

TOBIAS EISENBERG

Phylogenetische Untersuchungen und vergleichende
Genomanalysen innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae*
unter besonderer Berücksichtigung von
Streptobacillus moniliformis, dem
Erreger des Rattenbissfiebers



HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für die Fächer
Veterinärmedizinische Mikrobiologie und Tierseuchenbekämpfung
im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2018

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

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich Veterinärmedizin

Landesbetrieb Hessisches Landeslabor und
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

**Phylogenetische Untersuchungen und vergleichende Genomanalysen
innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* unter besonderer Berücksichtigung von
Streptobacillus moniliformis, dem Erreger des Rattenbissfiebers**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für die Fächer

Veterinärmedizinische Mikrobiologie

und **Tierseuchenbekämpfung**

im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. vet. Tobias Eisenberg

Gießen 2017

für meine wunderbare Frau Mariam

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIV
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	XV
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Nomenklatur der Erreger der Familie <i>Leptotrichiaceae</i>	3
2.1.1 <i>Streptobacillus</i>	3
2.1.2 <i>Sneathia</i>	5
2.1.3 <i>Sebaldella</i>	5
2.1.4 <i>Leptotrichia</i>	5
2.1.5 Subtypisierung bakterieller Spezies unter besonderer Berücksichtigung phylogenetischer Fragestellungen	6
2.1.6 Einführung in systematische Fragestellungen und Begrifflichkeiten	17
2.1.7 Erstellen von Verwandtschaftsanalysen	19
2.2 Natürliches Habitat und Wirtsspektrum von Vertretern der Familie <i>Leptotrichiaceae</i>	23
2.2.1 <i>Streptobacillus</i>	24
2.2.2 <i>Sneathia</i>	25
2.2.3 <i>Sebaldella</i>	26
2.2.4 <i>Leptotrichia</i>	26
2.2.5 Ratten als Wirtstiere für Streptobazillen	27
2.2.5.1 Speziesdiversität und Verbreitung von Ratten	27
2.2.5.2 Ratten als Überträger weiterer Krankheiten	30
2.2.5.3 Ratten in Gesellschaft, Symbolik, Kultur und Geschichte	31
2.3 Klinik	33
2.3.1 <i>Streptobacillus</i>	33
2.3.1.1 <i>Streptobacillus moniliformis</i>	33
2.3.1.1.1 Klinik beim Menschen	34
2.3.1.1.2 Klinik bei Tieren	36
2.3.1.2 <i>Streptobacillus hongkongensis</i>	37
2.3.1.3 Nicht näher identifizierte <i>Streptobacillus</i> -Phylotypen	38

Inhaltsverzeichnis

2.3.2	<i>Sneathia</i>	38
2.3.3	<i>Leptotrichia</i>	40
2.3.4	Spezies mit unklarer Zuordnung innerhalb der Familie <i>Leptotrichiaceae</i>	40
2.3.4.1	Nicht überprüfbare Fallberichte bei Tieren und Menschen mit unklarer Ätiologie	40
2.3.4.2	„ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ bei Hüpfmäusen in Australien	41
2.3.4.3	„ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ bei Meerschweinchen	42
2.3.4.4	„ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ bei Atlantischen Lachsen	44
2.4	Epidemiologische Aspekte zu Vertretern der Familie <i>Leptotrichiaceae</i>	44
2.5	Morphologie, kulturelle Wachstumsbedingungen und phänotypische Eigenschaften	47
2.5.1	<i>Streptobacillus</i>	47
2.5.2	<i>Sneathia</i>	51
2.5.3	<i>Sebaldella</i>	52
2.5.4	<i>Leptotrichia</i>	52
2.5.5	<i>Leptotrichiaceae</i> -Spezies mit unklarer Zuordnung	53
2.5.5.1	„ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ bei Meerschweinchen	53
2.5.5.2	„ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ bei Atlantischen Lachsen	54
2.6	Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung und Chemotherapie	57
2.6.1	<i>Streptobacillus</i>	57
2.6.2	<i>Sneathia</i>	58
2.6.3	<i>Leptotrichia</i>	59
2.7	Virulenzfaktoren und Pathogenität	60
2.7.1	<i>Streptobacillus</i>	60
2.7.2	<i>Sneathia</i>	62
2.8	Molekulare Charakterisierung und Genome von Vertretern der Familie <i>Leptotrichiaceae</i>	62
2.8.1	<i>Streptobacillus</i>	63
2.8.2	<i>Sneathia</i>	64
2.8.3	<i>Sebaldella</i>	64
2.8.4	<i>Leptotrichia</i>	65
2.9	Molekulare Diagnostik	65
3.	ZIELSETZUNG	69
4.	METHODIK	71
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	73
5.1	Aufbau einer Stammsammlung	73

Inhaltsverzeichnis

5.2	Phylogenetische Untersuchungen	77
5.2.1	<i>Streptobacillus felis</i> sp. nov.	78
5.2.2	<i>Streptobacillus notomytis</i> sp. nov.	82
5.2.3	<i>Streptobacillus ratti</i> sp. nov.	86
5.2.4	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. („ <i>Streptobacillus moniliformis</i> “ von Meerschweinchen)	90
5.2.5	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. („ <i>Streptobacillus</i> sp.“ von Atlantischen Lachsen)	93
5.3	Phänotypische und physiologische Untersuchungen	98
5.3.1	Biochemie	98
5.3.2	Antibiogramm und Chemotherapie	102
5.3.3	Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)	107
5.3.4	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)	109
5.3.5	Fettsäuremuster	112
5.3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	112
5.3.7	Virulenz	115
5.4	Untersuchungen zu den Gesamtgenomen	115
5.4.1	Genomanalyse und Analyse der putativen Proteinfunktionen	115
5.4.1.1	Analyse von Virulenzgenen und Pathogenitätsfaktoren	121
5.4.2	Phylogenetische Analyse der orthologen Gene der untersuchten <i>Streptobacillus</i> -Isolate	130
5.4.3	Typisierungsverfahren zur innerartlichen Verwandschaft von <i>S. moniliformis</i>	134
5.4.3.1	VNTR-Analyse	134
5.4.3.2	PCR-basierte Validierung der <i>in silico</i> erhobenen Ergebnisse	135
5.4.3.3	Überprüfung der Leistungsfähigkeit des beschriebenen MLVA-Schemas	141
5.5	Erweiterte Wirtsbeziehungen	141
5.6	Nachbemerkungen und Ausblicke	143
6.	VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN	145
6.1	<i>Streptobacillus</i> sp. isolated from a cat with pneumonia.	145
6.2	<i>Streptobacillus felis</i> sp. nov., isolated from a cat with pneumonia, and emended descriptions of the genus <i>Streptobacillus</i> and of <i>Streptobacillus moniliformis</i> .	153
6.3	Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus <i>Streptobacillus</i> .	186
6.4	Root sepsis associated with insect-dwelling <i>Sebaldella termitidis</i> in a lesser dwarf lemur (<i>Cheirogaleus medius</i>)	212

Inhaltsverzeichnis

6.5	<i>Streptobacillus notomytis</i> sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (<i>Notomys alexis</i> THOMAS, 1922), and emended description of <i>Streptobacillus</i> LEVADITI <i>et al.</i> 1925, EISENBERG <i>et al.</i> 2015 emend.	238
6.6	<i>Streptobacillus ratti</i> sp. nov., isolated from a black rat (<i>Rattus rattus</i>).	265
6.7	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov., sp. nov., a member of the family <i>Leptotrichiaceae</i> isolated from guinea pigs (<i>Cavia porcellus</i>).	296
6.8	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov., a novel member of the <i>Leptotrichiaceae</i> isolated from Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>).	328
6.9	Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other <i>Streptobacillus</i> infections in humans and animals.	366
6.10	Phylogenetic and comparative genomics of the family <i>Leptotrichiaceae</i> and introduction of a novel fingerprinting MLVA for <i>Streptobacillus moniliformis</i>	422
6.11	MALDI-UP – an internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra. User guide for http://maldi-up.ua-bw.de/ .	437
6.12	Acute tetraplegia caused by rat bite fever in snake keeper and transmission of <i>Streptobacillus moniliformis</i> .	455
7.	ZUSAMMENFASSUNG	465
8.	SUMMARY	467
9.	LITERATURVERZEICHNIS	469
	DANKSAGUNG	506

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AFLP: Amplifikationsfragmentlängen-Polymorphismen

AHL: Animal Health Laboratory, South Perth, Australien

ANI: *average nucleotide identity* (durchschnittliche Nukleotididentität)

API: *analytical profile index* (kommerzielles biochemisches Testsystem)

AS: Aminosäure/n

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

AUS: Australien

B.: *Bacillus*

BHI: *brain heart infusion* (Hirn-Herz-Bouillon)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

bp: Basenpaar/e

BV: bakterielle Vaginose

°C: Grad Celsius

C.: *Caviibacter*

CC: klonaler Komplex (*clonal complex*)

CCUG: Culture Collection, University of Gothenburg, Göteborg, Schweden

CDC: Center for Disease Control and Prevention (US-Gesundheitsbehörde)

CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, Frankreich

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COG: *clusters of orthologous groups of proteins*

CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DDH: DNS-DNS-Hybridisierung

Abkürzungsverzeichnis

DIN: Deutsche Industrienorm

DKFZ: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

E.: *Escherichia*

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F.: *Fusobacterium*

FISH: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstest

FRA: Frankreich

FT-IR: Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

GB: Großbritannien

G/C-Gehalt: Guanin/Cytosin-Gehalt

GER: Deutschland

GGDC: Genom-zu-Genom Distanz-Kalkulator (*in-silico* DNS-DNS-Hybridisierung)

groEL: Gen des bakteriellen Chaperonins

GroEL: Protein des bakteriellen Chaperonins

gyrB: Gen der bakteriellen Gyrase (B-Untereinheit)

GyrB: Protein der bakteriellen Gyrase (B-Untereinheit)

h: Stunde/n

HF: Haverhill-Fieber

HGT: horizontaler Gentransfer

HIV: Humanes Immundefizienzvirus

HON: Hong Kong

HPV: Humanes Papillomvirus

IB: Immunoblot

Abkürzungsverzeichnis

IE: Internationale Einheit/en

IFA: *immunofluorescence assay* (Immunfluoreszenztest)

IL: Interleukin

IPDH: Institut für Geflügelkrankheiten, Hannover

IRL: Irland

IS: Insertionssequenz

ITS: 16S-23S rRNS *internal transcribed spacer* (interne transkribierende Spacerregion)

IU/mL: internationale Einheiten pro Milliliter

JAP: Japan

JLU: Justus-Liebig-Universität Gießen

k. A.: keine Angabe

kDa: Kilo-Dalton

L.: *Leptotrichia*

L-Form: zellwandlose Bakterienvariante, benannt nach dem Lister (L)-Institut

LSU: große (Ribosomen)-Untereinheiten (*large subunits*)

M.: *Mycobacterium*

MATE: Multimedikament- und Toxin-Extrusion (*multidrug and toxin extrusions*)

MALDI-TOF MS: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (Flugzeit-Massenspektrometrie)

Mbp: Mega-Basenpaare

MCG: *maximum common genome* (maximale Genomgemeinsamkeit)

MDR: (Antibiotika)-Mehrfachresistenz (*multidrug resistance*)

MHK (MIC): minimale Hemmstoffkonzentration (*minimum inhibitory concentration*)

min.: Minute/n

Abkürzungsverzeichnis

Mio.: Million

mg/L: Milligramm pro Liter

ML: *maximum likelihood* Algorithmus

MLVA: Multilokus-VNTR-Analyse

MLSA: Multilokus-Sequenzanalyse

MLST: Multilokus-Sequenztypisierung

MP: *maximum parsimony* Algorithmus

NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

NCIMB: National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria, Aberdeen, Scotland

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

NGS: *next generation sequencing* (Vollgenomsequenzierung)

NJ: *neighbor-joining*

NL: Die Niederlande

NOR: Norwegen

nt: Nukleotide

O.: *Oceanivirga*

OD: optische Dichte

OTU: operational taxonomic units (operationelle taxonomische Einheiten), Phylotypen

PCR: *polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)

PFGE: Pulsfeldgelelektrophorese

PID: *pelvic inflammatory disease* (inflammatorische Beckenerkrankung)

POCP: *percentage of conserved proteins* (Prozentsatz konservierter Proteine)

R.: *Rattus*

Abkürzungsverzeichnis

R. n.: *Rattus norvegicus*

R. r.: *Rattus rattus*

RAPD: *random amplification of polymorphic DNA* (PCR)

RAST: *Rapid Annotation using Subsystem Technology*

RaTu: Rachentupfer

RBF: Rattenbissfieber

RDP: Ribosomal Database Project

recA: Gen der bakteriellen Rekombinase (A-Untereinheit)

RecA: Proteon der bakteriellen Rekombinase (A-Untereinheit)

REP: *repetitive extragenic palindromic* (PCR)

REU: La Réunion

RFLP: Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen

RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, Niederlande

rpoB: Gen der bakteriellen DNS-abhängigen RNS-Polymerase (B-Untereinheit)

RpoB: Protein der bakteriellen DNS-abhängigen RNS-Polymerase (B-Untereinheit)

S.: *Streptobacillus*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Se.: *Sebaldella*

sec.: Sekunde(n)

Sn.: *Sneathia*

SNPs: *single nucleotide polymorphisms* (einzelne Basenaustausche)

Sp.: *Spirillum*

SPF: spezifiziert pathogenfrei

SPR: *subtree pruning and regrafting*

SPS: sodium polyanethol sulfonate (Natrium-Polyanetholsulfonat)

Abkürzungsverzeichnis

SSR: *short sequence repeats*

SSU: kleine (Ribosomen)-Untereinheiten (*small subunits*)

ST: Sequenztyp

SWE: Schweden^T: Typstamm

TiHo Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

TLR: *Toll-like receptor* (Toll-ähnlicher Rezeptor)

