and *Actinobaculum urinale* Hall et al. 2003 as *Actinotignum schaalii* gen. nov., comb. nov. and *Actinotignum urinale* comb. nov., Description of *Actinotignum sanguinis* sp. nov. and Emended Descriptions of the Genus *Actinobaculum* and *Actinobaculum suis*; and Re-examination of the Culture Deposited as *Actinobaculum massiliense* CCUG 47753T (= DSM 19118T), Revealing That it Does Not Represent a Strain of this Species. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, S. 615–624

Zasada, A.A.; Mosiej, E. (2018): Contemporary Microbiology and Identification of *Corynebacteria* spp. Causing Infections in Human. In: *Letters in Applied Microbiology* 66, S. 472–483

Zimmermann, P.; Berlinger, L.; Liniger, B.; Grunt, S.; Agyeman, P.; Ritz, N. (2012): *Actinobaculum schaalii* an Emerging Pediatric Pathogen? In: *BMC infectious diseases* 12, S. 201