TRF: *tandem repeat finder*

T5SS: Typ 5-Sekretionssystem

USA: Vereinigte Staaten von Nordamerika

VNTR: *variable number tandem repeat* (Analyse)

vs.: versus

w/v: Masse/Volumen

Y.: *Yersinia*

ZfV: Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 16S rRNS-Gen-basierte phylogenetische Analyse valider Spezies der Familie Leptotrichiaceae zum Zeitpunkt des Beginns der Untersuchungen

Abbildung 2: Schema zum diskriminatorischen Auflösungsvermögen etablierter phänotypischer und genotypischer Typisierungsmethoden für die systematische Klassifizierung von Prokaryoten

Abbildung 3: Schema zur Auswahl der geeigneten Subtypisierungsmethode

Abbildung 4: Schema zur Verdeutlichung phylogenetischer Begrifflichkeiten

Abbildung 5: A. Hausratte (*Rattus rattus*; Aufnahme: LARRY JON FRIESEN) und B. Wanderratte (*Rattus norvegicus*; Aufnahme: SIMON TONGE) sind die in Mitteleuropa heimischen Vertreter der aus etwa 65 Spezies bestehenden indoasiatischen Gattung *Rattus*

Abbildung 6: Rattenbissfieber sowie eine Reihe weiterer Zoonosen können selbst von als Haustiere gezüchteten Farbmorphen der Wanderratte nicht selten übertragen werden (Aufnahme: adamovalenka/pixaby.com)

Abbildung 7: Fütterung von Wanderratten im „heiligen Rattentempel von Karni-Mata“ im indischen Bundesstaat Rajasthan (Aufnahme: INGRID BUNSE)

Abbildung 8: Koloniemorphologie von *Streptobacillus moniliformis* nach 72-stündiger mikroaerophiler Inkubation auf Columbia-Schafblutagar

Abbildung 9: Gram-negative, pleomorphe Stäbchenbakterien (sechs Tage alte Kultur) von *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T

Abbildung 10: Ältere Kolonien von *Oceanivirga salmonicida* zeigen ein Backenzahn-ähnliches Wachstum (Aufnahme: R. PALMER)

Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierengewebe eines mit *Oceanivirga* (*O.*) *salmonicida* infizierten Atlantischen Lachses (Aufnahmen: R. PALMER)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: Phylogenetischer Baum der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welcher auf den partiellen 16S rRNS-Gensequenzen (1572 Nukleotide [nt]) beruht (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c])

Abbildung 13: Phylogenetische Bäume der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *groEL*-Gen- (1626 Nukleotide [nt]) und GroEL-Aminosäuresequenzen (539 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c])

Abbildung 14: Phylogenetische Bäume der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *gyrB*-Gen- (2034 Nukleotide [nt]) und GyrB-Aminosäuresequenzen (677 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c])

Abbildung 15: Phylogenetische Bäume der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *recA*-Gen- (1156 Nukleotide [nt]) und RecA-Aminosäuresequenzen (392 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c])

Abbildung 16: Phylogenetische 16S rRNS-Gensequenzanalyse valider Spezies aus der Familie *Leptotrichiaceae* (unterstrichen) unter Einbeziehung nahe verwandter Phylotypen aus Umweltproben

Abbildung 17: Dendrogramm auf Basis der Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) unter Verwendung der Spektren (*main spectra peak lists* [MSP]) der Familie *Leptotrichiaceae* aus der Datenbank (Bruker Taxonomy Database)

Abbildung 18: Lineare Diskriminantenanalyse (LDA) von 69 Infrarotspektren von 10 Isolaten unterschiedlicher *Streptobacillus*-Spezies, welche mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und der Gerätesoftware OPUS (vers. 4.2, BrukerOptics, Ettlingen) erzeugt wurden

Abbildung 19: Transmissionselektronenmikroskopischer Vergleich der *Streptobacillus*-Spezies, jeweils nach siebentägiger Kultur auf Schafblutagar bei 37°C (Aufnahme: VALERIJ AKIMKIN, CVUA Stuttgart)

Abbildung 20: Übersicht über die unterschiedliche Verteilung der Proteinfunktionen (*Clusters of Orthologous Groups* [COGs]) innerhalb der in dieser Arbeit verwendeten *Leptotrichiaceae*-Genome

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Überblick der Analyse zur Auswertung eines *Streptobacillus moniliformis*-Genoms im Hinblick auf putative Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene mittels SEED Viewer (integriert in RAST (Rapid Annotation Server; <http://rast.nmpdr.org/>))

Abbildung 22: Phylogenetisches Modell der Gattung *Streptobacillus* nach dem *Randomized Axelerated Maximum Likelihood*-Algorithmus.

Abbildung 23: Phylogenetisches Modell der Spezies *Streptobacillus moniliformis* nach dem *Randomized Axelerated Maximum Likelihood*-Algorithmus.

Abbildung 24: Neu etabliertes *Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis* (MLVA)-Schema zur Typisierung von *Streptobacillus moniliformis*.

Die Genehmigung zur Darstellung nicht-eigener Fotografien/Abbildungen wurde jeweils schriftlich eingeholt.

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweissysteme funktioneller Gene, welche für die Vertreter der *Leptotrichiaceae* als geeignet beschrieben wurden

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit berücksichtigten Isolate und Stämme aus der Familie der *Leptotrichiaceae*, deren Herkunft und gegebenenfalls deren klinische Relevanz sowie Übersicht bereits publizierter Genome dieser Vertreter

Tabelle 3: Physiologische Merkmale der in dieser Arbeit untersuchten Stämme

Tabelle 4: Erhebung von Daten zur minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) der in dieser Arbeit untersuchten Isolate und Stämme aus der Familie *Leptotrichiaceae*

Tabelle 5: Fettsäuremuster der in dieser Arbeit untersuchten Stämme

Tabelle 6: Analyse von prinzipiellen Genomdaten und kodierenden DNS-Regionen (CDS) der in dieser Arbeit verglichenen Genome aus der Familie *Leptotrichiaceae*

Tabelle 7: Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene gemäß SEED-Viewer

Tabelle 8: *Streptobacillus moniliformis*-spezifische *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR)-Loki sowie PCR-Bedingungen zu deren Nachweis

Tabelle 9: *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR)-Alleltypen für die in dieser Arbeit verwendeten *Streptobacillus moniliformis*-Isolate und -Stämme

1. **Eisenberg, T.**, A. Nessler, W. Nicklas, V. Spamer, H. Seeger & M. Zschöck (2014): *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. – JMM Case Reports, 2014: 1-7. DOI 10.1099/jmmcr.0.000562
2. **Eisenberg, T.**, S. Glaeser, W. Nicklas, N. Mauder, M. Contzen, K. Aledelbi & P. Kämpfer (2015): *Streptobacillus felis* sp. nov., isolated from a cat with pneumonia, and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and of *Streptobacillus moniliformis*. – Int J Syst Evol Microbiol (2015) 65(12): 2172- 2178. DOI: 10.1099/ijms.0.000238
3. **Eisenberg T.**, W. Nicklas, N. Mauder, J. Rau, M. Contzen, T. Semmler, N. Hofmann, K. Aledelbi & C. Ewers (2015): Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*. PLoS One. 2015 Aug 7;10(8):e0134312. DOI: 10.1371/journal.pone.0134312. eCollection 2015
4. **Eisenberg, T.**, S. P. Glaeser, P. Kämpfer, N. Schauerte & C. Geiger (2015): Root sepsis associated with insect-dwelling *Sebaldella termitidis* in a lesser dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*), *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(6): 1373-1382. DOI: 10.1007/s10482-015-0590-4
5. **Eisenberg, T.**, S. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, W. Nicklas, J. Rau, N. Mauder, N. Hofmann, K. Imaoka, M. Kimura & P. Kämpfer (2015): *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis* THOMAS, 1922), and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI *et al.* 1925, EISENBERG *et al.* 2015 emend. – Int J Syst Evol Microbiol, 65(12): 4823-4829. DOI: 10.1099/ijsem.0.000654
6. **Eisenberg, T.**, K. Imaoka, M. Kimura, S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, J. Rau, W. Nicklas, T. Tanikawa & P. Kämpfer (2016): *Streptobacillus ratti* sp. nov., isolated from a black rat (*Rattus rattus*). – Int J Syst Evol Microbiol, 66(4): 1620-1626. DOI: 10.1099/ijsem.0.000869

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

7. **Eisenberg, T.**, S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, B. Drescher & P. Kämpfer (2016): *Caviibacter abscessus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*). – Int J Syst Evol Microbiol, 66(4): 1652-1659. DOI: 10.1099/ijsem.0.000922
8. **Eisenberg, T.**, P. Kämpfer, C. Ewers, T. Semmler, S. P. Glaeser, E. Collins, M. Ruttledge & R. Palmer: (2016): *Oceanivirga salmonicida* gen. nov., sp. nov., a member of the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). – Int J Syst Evol Microbiol, 66(6): 2429-2437. DOI: 10.1099/ijsem.0.001050
9. **Eisenberg, T.**, C. Ewers, J. Rau, V. Akimkin & W. Nicklas (2016): Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other *Streptobacillus* infections in humans and animals. – Virulence, 7(6): 630-648. DOI: 10.1080/21505594.2016.1177694
10. **Eisenberg, T.**, A. Fawzy, W. Nicklas, T. Semmler & C. Ewers (2016): Phylogenetic and comparative genomics of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*. – BMC Genomics, 17(1): 864-875.
11. Rau, J. **T. Eisenberg**, A. Männig, C. Wind, P. Lasch, R. Sting (2016): MALDI-UP – An Internet Platform for the Exchange of MALDI-TOF Mass Spectra. User guide for <http://maldi-up.ua-bw.de/>. – Aspects of food control and animal health (eJournal), 2016(1): 1-17. (ISSN 2196-3460); URL: http://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201601.pdf.
12. **Eisenberg T.**, S. Poignant, Y. Jouan, A. Fawzy, W. Nicklas, C. Ewers, L. Mereghetti, A. Guillon (2017): Acute tetraplegia caused by rat bite fever in snake keeper and transmission of *Streptobacillus moniliformis*. – Emerg Infect Dis, 2017 Apr; 23(4): 719-721. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>.

1. EINLEITUNG

1. EINLEITUNG

Die Bakterien der Familie *Leptotrichiaceae* bilden eine – systematisch betrachtet – junge Einheit und sind unzureichend erforscht [Nolan *et al.* 2009]. Dies ist gleichfalls für den weltweit vorkommenden Zoonoseerreger *Streptobacillus (S.) moniliformis* zutreffend, welcher als wichtigster ätiologischer Erreger das so genannte Rattenbissfieber (RBF) auslöst und den bedeutsamsten Vertreter der Gruppe repräsentiert. Obwohl RBF vergleichsweise selten diagnostiziert wird, ist dennoch von einer hohen Dunkelziffer dieser potentiell mit schweren gesundheitlichen Komplikationen einhergehenden Infektionskrankheit auszugehen. Der animale Reservoirwirt, die Ratte, ist in hohem Maße mit *S. moniliformis* kolonisiert, auch wenn es bei dieser Spezies und weiteren Tierarten ebenfalls gelegentlich zu Erkrankungen kommt. Insbesondere ist ungeklärt, warum verschiedene genetische Mauslinien eine sehr unterschiedliche Empfänglichkeit für *S. moniliformis* aufweisen. Ursachen für das defizitäre Wissen um diesen Krankheitserreger liegen vor allem darin begründet, dass die molekularen Mechanismen der Pathogenese sowie die Ausstattung mit Virulenzfaktoren und Resistenzgenen gänzlich unerforscht sind. Es fehlen ferner insbesondere Genomvergleiche zwischen Stämmen unterschiedlicher geografischer Herkunft, verschiedener Wirtsspezies und divergenter Infektionsverläufe.

In der Zwischenzeit zeichnete sich allerdings auch ab, dass die für nahezu 90 Jahre nur durch die Spezies *S. moniliformis* repräsentierte Gattung *Streptobacillus* tatsächlich diverser ist. Kürzlich wurde eine zweite, ebenfalls potentiell humanpathogene *Streptobacillus*-Spezies beschrieben [Woo *et al.* 2014], und unterschiedliche Mikrobiomstudien [Kong *et al.* 2012, Hullar *et al.* 2015] lassen vermuten, dass deutlich vielfältigere Wechselbeziehungen zwischen Wirten und Erregern bestehen als bislang angenommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, unterschiedliche Stämme von *S. moniliformis*, welche weltweit seit dessen Beschreibung 1925 bei unterschiedlichen Wirtsspezies und aus unterschiedlichen Krankheitsprozessen gesammelt werden konnten, innerartlich zu charakterisieren. Dazu wurden neben molekularbiologischen Analysen auch Untersuchungen zur phänotypischen Variabilität von *S. moniliformis* sowie nahe verwandter Mikroorganismen durchgeführt, um insbesondere systematische Fragestellungen in Bezug auf die Taxonomie der Erreger beantworten zu können.

1. EINLEITUNG

Eine sich anschließende vergleichende Genomanalyse sämtlicher Stämme bildete die Grundlage, um erstmals zusammenhängende Fragen zum Kerngenom sowie zur intra- und interspezifischen Variabilität von Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae* beantworten zu können. In Bezug auf den bedeutsamsten Erreger der Gruppe, den RBF-Erreger *S. moniliformis*, ging man bislang auf Basis phänotypischer Studien sowie isoliert betrachteter Gene von einer nur geringen innerartlichen genetischen Variabilität aus. Tatsächlich konnten die Daten dieser Arbeit eine vergleichsweise hohe Heterogenität der untersuchten Vertreter aufzeigen, welche mittels einer hier etablierten Multilokus *Variable Number Tandem Repeat*-Analyse-Typisierungsmethode zukünftig auch diagnostisch genutzt werden kann. Anhand der Genomdaten und umfangreicher physiologischer Untersuchungen konnten innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* fünf eigenständige neue Bakterienspezies sowie zwei neue Gattungen beschrieben werden. Die Genomdaten ließen ferner einen ersten Einblick in ein Repertoire von putativen Virulenzfaktoren und Resistenzgenen zu, welche eine wesentliche Grundlage für zukünftige weitere Untersuchungen darstellen.

2. SCHRIFTTUM

2. SCHRIFTTUM

2.1 Nomenklatur der Erreger der Familie *Leptotrichiaceae*

Bei der Familie *Leptotrichiaceae* handelt es sich um eine erst 2011 geschaffene bakterielle Familie [Staley & Whitman 2011], welche sich nomenklatorisch an der Typgattung *Leptotrichia* orientiert und bei ihrer Etablierung weiterhin die Gattungen *Sebaldella*, *Sneathia* und *Streptobacillus* beinhaltete. Bis zu ihrer Etablierung waren die jeweils nur aus einer (Typ)-Spezies bestehenden (monotypischen) Gattungen *Sebaldella* (vormalige Familie *Bacteroidaceae*), *Sneathia* (neue Gattung als Abtrennung von *Leptotrichia* 2001) und *Streptobacillus* (verschiedene systematische Stellungen, s. Kap. 2.1.1) relativ eigenständig und wurden erst mit Errichtung der *Leptotrichiaceae* dem Stamm Fusobacteria (Ordnung Fusobacteriales) zugeordnet. Abgesehen von ihrer vergleichsweise hohen Homologie innerhalb des 16S rRNS-Gens (s. Abb. 1) sind die Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae* durch eine negative Anfärbbarkeit nach Gram (pleomorphe Stäbchen), eine mehr oder weniger große Aerotoleranz (obligate oder aerotolerante Anaerobier), ein langsames Wachstum und hohe Nährbodenansprüche in Form von Serum oder Vitaminen charakterisiert [Staley & Whitman 2011].

2.1.1 *Streptobacillus*

Streptobacillus stellt die älteste Gattung der heutigen Familie dar, welche mit der Beschreibung von *S. moniliformis* LEVADITI *et al.* 1925 begründet wurde. Von *S. moniliformis* existieren zahlreiche ältere Synonyme, so zum Beispiel *Streptothrix muris ratti* (Schottmüller, 1914) oder – nach dem Auftreten eines zweiten Syndroms (s. Kap. 2.3.1.1.1) benannt – ‚*Haverhillia multiformis*‘ [Parker & Hudson 1926]. Die systematische Zuordnung der Gattung *Streptobacillus* war lange Zeit vorläufig. In der 6. Edition von *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1948) wurde die Gattung in die Familie *Parvobacteriaceae* (Stamm Haemophileae) gestellt, in der 7. Edition des *Manuals* (1957) jedoch in die Familie *Bacteroidaceae* überführt, um dann in der 8. Edition (1974) zunächst als „Gattung mit unsicherer Zugehörigkeit“ ohne familiäre Einstufung zu verbleiben.

2. SCHRIFTTUM

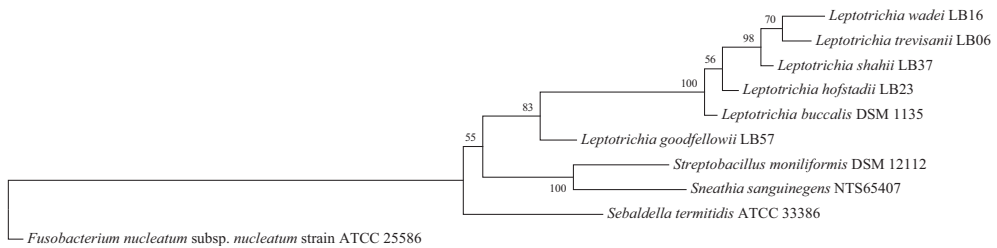


Abbildung 1: 16S rRNS-Gen-basierte phylogenetische Analyse anerkannter (valider) Spezies der Familie *Leptotrichiaceae* bei ihrer Etablierung 2011 und bis zum Zeitpunkt des Beginns der Untersuchungen dieser Arbeit im Jahr 2013. Maximum Likelihood (ML)-basierter Baum nach Tamura-Nei-Modell. Die Beschriftungen an den Baumknoten repräsentieren *Bootstrap*-Unterstützungen (100 Wiederholungen); Außengruppe: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586.

Die 9. Edition (1994) und die 1. Edition von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) listen *Streptobacillus* immer noch unter „andere Gattungen“ innerhalb der fakultativ anaeroben Gram-negativen Stäbchen [Savage 1984]. Die 2. Edition von *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) führt *Streptobacillus* zusammen mit *Leptotrichia* und *Sealdella* als Mitglieder der Familie *Fusobacteriaceae*, wenngleich entfernt von einer Kerngruppe liegend, auf. Seit der Neugründung der Familie *Leptotrichiaceae* in Band 4 der 2. Edition von *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2011) wird der Eigenständigkeit der Gruppe Rechnung getragen [Staley & Whitman 2011].

Der Gattungsname *Streptobacillus* bezieht sich dabei auf das mikroskopische Bild der Bakterien (griechisch: *streptos*, verdreht, gekrümmt; lateinisch: *bacillus*, ein kleines verdrehtes stäbchenförmiges Bakterium), welches gerade in älteren Kulturen zu ausgeprägter Pleomorphie neigt. Der Name *Streptobacillus* wurde zuerst 1898 für einen aeroben, aus Gartenerde isolierten Sporenbildner (*S. terrae*) gebraucht [Ucke 1898, Savage 1984], welcher aufgrund der gravierenden Unterschiede nicht synonym mit *S. moniliformis* LEVADITI *et al.* 1925 ist. Für fast 90 Jahre galt auch die

2. SCHRIFTTUM

Gattung *Streptobacillus* als monotypisch, bevor mit *S. hongkongensis* [Woo *et al.* 2014] eine weitere Art beschrieben wurde, welche in Hongkong von zwei Patienten mit septischer Arthritis und Tonsillitis isoliert worden war.

2.1.2 *Sneathia*

Aus der Gattung *Leptotrichia* wurde 2001 eine Art abgespalten, welche 1995 als *Leptotrichia sanguinegens* beschrieben worden war [Hanff *et al.* 1995]. Die zu Ehren des britischen Mikrobiologen PETER H. A. SNEATH als *Sneathia* (*Sn.*) benannte Gattung enthält mit *Sn. sanguinegens* ebenfalls derzeit nur eine valide Art [Collins *et al.* 2001]. Eine zweite Art wurde zwar mit „*Sn. amnii*“ (vormals '*Leptotrichia amnionii*' [Shukla *et al.* 2002]) beschrieben [Harwich *et al.* 2012], jedoch in Ermangelung eines Typstamms bis heute nicht formal anerkannt. Somit verbleibt auch die Gattung *Sneathia* vorerst monotypisch.

2.1.3 *Sebaldella*

Die Gattung *Sebaldella* (*Se.*) enthält lediglich die Typspezies *Se. termitidis*, welche zunächst als *Bacteroides termitidis* beschrieben wurde [Sebald 1962]. Aufgrund physiologischer Abweichungen wurde die Art zu Ehren der erstbeschreibenden französischen Mikrobiologin MADELEINE SEBALD umbenannt [Collins & Shah 1986].

2.1.4 *Leptotrichia*

Die Gattung *Leptotrichia* (*L.*) enthält heute sieben Arten, deren Typspezies *L. buccalis* ist. Die wörtliche Übersetzung (griechisch: *leptos*, fein, klein, *thrix*, *thricos*, Haar) spielt auf das „haarähnliche“ mikroskopische Erscheinungsbild der Bakterien an. Zu Ehren des italienischen Bakteriologen V. TREVISAN, dem Gründungsvater der Gattung im Jahr 1879, wurde 2002 *L. trevisanii* beschrieben. Eine Auftrennung in deutlich mehr Spezies erfolgte erst 2004 [Eribe *et al.* 2004], indem *L. goodfellowii*, *L. hofstadii*, *L. shahii* und *L. wadei* als neue Spezies beschrieben wurden. Mit *L. hongkongensis* kam die vorerst jüngste Speziesneubeschreibung hinzu [Woo *et al.* 2010].

2. SCHRIFTTUM

2.1.5 Subtypisierung bakterieller Spezies unter besonderer Berücksichtigung phylogenetischer Fragestellungen

Die Subtypisierung von Bakterien verfolgt grundsätzlich das Ziel, Erreger zu identifizieren, zu klassifizieren oder nachzuverfolgen. Für das Verständnis dieser Arbeit berücksichtigt die Begrifflichkeit „Stamm“ einerseits das systematische „Phylum“, andererseits aber insbesondere im systematisch-taxonomischen Sinn einen hinsichtlich seiner phänotypischen und/oder genotypischen Eigenschaften hinlänglich charakterisierten, in Reinkultur vorliegenden Mikroorganismus [Dijkshoorn *et al.* 2000]. Dieser kann – sofern er von einer Institution bezogen wurde – weiterhin durch Attribute wie „Typstamm“ oder „Referenzstamm“ konkretisiert sein. Im Gegensatz dazu stellt ein „Isolat“ die mögliche Vorstufe eines „Stammes“ dar, denn es handelt sich in der Regel um einen aus einer Probe, einer Läsion oder einem Organismus *isolierten*, gleichfalls in Reinkultur vorliegenden Erreger, welcher allerdings nicht oder noch nicht hinlänglich charakterisiert wurde. Die Übergänge hierzu können fließend sein, beispielsweise bei der Re-Isolierung eines Stammes zu einem späteren Zeitpunkt oder aus einer anderen Lokalisation desselben Organismus (vgl. a. Abb. 2). Zunächst standen für die Subtypisierung phänotypische Unterschiede im Vordergrund, welche sich meist, jedoch nicht zwangsläufig auch auf genomischer Ebene widerspiegeln.

Historisch sind die oft heute immer noch gebräuchlichen Nachweise physiologischer und biochemischer Merkmale wie Stoffwechselfparameter oder Resistenzeigenschaften sowie Merkmale der Morphologie (Kolonie- bzw. Zellform, -größe, -farbe, Begeißelung, Sporenbildung u. v. a.) und Physiologie (Beweglichkeit, Abhängigkeit von Sauerstoff u. v. a.), welche üblicherweise makro- und mikroskopisch, zuweilen auch elektronenmikroskopisch bzw. nach speziellen Anfärbungen visualisiert werden [Tindall *et al.* 2010]. Insbesondere für systematische Fragestellungen spielt auch die chemische Analyse des Zell-, -membran und -wandaufbaus sowie des Zellstoffwechsels (Chemotaxonomie) anhand von komplexen Fettsäuren, polaren Lipiden, respiratorischen Lipochinonen, Peptidoglykanen, Polyaminen, Lipopolysacchariden und Mykolsäuren eine besondere Rolle. Diese Methoden sind auch bis in die heutige Zeit im Gebrauch, obwohl sie sich methodisch kaum weiterentwickelt haben [Bronz & Olsen 1986,

2. SCHRIFTTUM

Busse *et al.* 1996]. Die Überprüfung solcher phänotypischer Merkmale ist insbesondere dann geboten, wenn sie historisch bei der Abgrenzung von Bakterienspezies zum Einsatz kamen und heute neue Spezies aus demselben Verwandtschaftsumfeld beschrieben werden sollen. Es ist hervorzuheben, dass die eingesetzten Methoden zum Vergleich unterschiedlicher Ergebnisse am besten standardisiert sein sollten und auf die Kulturbedingungen der zu untersuchenden Erreger hin optimal ausgerichtet sind.

Weitere historisch etablierte Tests wie beispielsweise die bei *Salmonella* oder *Streptococcus* etablierte Serotypisierung, die bei *Brucella* gängige Phagentypisierung oder die bei pathogenen *Vibrio* oder *Bacillus* angewandte Plasmidanalyse werden heutzutage oft nur noch in Spezial- und Referenzlaboratorien angewandt, und die von diesen Methoden ausgehende Aussagekraft lässt sich zuweilen heute gleichfalls von Nukleinsäuretechniken ableiten bzw. übertreffen. Unterhalb des Spezieslevels werden Mikroorganismen nicht selten in Subspezies und weiterhin in Biovare, Phagen-, Phäno-, Sero- oder Ökotypen untergliedert, wodurch in der Regel jedoch Stamm-spezifische Unterscheidungen in beispielsweise so genannte Pulso-, Ribo- oder Genotypen nicht berücksichtigt sind.

Es wäre jedoch falsch anzunehmen, dass phänotypische Tests heute aus der Mode gekommen sind, denn anhand ihrer Protein- bzw. breiter gefasster Biomolekülspektren lassen sich Erreger in besonders ökonomischer Weise, mit hohem Durchsatz und mit großer Güte, Robustheit und Aussagekraft subtypisieren. Diese spektroskopischen Methoden haben vor einigen Jahrzehnten Einzug in die moderne Mikrobiologie gehalten und sich beeindruckend weiterentwickelt: mittels hochauflösender *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight* (MALDI-TOF)-, Raman- oder Elektrosprüh-Ionisations-Massenspektrometrie oder auch mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) lassen sich heute Identifikationen auf Spezies- oder sogar Stammebene erzielen sowie isolierte Proteine und sogar bakterielle Metabolite analysieren [Pineda *et al.* 2003, Mackey *et al.* 2014, Karlsson *et al.* 2015, Kumar *et al.* 2016b].

An die Ära der beschriebenen klassischen Tests schlossen sich solche Verfahren an, welche auf einer Fragmentierung von Erregern oder deren Teilen beruhen und aufgrund ihres Einsatzgebietes bei forensischen Fragestellungen auf Basis von

2. SCHRIFTTUM

Nukleinsäureunterschieden als genetische Fingerabdruck (*fingerprint*)-Techniken bezeichnet werden. Hierzu zählen die Analyse und Darstellung von

- Restriktionsfragment-Polymorphismen (Amplifikationsfragmentlängen- [AFLP] und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen [RFLP], Pulsfeld-Gelelektrophorese [PFGE] und Ribotypisierung),
- Insertionssequenz-Elementen (IS) oder anderen Genabschnitten (Typisierung differenter Regionen, lokaler Kollinearitätsblöcke, Insertionen und Deletionen [Indels]),
- Amplifikations-Polymorphismen (*random amplification of polymorphic DNA* [RAPD]- und *repetitive extragenic palindromic* [REP]-PCR) sowie
- *Variable number tandem repeat* (VNTR)-Analysen. Bei VNTR handelt es sich normalerweise um bis zu 300 Nukleotide (nt) lange, nicht kodierende, repetitive DNS-Sequenzen. Beim Vorliegen sehr kurzer (bis zu 15 nt) oder extrem kurzer (bis zu 6 nt) Wiederholungseinheiten werden sie auch als ‚Minisatelliten‘ bzw. ‚Mikrosatelliten‘ (*short sequence repeats* [SSR]) bezeichnet.

Werden wie bei der Mykobakterien-spezifischen ‚MIRU-VNTR‘ mehrere VNTR-Loki kombiniert betrachtet, dann bezeichnet man dies als MLVA (*multiple locus VNTR analysis*) [Pourcel & Vergnaud 2011]. Meist geschieht dies mit dem Ziel einer guten Unterscheidungsfähigkeit (diskriminatorisches Potential) zwischen Erregerstämmen einer Spezies. Klassischer Weise erfolgt die Sichtbarmachung der Resultate in Form einer mehr oder weniger auflösenden Gelelektrophorese, welche in hochauflösenden Kapillarelektrophoresegeräten eine Trennschärfe von wenigen bp erreicht oder bei Mikrosatelliten mittels Sequenzierung oder Schmelzkurvenanalyse (*high resolution melting curve*). Ein hierzu besonders bekannt gewordenes Beispiel dieser Methodik, bei welcher das Amplifikat gleichfalls sequenziert werden muss, ist die so genannte Protein A-Typisierung bei Staphylokokken (Spa; [Shopsin *et al.* 1999]). Der zwischen 0 und 1 liegende diskriminatorische Index (DI) bedarf jedoch einer differenzierteren Betrachtung und wird unmittelbar von drei Faktoren beeinflusst: (i) dem zu typisierenden Erreger; (ii) der Typisierungsmethode und (iii) der wissenschaftlichen Fragestellung (s. Abb. 3). Besteht die wissenschaftliche Fragestellung beispielsweise in der Epidemiologie oder Forensik darin, einen Infektionsstamm aus verschiedenen Patienten zu detektieren, dann sollte der DI so hoch wie möglich sein. Für andere

2. SCHRIFTTUM

Fragestellungen ist es unter phylogenetischen oder komparativen Aspekten vielleicht gerade nicht sinnvoll, das am höchsten auflösende Verfahren zu nutzen, weil man andernfalls Gemeinsamkeiten übersehen würde. Es kann beispielsweise zwecks einer weltweiten Klassifikation bakterieller Spezies (z. B. *Escherichia* [*E.*] *coli*) zu Sequenztypen oder -komplexen zu Gruppenbildungen kommen, welche zwar bestimmte Gemeinsamkeiten in Bezug auf die zugrundeliegende Typisierung, nicht notwendigerweise jedoch auch einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Andererseits wird man bei genetisch homogenen („genetisch monomorphen“) Erregern selbst mit an sich hochauflösenden Typisierungsmethoden keine ausreichende Trennschärfe erzielen – so lassen sich beispielsweise *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis*-Stämme nicht mittels MLST unterscheiden. Schließlich kann das Auflösungsvermögen der Typisierung negativ beeinflusst werden, wenn sich – wie bei *M. avium* ssp. *paratuberculosis* – bestimmte bakterielle Markersequenzen wie VNTR-Loki mehrfach unabhängig voneinander entwickelt haben und somit nur scheinbar identisch sind (so genannte Konvergenz oder Homoplasie).

Noch vor der Einführung von Sequenzierungstechniken fanden wiederum vornehmlich in der systematischen Bakteriologie Methoden Anwendung, welche die Ähnlichkeit von Mikroorganismen anhand ihrer Gesamt-DNS-Homologie (DNS-DNS-Hybridisierung [DDH]) sowie dem Gesamtanteil der Basen Guanin und Cytosin (G/C-Gehalt) bewerten. Diese ebenfalls bis in die heutige Zeit angewandten Methoden werden inzwischen allerdings oft biomathematisch („*in silico*“) erzeugt, sofern die erforderlichen Genominformationen vorliegen (*average nucleotide identity* [ANI] oder *in-silico* DNS-DNS-Hybridisierung [GGDC]). Zwei Taxa gelten als speziesverschieden, wenn sie bei einer konventionellen DDH Ähnlichkeiten von <70% oder <95-96% Ähnlichkeit mittels ANI aufweisen [Goris *et al.* 2007]. Aus den Sequenzinformationen lassen sich gleichfalls die abgeleiteten synonymen und nicht synonymen (veränderte Gensequenz führt gleichfalls zu veränderter Aminosäure [AS]) Proteininformationen erfassen und für die Ähnlichkeit zweier Taxa beispielsweise zur Unterscheidung unterschiedlicher Spezies oder sogar Genera heranziehen (*percentage of conserved proteins* [POCP]) [Goris *et al.* 2007, Meier-Kolthoff *et al.* 2013, Qin *et al.* 2014].

Maßgeblich durch die erhebliche Preisreduktion bei Sequenziertechniken haben sich in jüngster Zeit immer stärker Sequenz-basierte Techniken etabliert. Zunächst fanden Untersuchungen auf Basis von Sequenzfragmenten einzelner Gene statt. Besonders

2. SCHRIFTTUM

bekannt und regelrecht als „Rückgrat prokaryotischer Klassifikation“ [Kämpfer 2012] ist das Gen der RNS der bakteriellen ribosomalen 16S-Untereinheit (16S rRNS) etabliert. Bei 16S rRNS-Sequenzunterschieden von weniger als 97% gelten zwei Taxa gemeinhin als unterschiedliche Spezies [Tindall *et al.* 2010]. Inzwischen wurden auch andere universelle phylogenetische Markergene wie *rpoB*, *gyrB* u. v. a. beispielsweise bei Coryne- und Mykobakterien beschrieben, welche vor allem bei phylogenetischen Analysen wegen ihres zwischen unterschiedlichen Taxa abnehmenden Verwandtschaftsgrades geeignet sind [Kasai *et al.* 2000, Khamis *et al.* 2005, Das *et al.* 2014]. Nach der Amplifikation und Sequenzierung sollte zum Zwecke der Identifizierung ein Abgleich mit hochqualitativen gepflegten oder „kurierten“ Sequenzdatenbanken (bspw. Ribosomal Database Project [RDP], ARB-Silva, GreenGenes, EzTaxon) erfolgen [DeSantis *et al.* 2006, Kim *et al.* 2012, Quast *et al.* 2013, Cole *et al.* 2014], bei welchen je nach Datenbank entweder ausschließlich 16S rRNS Gensequenzen von Typstämmen oder aber auch solche von anderen kultivierbaren und (noch) nicht kultivierbaren Bakterienspezies enthalten sind. Im Gegensatz dazu enthält die ebenfalls häufig verwendete NCBI-Datenbank (BLAST N; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) oftmals fehlerhaft zugeordnete oder systematisch nicht korrekt benannte Sequenzen, aus welchen sich Folgefehler ergeben können (S. GLAESER, persönliche Mitteilung). Nicht immer widerspiegeln solche isoliert betrachteten Gene allerdings die „wahre“ Situation auf Speziesebene, was man durch die Auswertung unterschiedlicher, miteinander verglichener (alignierter), teils auch in Reihe kombinierter (konkatenierter) Gene auszugleichen sucht [Glaeser & Kämpfer 2015].

Der Vergleich von Gensequenz-Polymorphismen mehrerer funktioneller (Proteinkodierender) und somit relativ mutationsstabiler so genannter ‚housekeeping‘ Gene (‚Multilokus Sequenztypisierung‘ [MLST]) erhöht das Ergebnis der Typisierung und wird vornehmlich bei epidemiologischen und populationsgenetischen Fragestellungen zur Typisierung von Pathogenen wie erstmals bei *Neisseria meningitidis* eingesetzt [Maiden *et al.* 1998, Glaeser & Kämpfer 2015]. Die unterschiedlichen Alleltypen der einzelnen Genloki werden einzeln betrachtet und nummerisch benannt; die daraus abgeleitete Ziffernfolge definiert den Sequenztyp (ST). In nur einzelnen Alleltypen abweichende ST definieren zusammen so genannte klonale Komplexe (*clonal complexes* [CC]). Die gut zwischen Laboratorien portable Methode hat zur Etablierung von MLST-Datenbanken (beispielsweise

2. SCHRIFTTUM

<http://www.mlst.net/> oder <http://www.pubmlst.org>) geführt, in welchen Daten online verwaltet, erweiterbar und auswertbar sind. Bei der MLST findet jedoch klassischer Weise keine Betrachtung statt, inwieweit Sequenzunterschiede auch zu abgeleiteten Aminosäureunterschieden (nicht synonyme Basenaustausche) führen. Für eine hohe genetische Auflösung innerhalb einer (Pathogen)-Population bieten sich Pathogenitäts- oder Virulenz-assoziierte Gene für eine MLST besonders an, weil sie einem hohen Selektionsdruck unterliegen und somit oft eine hohe genetische Diversität zeigen [Glaeser & Kämpfer 2015]. Obwohl manchmal synonym gebraucht, verwendet eine ‚Multilokus Sequenzanalyse‘ (MLSA) dasselbe Prinzip wie die MLST, dient aber durch eine dezidierte Analyse der Nukleotidsequenzunterschiede und der gleichfalls daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzunterschiede vornehmlich phylogenetischen Fragestellungen [Glaeser & Kämpfer 2015]. Dabei greift die MLSA wie die MLST auf obligate, aber lediglich einmal im Genom vorhandene (*single copy*) Gene zurück, verzichtet jedoch im Gegensatz zur MLST bewusst auf Gene des akzessorischen Genoms, also solcher Gene mit Selektionsvorteil (Pathogenitäts- oder Virulenz-assoziierte Gene), um die gesamte Population innerhalb derselben Spezies abbilden zu können [Glaeser & Kämpfer 2015]. Die MLSA übertrifft die gerade bei systematischen Fragestellungen oft defizitären Aussagen einzelner Markergene in Bezug auf eine korrekte Spezieszuordnung (beispielsweise bei *Brucella* spp.) und kann bei kluger Auswahl der beteiligten Loci vom Ergebnis an eine Analyse kompletter Genome heranreichen (s. Abb. 2). Die MLSA gilt weiterhin als eine Methodik, welche die klassische DDH bei systematischen Fragestellungen ablösen kann [Gevers *et al.* 2005, Schleifer 2009, Glaeser & Kämpfer 2015].

Aufgrund palindromischer, hoch individueller Geninhalte eignen sich manche Loci mit sich wiederholenden Sequenzfolgen (*repeats*) ganz besonders gut, um Stammspezifische Unterschiede aufzuzeigen. Ein solches System ist der bei fast sämtlichen untersuchten Archaeen (s. Kap. 2.1.6) und ungefähr der Hälfte der untersuchten Bakterienspezies vorkommende *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-Lokus mit seinen CRISPR-assoziierten Genen (Cas [CRISPR associated genes]), auf dessen Prinzip beispielsweise die bei *M. tuberculosis* etablierte Methode des *spacer oligonucleotide typing* (*spoligotyping*) beruht [Pourcel & Vergnaud 2011, Abudayyeh *et al.* 2016]. Der CRISPR-Lokus, welcher Relikt-Sequenzen invasiver und im Genom integrierter fremder Nukleinsäuren aus vorangegangenen Phagentransduktionen und Plasmidkonjugationen aufweist, wird

2. SCHRIFTTUM

als eine Art „adaptives“ Bakterienimmunsystem interpretiert [Land *et al.* 2015, Makarova *et al.* 2015]. Auch wenn es molekulare Unterschiede besonders im Hinblick auf die involvierten Proteine gibt, so läuft eine CRISPR-abhängige Kaskade grundsätzlich nach drei Schritten ab: i) in einer Adaptationsphase werden aufgenommene Fremdnukleinsäuresegmente (so genannte *spacer*) in die CRISPR-Region zwischen ein Paar von Wiederholungssequenzen inseriert; ii) Transkription der CRISPR-Region und Prozessierung reifer CRISPR-RNS-Moleküle (crRNS); iii) Interferenz, das heißt Cas (CRISPR-assoziierte)-Enzyme werden durch die crRNS an die eingedrungenen Fremdnukleinsäuren geleitet, woraufhin sie die entsprechend bekannten Sequenzen angreifen und zerstören [Garcia-Gutierrez *et al.* 2015, Marraffini 2015]. Die Aufklärung dieses Mechanismus hat darüber hinaus neue Einsatzgebiete bei der Genexpression und Getherapie – nicht nur bei Prokaryoten – erschlossen [Jiang & Marraffini 2015].

Die Fortentwicklung und letztlich Vollendung der Sequenzanalyse stellt die Vollgenomsequenzierung (*whole genome sequencing* [WGS]) dar. Bakteriengenome besitzen üblicherweise eine Genomgröße von 1-6 Mega-Basenpaare (Mbp; Vergleichs-genomgrößen: *Staphylococcus aureus*: 2,8-2,9 Mbp; *E. coli*: 4,9-5,5 Mbp; International Nucleotide Sequence Database Collaboration; <http://www.insdc.org/>). Selbst Genome mit ausnahmsweise bis zu über 13-14 Mbp (bei *Ktedonobacter racemifer* und *Sorangium cellulosum*) sind erheblich kleiner als Eukaryontengenome und durch einen relativ geringeren Anteil nicht kodierender Sequenzen (5-20%) charakterisiert [Shabalina *et al.* 2001, Land *et al.* 2015]. Je nach Vollendungsgrad der Analyse unterscheidet man „offene Genome“, bei welchen lediglich sämtliche Gene eines Organismus sequenziert wurden, und „geschlossene Genome“, welche sogar die wesentlich schwieriger zu generierenden Abschnitte nicht-kodierender DNS enthalten. Den Sequenzdaten lassen sich durch Datenbankvergleiche und experimentelle Befunde putative funktionelle Gene zuordnen (Annotation). So lassen sich die Genome in Bezug auf die prinzipielle Ausstattung mit bestimmten Genen sowie auf bestimmte Kennzahlen (Genomgröße, Codierungsdichte, Anzahl der Gene, G/C-Gehalt u. v. a.) hin analysieren. Für die bei Land *et al.* analysierten 2671 geschlossenen bakteriellen Genome ergaben sich große Variationsbreiten in Bezug auf die durchschnittliche Codierungsdichte (40-97%, Mittelwert 88%) und den G/C-Gehalt (15-85%). Das „typische“ Bakteriengenom ist dieser Studie zufolge 5 Mbp groß und kodiert für etwa 5000 Proteine [Land *et al.* 2014, Land *et al.* 2015]. Es

2. SCHRIFTTUM

lassen sich aber auch Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Taxa einer Gruppe erarbeiten. Dabei verkörpert ein Pangenom (*pan genome*) alle Gene einer Klade (Spezies im engeren Sinne; s. Kap 2.1.7), ein Kerngenom (*core genome*) stellt die Schnittmenge sämtlicher gemeinsamer Gene einer Spezies dar, und ein ‚maximal gemeinsames Genom‘ (*maximum common genome* [MCG]) besteht aus solchen Genen, welche in allen Genomen einer gemeinsamen Gruppe zu finden sind [von Mentzer *et al.* 2014]. Es finden sich heute Genome von weit über 50 unterschiedlichen Stämmen (Phyla) von Bakterien und elf von Archaeen – Ergebnisse, welche eine fundierte Klassifikation im Hinblick auf eine gemeinsame Phylogenie innerhalb der Prokaryoten unterstützen [Land *et al.* 2015]. Andererseits zeigt der Vergleich von mehr als 2000 *E. coli*-Genomen die ungeheure Zahl von 3100 Genfamilien im Kerngenom und insgesamt etwa 89000 unterschiedlichen Genfamilien innerhalb der Spezies (Pangenom) auf, welche nicht nur ein sehr gutes innerartliches Gesamtbild abgeben, sondern auch für bioforensische, epidemiologische und Fragestellungen von genomisch-metabolischen Wirkmechanismen genutzt werden können [Land *et al.* 2015]. Es beweist ferner, dass manche Spezies wie *E. coli*, *Haemophilus influenzae* und *Burkholderia pseudomallei* zu einer Gruppe gehören, deren innerartliche Genomunterschiede gewaltig ausfallen können, wohingegen manche so genannte ‚genetisch monomorphe‘ Erreger wie *Bacillus (B.) anthracis* oder *M. tuberculosis* kaum große Unterschiede zeigen [Land *et al.* 2015]. Letztere sind vor allem lediglich durch einzelne Basenaustausche (*single nucleotide polymorphisms* [SNPs]) charakterisiert, welche für die Klärung verwandtschaftlicher Aussagen sowohl auf Teil- als auch auf Gesamtgenomebene herangezogen werden können, dann spricht man von kanonischen („spezifischen“, „definierenden“) SNPs ([Keim *et al.* 2004]; s. Abb. 2). In letzter Zeit ergeben sich abseits des WGS für das Auffinden solcher SNPs auch alternative Techniken wie die beispielsweise bei *Yersinia (Y.) pestis* eingesetzten denaturierenden *high pressure liquid chromatography* (HPLC), Luminex- und Schmelzkurven-Assays sowie massenspektrometrische Verfahren [Achtman *et al.* 2004, Ciammaruconi *et al.* 2009, Cui *et al.* 2014].

Heutzutage liegen die Kosten für die Datenanalyse von Genomdaten über denjenigen der Sequenzierungsarbeiten [Land *et al.* 2015]. Zunächst müssen die fragmentierten Sequenzen (*reads*) zu größeren Stücken (*contigs*) assembliert werden. Für die meisten Zwecke ist eine nachfolgende Konstruktion des

2. SCHRIFTTUM

Gesamtgenoms (*assembly*) erforderlich, welchem im nächsten Schritt Protein- und Nukleinsäuren-kodierende Gene zugeordnet werden (*annotation*). Zur besseren Übersichtlichkeit lassen sich die kodierenden Proteine in funktionelle und putative Kategorien (*clusters of orthologous groups of proteins* [COGs]) einteilen [Tatusov *et al.* 2000, Galperin *et al.* 2015].

Um die Vielfalt von unterschiedlichen Bakteriengruppen in einer Probe abbilden zu können, bedient man sich ebenfalls der auf hochparallelen Durchsatz ausgelegten so genannten *next generation* oder inzwischen sogar *third generation* WGS. Hierbei werden ein oder mehrere Teilfragmente eines universellen bakteriellen Markergens (meist 16S rRNS) amplifiziert und sequenziert und nachfolgend – abhängig von der zulässigen Aussagekraft – die Anteile der enthaltenen bakteriellen Mikroorganismen (Mikrobiota) auf Familien-, Gattungs- oder Spezieslevel bestimmt (Mikrobiom).

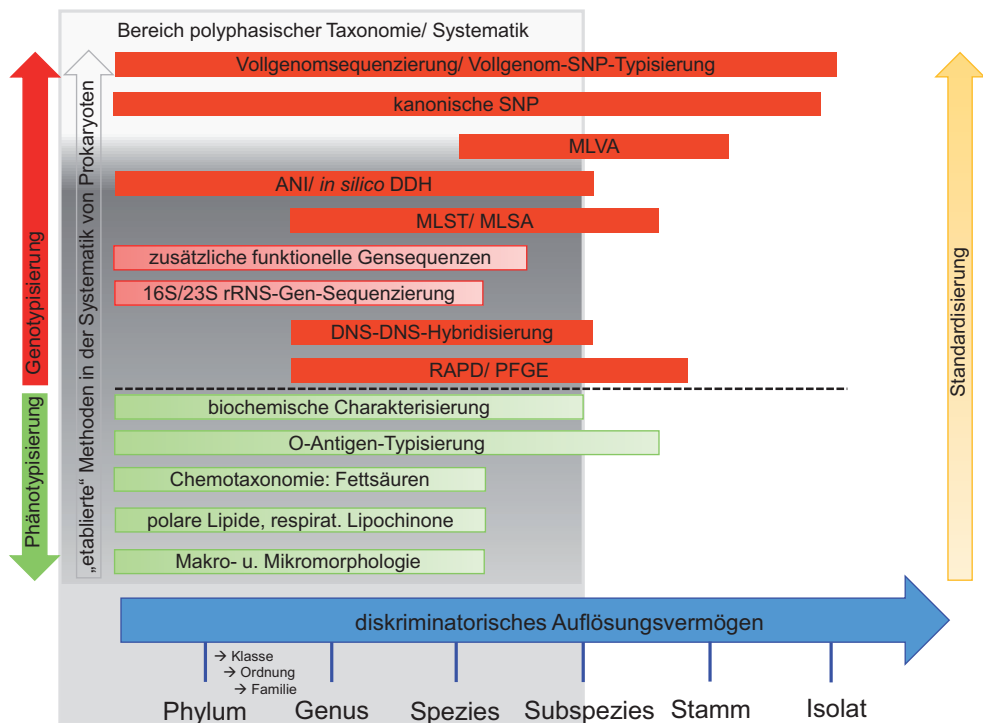


Abbildung 2: Schema zum diskriminatorischen Auflösungsvermögen etablierter phänotypischer und genotypischer Typisierungsmethoden für die systematische Klassifizierung von Prokaryoten (s. a. Kap. 2.1.5).

2. SCHRIFTTUM

Da es sich um ein Kultur-unabhängiges Verfahren handelt und auch nur Fragmente nachgewiesen werden, bezeichnet man derartige Nachweise üblicherweise als sogenannte Phylotypen (im Gegensatz zum Phänotyp sind das Organismen mit unterscheidbarer DNS-Sequenz) oder auch als operational taxonomic units (OTU).

Ein Mikrobiom ist ein Teilgebiet der Metagenomik (Metagenomanalyse), deren Zielrichtung sich aus der Kombination der Begrifflichkeiten Metaanalyse (statistisch-biomathematische Aufarbeitung und quantitativer Vergleich) und Genomik (Analyse sämtlicher Erbinformationen) ergibt. Die Metagenomik erfasst die Gesamtheit des Genoms eines definierten Biotops oder einer Probe, beispielsweise das Metagenom des Menschen, der Maulhöhle von Hunden, eines Permafrostbodens, einer Salzwasserprobe oder dem Inhalt einer Biogasanlage [Dewhirst *et al.* 2012, Mende *et al.* 2012, Land *et al.* 2015]. Durch die Techniken der Metagenomik lassen sich heutzutage gleichfalls die als *multiple 'omics'* bezeichnete Gesamtheit sämtlicher, in einer Probe enthaltener Resistenzgene (Resistom), Transkriptionen (Transkriptom), Proteine (Proteom) oder Stoffwechselprodukte (Metabolom) erfassen und im Hinblick auf ein ganzheitliches Verständnis von Erkrankungen (bspw. Substrate und Metabolite bakteriellen Wachstums und von Wirtszellen, Potential von Virulenzfaktoren und Resistenzgenen im Hinblick auf horizontalen Gentransfer [HGT; s. Kap. 2.1.6] etc.) interpretieren [Kumar *et al.* 2016a, Quinn *et al.* 2016, Sartor & Wu 2016, Zhang *et al.* 2016, Boolchandani *et al.* 2017].

Allgemein und zusammenfassend betrachtet spielen bei der Auswahl des besten Subtypisierungsansatzes methodische Aspekte wie diskriminatorisches Potential, Schwierigkeitsgrad, Sensitivität, Spezifität, Standardisierbarkeit, Markerstabilität, Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Laboren und Kosten eine wesentliche Rolle ([Vogler *et al.* 2016]; s. Abb. 3). Auf die Durchführung sowie die Vor- und Nachteile der dargestellten Techniken kann hier im Detail nicht eingegangen werden. Es ist jedoch prinzipiell anzumerken, dass die Ergebnisse der Subtypisierung neben Kriterien für die Auswahl der geeigneten Methodik maßgeblich von den Eigenschaften des zu untersuchenden Mikroorganismus und der abzuleitenden wissenschaftlichen Fragestellung geprägt sind. Nicht selten müssen Methoden hierarchisch kombiniert werden, um das beste Ergebnis zu erzielen (bspw. eine hierarchische SNP-Untersuchung wie bei der *progressive hierarchical resolving assays using nucleic acids* (PHRANA) bei *B. anthracis* [Keim *et al.* 2004]). Dies gilt insbesondere für einen holistischen Ansatz in der bakteriellen Systematik, bei dem im

2. SCHRIFTTUM

Sinne einer ‚polyphasischen Taxonomie‘ unterschiedliche genotypische und gerade auch phänotypische Methoden zur bestmöglichen Abgrenzung von Taxa herangezogen werden sollten, um den Vorgaben des ‚Bacterial Code of Nomenclature‘ zu entsprechen [Tindall *et al.* 2010]. Erreger-spezifische Faktoren sind beispielsweise Variationsgrad, Mutationsrate, Evolutionsrate, Tendenz zur Homoplasie (Konvergenz), Alter und Klonalität (Rekombinationsrate) der zu untersuchenden Population. Schließlich sind populationsgenetische, phylogeographische, molekularepidemiologische, forensische und systematische Fragestellungen Ausgangspunkt der Betrachtungen ([Vogler *et al.* 2016]; s. Abb. 3).

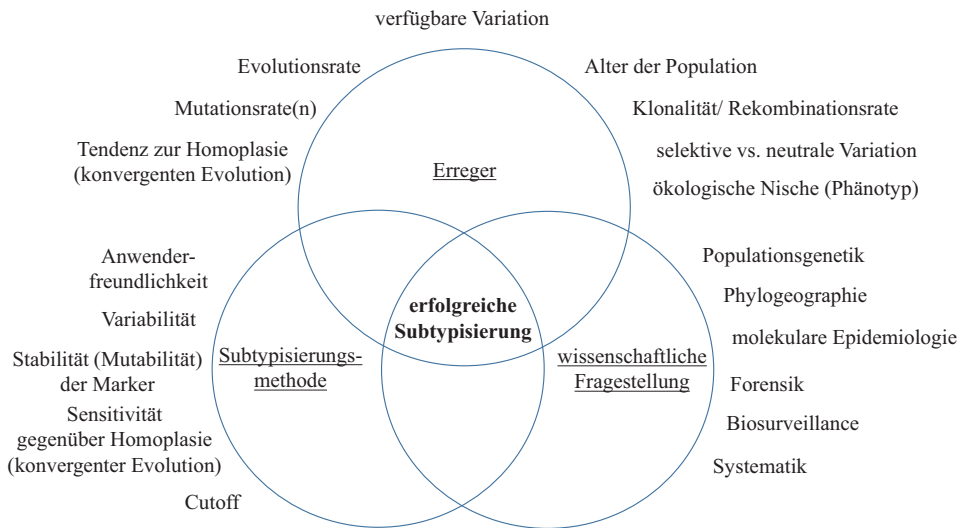


Abbildung 3: Schema zur Auswahl der geeigneten Subtypisierungsmethode.

Der Erfolg des Subtypisierens hängt von den drei Hauptkomponenten ‚zu typisierender Erreger‘, ‚angewandte Subtypisierungsmethode‘ und ‚zugrundeliegender wissenschaftlicher Fragestellung‘ ab. Die Hauptkomponenten werden wiederum von den (randständigen) Faktoren beeinflusst (modifiziert nach Vogler *et al.* 2016).

2. SCHRIFTTUM

2.1.6 Einführung in systematische Fragestellungen und Begrifflichkeiten

Die Systematik als mikrobiologische Disziplin befasst sich klassischer Weise mit der Etablierung eines Systems, welches so nah wie möglich die „Ordnung der Natur“ widerspiegelt und dem ultimativen Ansatz nach dem evolutiven Ursprung des (mikrobiellen) „Baums des Lebens“ folgt [Yarza *et al.* 2008, Kämpfer 2012]. Obwohl zuweilen synonym gebraucht, verkörpert die Taxonomie definitionsgemäß ein Teilgebiet der Systematik, welche die ordentliche Einteilung definierter Einheiten (beispielsweise Familien, Gattungen, Spezies) zum Ziel hat. Dies geschieht in einem engen Zusammenspiel einerseits mit der Nomenklatur, also der Benennung dieser Einheiten nach bestimmten „Regeln“ des Internationalen Codes der Nomenklatur von Bakterien [Lapage *et al.* 1992]. Andererseits wirkt hier ein drittes Teilgebiet, die Klassifikation ein, welche diese Einheiten zuvor identifiziert und definiert hat [Kämpfer 2012]. Zur Klassifikation werden phylogenetisch geeignete Marker verwendet, deren Gensequenz sich mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad verschiedener Spezies immer stärker unterscheidet, sodass nach neuerer Auffassung auch die Rekonstruktion der Stammesgeschichte der Organismen (Phylogenie) sowie die Erforschung der Vielfalt an Organismen (Evolutionbiologie) mit zur modernen Systematik gerechnet werden [Stuessy 1990]. Vor der Ära der Verfügbarkeit molekularer Methoden fußte diese Ordnung lediglich auf morphologischen Kriterien, an welchen sich alleine keine stammesgeschichtliche Entwicklung festmachen lässt [McInerney *et al.* 2008]. Seit der Einführung molekularer Marker (namentlich der Gensequenzen für die RNS der kleinen ribosomalen Untereinheiten 16S und 16-23S) in den 1980er und 1990er Jahren ist die Grundlage für ein besseres Verständnis des genetischen Potentials der Prokaryoten (s. u.) gelegt worden, welches durch immer mehr Sequenzdaten auch aus anderen Genen oder gesamten Genomen stetig an Tiefe gewonnen hat [Kämpfer 2012]. Jedoch wird bei dieser insgesamt beeindruckenden Entwicklung auch zu Skepsis angeraten: Einerseits sollte die oft noch gar nicht im Detail verstandene Gen(om)analyse nicht die einzige Basis für taxonomische Betrachtungen sein, sondern das vorhandene Genrepertoire führt in enger Abhängigkeit der Umwelteinflüsse zu einem jeweiligen Phänotyp. Phänotypen unterliegen einer natürlichen Selektion im Laufe der Evolution, sodass weiterhin ein holistischer Ansatz gebraucht wird, bei dem nach dem Konzept einer „polyphasischen Taxonomie“ neben molekularen auch ökologische Daten genutzt werden sollten [Kämpfer 2012]. Andererseits und gerade im Hinblick auf das zuvor

2. SCHRIFTTUM

Gesagte zeigen die umfangreicheren Analysen mehrerer unterschiedlicher Gene oder des gesamten Genoms einer Spezies zuweilen auch Widersprüche, und Stämme derselben Spezies können im Hinblick auf ihre Genome erheblich differieren. Diese innerartliche Heterogenität lässt sich im Laufe der Evolution mit der Aufnahme und Abgabe von genetischen Informationen auch aus anderen Spezies erklären und wird als horizontaler oder lateraler Gentransfer (HGT; beispielsweise durch Plasmide) bezeichnet [McInerney *et al.* 2008]. Das längst noch nicht bekannte Ausmaß dieses HGT wirft zukünftig die Frage auf, inwieweit das der Systematik zugrundeliegende Genrepertoire einer Spezies nicht in evolutiv junger Zeitrechnung auch von anderen Spezies akquiriert worden sein könnte [McInerney *et al.* 2008]. Bildlich gesprochen bedeutete dies ein Umdenken vom „Baum des Lebens“ hin zu einem phylogenetischen „Wald“ oder „Netzwerk des Lebens“ [McInerney & Pisani 2007, Koonin *et al.* 2011].

Die vorliegende Arbeit berücksichtigt jedoch weiterhin das heute allgemein anerkannte Konzept der drei Domänen, bestehend aus den „Prokaryoten“ (einzellige Organismen ohne Membran-begrenzten Nukleus) mit den beiden Domänen „Eubakterien“ (Bakterien im eigentlichen Sinne; Prokaryoten mit Ester-vernetzten Membranlipiden und Murein in der Zellwand) und „Archaeen“ (Archaeobakterien; Prokaryoten mit Ether-vernetzten Membranlipiden und ohne Murein in der Zellwand) sowie den „Eukaryoten“ (sämtliche ein- und mehrzellige Organismen mit echter Nukleusmembran), in welche alle Lebewesen eingeteilt werden können [McInerney *et al.* 2008]. Für die Speziesbeschreibung von Bakterien gelten bestimmte Regeln, damit sie als neue („valide“) Spezies akzeptiert und in den „Approved Lists of Bacterial Names“ des International Journal of Systematic Bacteriology, der „List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature“ und letztlich in „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ veröffentlicht werden [Euzéby 1997, Tindall *et al.* 2006, Tindall *et al.* 2010]. Dazu gehören formale Vorgaben für die methodische Klassifikation des neuen Vertreters (Taxon), also die eindeutige Charakterisierung der Spezies als „neu“ im Vergleich zu sämtlichen verwandten Taxa (innerhalb derselben und nahe verwandter Gattungen [Genera]; s. Kap. 2.1.5). Weiterhin gelten die Grundsätze der Nomenklatur (Regeln der Benennung der Spezies nach korrekter lateinischer Grammatik und passend zur zugehörigen Gattung, Hintergründe für die gewählte nomenklatorische Begrifflichkeit [Etymologie]) und Taxonomie (Kategorisierung in das bestehende System) sowie die öffentliche Verfügbarkeit der

2. SCHRIFTTUM

beschriebenen neuen Spezies anhand ihres Belegstamms (Typstamms) sowie gegebenenfalls weiterer Referenzstämme (Paratypstämme) derselben Spezies in mindestens zwei kurierten und zugänglichen Stammsammlungen unterschiedlicher Länder [Tindall *et al.* 2006, Tindall & Garrity 2008, Tindall *et al.* 2010]. Befindet sich in einer Gattung nur eine Spezies (so wie beispielsweise lange Zeit in der Gattung *Streptobacillus*), so spricht man von einer monotypischen Gattung, welche lediglich anhand der (einzigen) Typspezies (in diesem Fall *S. moniliformis*) repräsentiert wird. Die Typspezies einer Gattung ist gleichfalls diejenige Spezies, welche als erste Spezies der Gattung beschrieben wurde (beispielsweise *F. nucleatum* für die Gattung *Fusobacterium*; vgl. Abb. 1).

2.1.7 Erstellen von Verwandtschaftsanalysen

Für die Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen oder innerhalb von Spezies, Gattungen oder hierarchisch-höheren taxonomischen Einheiten müssen im Hinblick auf ihre evolutive Historie geeignete Gene gefunden werden. Diese müssen stabil vorhanden und dürfen nicht mutationsanfällig und nicht mehrfach unabhängig entstanden (konvergent; s. o.) sein und so die Aussage hinsichtlich eines gemeinsamen Vorfahren zulassen. Sie dürfen ferner nicht durch Rekombination (HGT, s. Kap. 2.1.6) erworben worden sein [Ruths & Nakhleh 2005, De Bruyn *et al.* 2014]. Der analoge Vergleich homologer Sequenzen – vielleicht sogar unter Einbeziehung fossiler Nachweise – kann ein Bild von der stammesgeschichtlichen Entwicklung (Phylogenie) eines Organismus bieten. Dieses wird umso genauer sein, wenn die Phylogenie nicht nur auf einem Gen fußt, sondern mehrere Gene oder sogar die orthologen Gene einer verwandtschaftlichen Gruppe betrachtet werden. Letztere repräsentieren eine gemeinsame Schnittmenge sämtlicher Gene, welche keine Insertionen oder Deletionen aufweisen und auf diese Weise besonders gut für die Aussage zu den Verwandtschaftsverhältnissen geeignet sind [Fang *et al.* 2010]. So lassen beispielsweise Untersuchungen der Metagenome von Knochen mittelalterlicher Pestopfer heute eine Entwicklung erkennen, anhand derer Hypothesen zur Ausbreitung von *Y. pestis* während dreier gesicherter Pandemien aufgestellt werden können [Seifert *et al.* 2016].

Nachdem eine Auswahl des oder der im Hinblick auf die stammesgeschichtlich (phylogenetisch) relevanten Gene erfolgt ist, müssen diese homologen Sequenzen

2. SCHRIFTTUM

eines jeden zu prüfenden Organismus beispielsweise durch eigene Sequenzierungsarbeiten oder aus Datenbanken gesammelt und miteinander verglichen werden. Dabei ist eine große Sorgfalt bei der Auswahl der Sequenzen (Länge, Sequenzierqualität, Vollständigkeit des Datensatzes für die Fragestellung u. a.) zu berücksichtigen, um Fehldeutungen zu vermeiden [Hall 2011]. Dies geschieht anhand geeigneter Computerprogramme wie MEGA oder Geneious [Kearse *et al.* 2012, Tamura *et al.* 2013] und vieler weiterer, indem eine diskrete, anhand der vier Nukleotidbasen- oder 20 Aminosäuren- (Charakter)-basierte Matrix geschaffen wird. Diese auch als (*multiple sequence*) *Alignment* bezeichnete Ordnung der Sequenzen dieser Matrix richtet die unterschiedlichen Sequenzen in Zeilen und die jeweils unterschiedlichen Nukleotidbasen oder Aminosäuren in Spalten aus [De Bruyn *et al.* 2014]. Zwei besonders bekannt gewordene automatische *Alignment*-Methoden, welche in den oben erwähnten Analyseprogrammen implementiert sind, sind ClustalW [Thompson *et al.* 1994] und MUSCLE [Edgar 2004]. Das *Alignment* kann je nach Fragestellung entweder Charakter-basiert (direkte Interpretation der individuellen Spalten-Charaktere) oder Distanz-basiert (Matrix paarweise erhobener genetischer Distanzen [sämtlicher Unterschiede zwischen sämtlichen Sequenzpaaren desselben *Alignments*]) sein [De Bruyn *et al.* 2014]. Während beide *Alignment*-Methoden ihre Vor- und Nachteile haben, bestimmen nicht zuletzt die geforderte Detailtreue (Komplexität) und die benötigte Berechnungszeit die Auswahl. Zur schnellen Übersicht über die Verwandtschaftsverhältnisse sind Distanz-basierte Algorithmen wie *unweighed pair grouping with arithmetic mean* oder *neighbor-joining* (NJ) geeignet und legitim, obwohl die Gefahr besteht, dass potentielle evolutive Informationen des Datensatzes übersehen werden [Saitou & Nei 1987, De Bruyn *et al.* 2014]. Daher sind aus heutiger Sicht insbesondere für phylogenetische Fragestellungen akkuratere Techniken wie die *maximum likelihood* (ML)- und *maximum parsimony* (MP)-Algorithmen trotz etwas längerer Berechnungszeiten besser geeignet [Felsenstein 1973, Sober 1988, Tindall *et al.* 2010, De Bruyn *et al.* 2014]. Im Gegensatz zu ML-Algorithmen gehen MP-Algorithmen vom einfachsten Zustand aus (*parsimonious*: sparsam), bei welchem sämtliche Charakter-Substitutionen (bspw. Nukleotide) gleich wahrscheinlich sind; bei ML-Algorithmen lassen sich unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten simulieren [De Bruyn *et al.* 2014]. Nach der Berechnung des *Alignments* muss in jedem Fall eine visuelle Überprüfung der gebildeten Distanzmatrix erfolgen, um fehlerhaft zugeordnete Sequenzen zu

2. SCHRIFTTUM

erkennen und rechtzeitig zu korrigieren. Das fertige *Alignment* stellt die Datengrundlage für das Erstellen phylogenetischer Bäume dar, mit welchen das Ergebnis visualisiert werden soll. Auch hierfür existiert neben den beiden bereits erwähnten Programmen eine reiche Software-Palette.

Für die Betrachtung und Auswertung phylogenetischer Bäume sind zunächst einige Definitionen einzuführen: Innerhalb eines (phylogenetischen) Baums (Form des Kladogramms) werden evolutive Beziehungen beispielsweise zwischen Spezies gezeigt, welche vermutlich einen gemeinsamen Vorläufer haben (s. Abb. 4). Nahe verwandte Spezies (oder Gensequenzen) unterscheiden sich nur gering und liegen im Baum näher beieinander als entfernter verwandte Spezies. Jede Astgabel des Baumes (Knoten) repräsentiert den nächsten gemeinsamen Vorläufer („hypothetische taxonomische Einheiten“, welche jedoch nicht benannt werden; es werden nur terminale Taxa gezeigt). Die Aufspaltung von Spezies im Laufe der Phylogenese wird als Stammesverzweigung (Divergenz) bezeichnet, bei welcher sich die vorhandene evolutive Linie (Stammart) in Schwesterarten aufspaltet (Speziation; vgl. a und b in Abb. 4). Eine Klade – abgeleitet vom griechischen Wort „Zweig“ – wird auch als monophyletische Gruppe bezeichnet, welche sämtliche Spezies (Taxa) inklusive aller Untergruppen enthält, die sich auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückführen lassen (s. Abb. 4). Von einer Schwester-Klade spricht man, wenn zwei Kladen einen unmittelbaren gemeinsamen Vorläufer haben.

2. SCHRIFTTUM

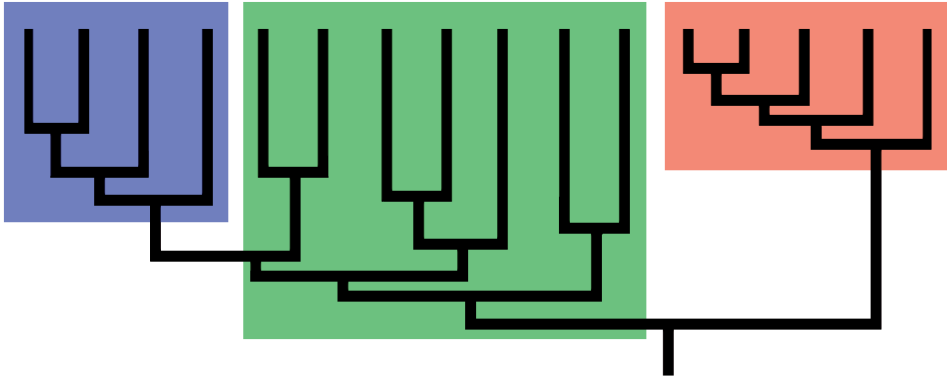


Abbildung 4: Schema zur Verdeutlichung phylogenetischer Begrifflichkeiten.

Der am Boden verwurzelte Baum teilt sich in eine rote und eine blaue Klade auf. Die grüne Gruppe bildet keine Klade, weil sie manche Taxa der gemeinsamen Vorläuferlinie aller grünen Taxa (die blaue Klade) nicht enthält. Die grüne und die blaue Gruppe bilden wiederum eine gemeinsame monophyletische Gruppe, eine Klade. a und b repräsentieren Schwester-Taxa. Schema modifiziert nach PETER BØCKMAN/ Wikimedia public domain (gemeinfrei).

Phylogenetische Bäume können beispielsweise wie in Abb. 1 und 4 verwurzelt (*rooted*; meist liegt der Ursprung links und verkörpert den ältesten gemeinsamen Vorfahren, die Evolutionsrichtung reicht nach rechts) oder wie in Abb. 23 frei (*unrooted*) sein – bei Letzteren sind Evolutionsursprung und -richtung nicht spezifiziert, sondern es wird lediglich die Verwandtschaftsnähe oder -ferne einzelner Spezies gezeigt [Harrison & Langdale 2006]. Bei dem meist bevorzugten verwurzelten Baum wird das nächst verwandte Umfeld aller zu untersuchenden Sequenzen oft in Form einer Außengruppe (*outgroup*) durch eine gleichfalls homologe Sequenz repräsentiert (s. bspw. *F. nucleatum* in Abb. 1). Die bestimmte Anordnung der Taxa in einem phylogenetischen Baum wird als dessen Topologie bezeichnet. Ein zumeist vorhandener Maßstab nimmt Bezug auf die Astlängen und zeigt beispielsweise die Basenaustausche pro Position oder die Zeit an. Um die Verlässlichkeit (Robustheit) des erzeugten Baums in Bezug auf die Topologie seiner Äste zu untermauern, lassen sich beim Erzeugen des Baumes so genannte *Bootstrap*-Analysen durchführen, welche für jede Astgabel (Knoten) die Varianz schätzen. Die *Bootstrap*-Werte werden erzeugt, indem die Algorithmus-

2. SCHRIFTTUM

Berechnungen bei der Erstellung der Bäume in der Regel zwischen 100- bis 1000-mal wiederholt werden (*resampling*). Dazu simuliert jeweils ein virtuelles *Alignment* die Auswirkungen von Charakteraustauschen an jeder Position im Hinblick auf die Topologie des Baums, um die statistische Genauigkeit zu erhöhen. Zwar handelt es sich bei den *Bootstrap*-Werten nicht um echte Wahrscheinlichkeitsniveaus, aber es ist allgemein anerkannt, dass Baumaufzweigungen mit Werten über 70% eine gute Verlässlichkeit der dargestellten Topologie aufzeigen [Felsenstein 1985]. In der Regel werden bei der Beschriftung der Sequenzdaten an den Baumästen auch deren Zugangsnummern (*accession numbers*) der Datenbank mit angegeben, um die Eindeutigkeit der Sequenzen (bspw. für bestimmte Taxa) zu untermauern.

Von MP-Bäumen ist bekannt, dass es viele gleich wahrscheinliche Bäume geben kann. Wünschenswert ist daher ein so genannter Konsensus-Baum, welcher – je nach Vorgabe und Umfang der gegebenen phylogenetischen Informationen – lediglich die in sämtlichen oder in wenigstens der Mehrzahl der erzeugten Bäume identische Topologie enthält [De Bruyn *et al.* 2014]. Bei ML-Bäumen mit einer größeren Anzahl an Sequenzen kann die Rechenleistung zum Problem werden, weshalb Näherungsberechnungen (*approximate tree searching methods*) nach Bäumen mit hoher, aber nicht maximaler Wahrscheinlichkeit suchen. Die diesbezüglichen Voreinstellungen (*nearest neighbor interchange* oder *subtree pruning and regrafting* [SPR]) versuchen lokale Astmuster von Baumteilen zu optimieren, ohne jedoch die Gesamtopologie zu beeinträchtigen. Diese Berechnungen laufen ab, bis kein Baum mit verbesserter Wahrscheinlichkeit mehr erzeugt werden kann [De Bruyn *et al.* 2014].

2.2 Natürliches Habitat und Wirtsspektrum von Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae*

Auf Basis der Literaturdaten der validen Arten der Familie *Leptotrichiaceae* stellen sich die Vertreter dieser Gruppe mit wenigen Ausnahmen als Kolonisierer des Verdauungs- oder Urogenitaltraktes von Menschen, Wirbeltieren und sogar Wirbellosen dar.

2. SCHRIFTTUM

2.2.1 *Streptobacillus*

Aufgrund seines zoonotischen Potentials (s. Kap. 2.3.1) liegen die meisten Beschreibungen für *S. moniliformis* vor. Demnach sind Ratten latent mit *S. moniliformis* im Oro- bzw. Nasopharynx besiedelt, wodurch dieser auch im Speichel der Tiere nachzuweisen ist. Augenscheinlich kann es – möglicherweise auch über indirekten Kontakt – auch zu einer Ausscheidung mit dem Urin, möglicherweise auch mit dem Kot der Tiere kommen [Irvine & Wills 2006, Elliott 2007]. Obwohl Ratten gelegentlich auch *Streptobacillus*-Infektionen erleiden, scheinen sie die bislang einzige bekannte Nagetiergruppe zu sein, welche physiologisch mit Streptobazillen kolonisiert ist. Eine japanische Publikation konnte eine Besiedlung auch für damals unbeschriebene *Streptobacillus* spp. nachweisen, welche von symptomlosen japanischen Haus- und Wanderratten (*Rattus (R.) rattus* und *R. norvegicus*) isoliert wurden [Kimura *et al.* 2008]. Es ist aufgrund der teilweise älteren Literatur nicht einfach abschließend zu klären, ob die Kolonisierung anderer Nager- und Wildtierarten außer Ratten tatsächlich dem Erreger *S. moniliformis* entsprechen oder aber ob diese durch weitere, unbeschriebene Gattungsvertreter ausgelöst sind [Schottmüller 1914, Dick & Tunnicliff 1918, McMillan & Boulger 1968, Wilkins *et al.* 1988] (s. Abb. 16; valide Arten unterstrichen, Pfeile verweisen auf putative unbeschriebene Spezies aus Tieren).

Kürzlich wurde auch der Oropharynx des Menschen als natürliches Reservoir von *S. hongkongensis* beschrieben [Lau *et al.* 2016]. Trotz der Erstbeschreibung aus klinischen Proben (s. Kap. 2.3.1.2) scheint *S. hongkongensis* hier zu den normalen Mikrobiota zu zählen und sich diese Nische sogar – wie die Studie aus Hongkong zeigt – noch mit einer weiteren unbeschriebenen *Streptobacillus*-Art zu teilen [Lau *et al.* 2016]. Der Nachweis gelang nach Anreicherung mittels einer 16S rRNS-basierten, für *S. hongkongensis* spezifischen PCR mit anschließender Sequenzierung bei gesunden Probanden sowie bei Pharyngitispatienten und ausschließlich bei Kindern bis zu einem Alter von zwölf Jahren, wobei Kleinkinder jünger als fünf Jahre sogar am häufigsten kolonisiert waren. Die unbeschriebene Art schien mit 9,6% sogar weiter verbreitet zu sein als *S. hongkongensis* mit 2,0%, wenngleich sich bei drei Patienten sogar Ko-Kolonisierungen zeigten [Lau *et al.* 2016].

Ergebnisse aus Mikrobiomstudien lassen allerdings auf eine weitere Verbreitung der Streptobazillen schließen. Durch die Verfügbarkeit großer Mengen molekularer Daten

2. SCHRIFTTUM

sind zahlreiche Tierarten und auch andere Körperregionen des Menschen Ausgangspunkt für Betrachtungen zur Verbreitung von *Streptobacillus*-Gensequenzen geworden: Solche Nachweise gelangen bislang bei asymptomatischen Testpersonen durch Mikrobiomstudien des Hals-Nasen-Rachenraums [Lau *et al.* 2016], des Darmtrakts [Hullar *et al.* 2015] sowie der Haut [Kong *et al.* 2012]. Bei Tieren ließen sich entsprechende Sequenzen bislang in der Nasenschleimhaut von als Versuchstiere gehaltenen Baumwollratten in Deutschland [Chaves-Moreno *et al.* 2015], auf Genitalschleimhäuten und im Ejakulat von afrikanischen Hörnchen (Bastos *et al.*, unpublizierte, jedoch veröffentlichte Sequenzen; Zugriffsnummern HM590422 - HM590430), in der Maulhöhle und im Darm von Hunden [Xenoulis *et al.* 2008, Dewhirst *et al.* 2012], in Milzen von Hausratten und einer Natal-Vielzitzenmaus [Galan *et al.* 2016] und im Kot von Enten finden [Strong *et al.* 2013]. Regelmäßige Nachweise ohne klinische Symptome und ohne erkennbares pathogenes Potential fanden sich auch auf den Genitalschleimhäuten von Kühen und Schafen und ferner fanden sich Hinweise dafür, dass diese unbeschriebenen *Streptobacillus*-Spezies sogar die normalen Mikrobiota gesunder Tiere maßgeblich mit prägen [Machado *et al.* 2012, Swartz *et al.* 2014].

2.2.2 *Sneathia*

Das natürliche Reservoir von *Sn. sanguinegens* und auch von „*Sn. amnii*“ ist die Vagina, möglicherweise auch der Darm des Menschen [Anonym 2006, Harwich *et al.* 2012, Nelson *et al.* 2016]. Wie häufig eine reine Kolonisierung auftritt und wie hoch die Prävalenz in der Normalbevölkerung ist, scheint noch nicht abschließend geklärt. Wegen ihres zumindest fakultativ pathogenen Potentials finden sich weitere Betrachtungen zu dieser Erregergruppe im Kapitel Klinik (s. Kap. 2.3.2). Die bereits erwähnten Studien zur Verbreitung von Streptobazillen bei Kühen und Schafen lassen allerdings auch das Vorkommen bislang unbeschriebener *Sneathia*-Spezies im Reproduktionstrakt dieser Tierarten vermuten [Machado *et al.* 2012, Swartz *et al.* 2014].

2. SCHRIFTTUM

2.2.3 *Sebaldella*

Sebaldella termitidis galt bis vor Kurzem als obligat an Insekten angepasster Erreger, weil sie den Darm von Termiten besiedelt und hier möglicherweise sogar eine symbiotische Rolle beim Aufschluss von Harnsäure einnimmt [Potrikus & Breznak 1980a, b]. Daneben finden sich inzwischen auch bei dieser Gattung Hinweise für ein breiteres Vorkommen in anderen Wirbellosen [Lehman *et al.* 2009, Senderovich & Halpern 2012, Jia *et al.* 2013] und in Umweltproben [Riviere *et al.* 2009, Cardinali-Rezende *et al.* 2013]. Über die jüngst nachgewiesene Rolle als Krankheitserreger sei auf das Kapitel erweiterte Wirtsbeziehungen (s. Kap. 5.4) verwiesen.

2.2.4 *Leptotrichia*

Der natürliche Standort der meisten *Leptotrichia*-Spezies ist die Mundhöhle des Menschen [Jang *et al.* 2016, Jiang *et al.* 2016, Kato *et al.* 2016, Ren *et al.* 2016a], wo sie besonders im Zahnbelag nachgewiesen werden können [Eribe *et al.* 2004]. Interessanterweise verursachen mit humanen gingivalen Fibroblasten ko-kultivierte *L. wadei* im Gegensatz zu obligaten Mundhöhlenpathogenen (u.a. *Porphyromonas gingivalis*) eine starke immunologische Abwehrreaktion, welche darauf schließen lässt, dass es sich nicht um ein bedeutendes Pathogen handelt [Jang *et al.* 2016]. Dies wird noch dadurch gestützt, dass *Leptotrichiaceae* vor allem nach der Aufnahme von Vitamin C häufiger in entsprechenden oralen Mikrobiomproben nachzuweisen sind als ohne Vitaminaufnahme [Kato *et al.* 2016] und dass *Leptotrichia* spp. gleichfalls häufiger in Speichelproben aus nicht-kariösen Kindermündern zu finden sind als aus solchen mit Karies [Jiang *et al.* 2016]. Interessant, wenn auch etwas widersprüchlich, sind die prädiktiven Charakter der oralen *Leptotrichia*-Besiedlung als Biomarker im Hinblick auf Tumorerkrankungen. Während Speichelproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen zunächst weniger, nach chirurgischer Intervention jedoch mehr *Leptotrichia* spp. enthielten [Guerrero-Preston *et al.* 2016], senkte das Vorhandensein dieser Bakterien sogar das Risiko für Pankreaskarzinome [Fan *et al.* 2016]. Weiterhin sind Isolate aus Mikrobiota-Untersuchungen der Periurethralregion gesunder Mädchen und des Genitaltrakts von Frauen bekannt [Söderberg *et al.* 1979, Evaldson *et al.* 1980, Eribe *et al.* 2004]. Auch bei dieser Gattung lassen Mikrobiomstudien allerdings ein deutlich

2. SCHRIFTTUM

erweitertes Habitat vermuten. Relativ kurz zurückliegende Erfassungen der bakteriellen Genital-Mikrobiota von Kühen lassen darauf schließen, dass auch bei Kühen Vertreter aus der nicht näher untergliederten Familie *Leptotrichiaceae* den Uterus kolonisieren und hier möglicherweise assoziiert mit Erkrankungen auftreten. So fanden sich bei Kühen mit Endometritis vier Wochen post partum bis zu 17% Vertreter dieser Familie in Spülproben und bis zu 6% in Biopaten, wohingegen nach sieben Wochen solche Nachweise mit 13% nur noch in den Spülproben gelangen [Knudsen *et al.* 2016]. Nachweise für kolonisierende *Leptotrichiaceae*-Phylotypen finden sich auch in den Mägen von Saugferkeln [Xu *et al.* 2016]. Auch im Darm bestimmter herbivorer Fischarten scheinen die Gattungen *Leptotrichia* neben *Clostridium* und *Citrobacter* am häufigsten vorzukommen und hier dem Aufschließen von Zellulose zu dienen, während diese Gattungen in karnivoren Spezies desselben Biotops fehlen [Liu *et al.* 2016].

2.2.5 Ratten als Wirtstiere für Streptobazillen

2.2.5.1 Speziesdiversität und Verbreitung von Ratten

Ratten der Gattung *Rattus* sind eine der Familie Langschwanzmäuse (*Muridae*) zugehörige Nagetiergruppe, zu der weltweit etwa 65 Spezies zählen. Der Verbreitungsschwerpunkt liegt in Südostasien (Indien bis China), der indonesischen Inselwelt, Neuguinea und Australien (<http://www.iucnredlist.org/>). Den natürlichen Lebensraum stellen je nach Spezies abgeschiedene Tiefland- bis Montanregenwälder dar. Als gut an den Menschen angepasste Vertreter haben die Hausratte (*R. rattus*; Abb. 5A) und die Wanderratte (*R. norvegicus*; 5B) auch Häuser und Reisfelder als Lebensraum erschlossen und über Schiffshandelsrouten eine weltweite Verbreitung erlangt (<https://de.wikipedia.org/wiki/Ratten>). Nach Mitteleuropa kamen die Hausratten wohl als „Schiffsratten“ mit den Römern. Die Wanderratte hat sich erst im 18. Jahrhundert bis nach Mitteleuropa ausgebreitet. Durch deren Auftreten sowie durch Umstrukturierungen bei Häusern und Schiffen ist die Hausratte bei uns weitgehend verdrängt worden. Auch andernorts sind einzelne Spezies, meist kleinräumig verbreitete Inselendemiten, als gefährdet oder stark gefährdet einzustufen, zwei Arten auf den Weihnachtsinseln, *R. macleari* und *R. nativitatis* gelten als ausgestorben (<http://www.iucnredlist.org/>).

2. SCHRIFTTUM

Die Hausratte lebt hierzulande vorzugsweise in trockenen Wohn- und Vorratsgebäuden sowie in Kellern und Ställen; sie ist in manchen Regionen allerdings sehr selten und steht in Deutschland auf der Roten Liste gefährdeter Arten (<https://de.wikipedia.org/wiki/Hausratte>). Die Hausratte lebt in ihrem natürlichen Lebensraum zumindest anteilig baumbewohnend und bevorzugt pflanzliche Kost. Demgegenüber bevorzugt die Wanderratte in Abwesenheit des Menschen feuchte Uferregionen als Lebensraum und scheint – im Gegensatz zur Hausratte – besser an den Menschen angepasst zu sein: höhere Körpergröße und Aggressionspotential, ein breiteres Nahrungsspektrum, eine höhere Toleranz gegen Wetterextreme und das bessere Grabverhalten begünstigen die Wanderratte gegenüber der Hausratte (https://en.wikipedia.org/wiki/Brown_rat).

Zur Kolonisierung der unterschiedlichen Rattenspezies mit Streptobazillen ist fast nichts bekannt. Die meisten Rattenbisse und -kontakte spielen sich mit den an den Menschen adaptierten Spezies ab; das sind neben Wander- und Hausratten noch die Pazifische Ratte (*R. exulans*), die Reisfeldratte (*R. argentiventer*), die Himalajaratte (*R. nitidus*) und die Zentralasiatische oder Nepalratte (*R. pyctoris*). Selbst für die beiden in Mitteleuropa heimischen Spezies liegen nur Daten vor, dass *S. moniliformis* bei Wanderratten vorkommt. Japanische Untersuchungen zeigen das Auftreten anderer *Streptobacillus*-Spezies bei Hausratten [Kimura *et al.* 2008].

2. SCHRIFTTUM

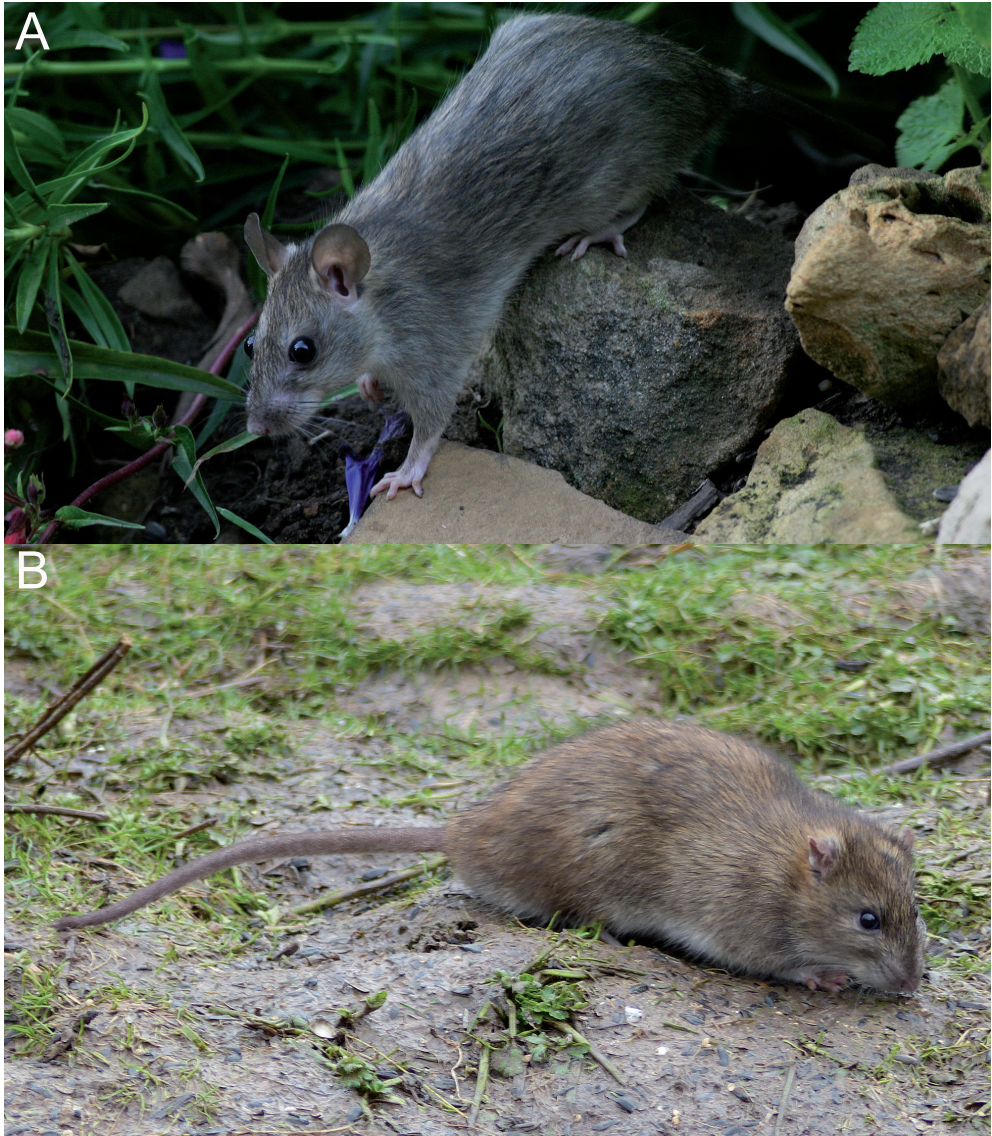


Abbildung 5: A. Hausratte (*Rattus rattus*; Aufnahme: LARRY JON FRIESEN) und B. Wanderratte (*Rattus norvegicus*; Aufnahme: SIMON TONGE) sind die in Mitteleuropa heimischen Vertreter der aus etwa 65 Spezies bestehenden indoasiatischen Gattung *Rattus*. Beide Spezies sind nachweislich Überträger von Streptobazillen.

2. SCHRIFTTUM

2.2.5.2 Ratten als Überträger weiterer Krankheiten
Im Hinblick auf Zoonosen denkt man zunächst an die Bedeutung der Ratten bei der Verbreitung von *Y. pestis* während dreier gesicherter Pest-Pandemien in der Neuzeit. Allerdings scheinen die erste (spätantike „Justinianische Pest“) und zweite (mittelalterlicher „Schwarzer Tod“) Pandemie in Europa möglicherweise nicht im angenommenen Maße von Ratten übertragen worden zu sein, weil die vorhandene Rattenpopulation in Mittel- und Nordeuropa nicht so flächendeckend gewesen sein soll, sodass es auch andere Übertragungswege gegeben haben könnte. Von Rattenbissen oder Kontakt zu Ratten gehen hierzulande heute andere Gefahren aus. Die wichtigsten Zoonoseerreger stellen neben den beiden RBF-Erregern Leptospiren und Hantaviren (Seoulvirus) dar ([Bleich & Nicklas 2008]; Abb. 6). Die Maulhöhle von Ratten ist daneben mit einer breiten Anzahl obligat und fakultativ pathogener Bakterienarten (darunter Salmonellen, multiresistente *E. coli*, enterohepatische *Helicobacter* und Pasteurellen) kolonisiert, welche beim Biss übertragen werden können [Bleich & Nicklas 2008, Guenther *et al.* 2012]. Freilebende Rattenarten bilden neben anderen kleinen Nagetieren ein Reservoir für Orthopockenvirus (Kuhpocken), verschiedene Borrelien-, Bartonellen- und Rickettsienarten, die Erreger von Tularämie (*Francisella tularensis*) und Q-Fieber (*Coxiella burnetii*), Dermatophyten (*Trichophyton* spp.), Kryptosporidien, tropische Rattenmilben, Ratten-Lungenwurm (*Angiostrongylus cantonensis*) und Zwergbandwürmer, welche teils direkt, teils über Vektoren wie Zecken auf den Menschen und andere Wild- und Haustiere übertragen werden können [Chung *et al.* 1998, Bleich & Nicklas 2008, Himsworth *et al.* 2013, Morand *et al.* 2015, Heuser *et al.* 2016].

2. SCHRIFTTUM



Abbildung 6: Rattenbissfieber sowie eine Reihe weiterer Zoonosen können selbst von als Haustiere gezüchteten Farbmorphen der Wanderratte nicht selten übertragen werden. Der oft sehr unkritische Umgang mit diesen Haustieren führt gerade bei Kindern zu Erkrankungen (Aufnahme: adamovalenka/pixabay.com).

2.2.5.3 Ratten in Gesellschaft, Symbolik, Kultur und Geschichte

Ratten stellen hierzulande für die meisten Menschen eindeutig emotional negativ belegte Tiere dar, manchmal bestehen sogar irrationale Ängste oder Phobien. Ratten gelten als gefährlich, hinterlistig, aggressiv und schmutzig und sind ohne Frage bedeutsame Vorratsschädlinge. Die Assoziation zu Kanalisation und Pest fördern

2. SCHRIFTTUM

zweifelsohne das Unbehagen, dem durch die Redensarten „Rattenloch“ und „Rattenschwanz“ Ausdruck verliehen wird. In der Traumdeutung werden Ratten mit Verrat und Misstrauen assoziiert; Ratten in Träumen haben aber auch eine positive, warnende Funktion, sich nicht von „nagenden“ Zweifeln, Ängsten, Misstrauen oder übertriebener Risikobereitschaft leiten zu lassen (<http://dietraumdeuter.de/traumsymbole/ratte/>).

In den letzten Jahren erfreuen sich Ratten als Heimtiere steigender Beliebtheit, bei denen immer wieder ihre Gelehrigkeit und Intelligenz sowie die Reinlichkeit und ihre Zutraulichkeit hervorgehoben werden, sodass es sogar zu sehr engem Kontakt mit ihnen kommt (<http://farbratten.com/pro-und-contra-zur-anschaffung-von-ratten/>; Abb. 6).

In anderen Kulturen, insbesondere im asiatischen Raum, sind Ratten eindeutig emotional positiv belegt. Im chinesischen Horoskop stellt die Ratte ein Tierkreiszeichen dar. Im Zeichen der Ratte geborene Menschen gelten als schlau, schön, selbstbewusst, optimistisch, kreativ und intelligent und sollen daher für Führungsaufgaben prädestiniert sein (<http://horoskop.chinanetz.info/ratte/>).

Größere Bekanntheit hat der so genannte „heilige Rattentempel von Karni-Mata“ im indischen Bundesstaat Rajasthan nahe der Stadt Deshnok an der pakistanischen Grenze erlangt. Der Tempel ist heute ein Magnet für Einheimische und Touristen, in dem Tausende von Ratten leben, welche mit eigens für die Tiere gekochten und in silbernen Schüsseln servierten Speisen umsorgt werden (Abb. 7). Die Besucher müssen im Tempel die Schuhe ausziehen und eine Berührung mit einer der keineswegs scheuen Ratten gilt als Glückszeichen. Die Gläubigen essen und trinken zudem aus denselben Gefäßen, aus denen zuvor die Ratten gefressen haben. Angeblich sei es noch zu keiner Epidemie gekommen. Der indischen Mythologie zufolge habe die als Heilige verehrte Karni Mata im 14. und 15. Jahrhundert gelebt und noch zu Lebzeiten den Status einer Schutzgöttin der Rajputen eingenommen. Der Überlieferung nach habe Karni Mata den toten Sohn einer Fürstenfamilie wieder zum Leben erwecken sollen. Sie habe daraufhin versucht, unter Trance den Totengott Yama von der Herausgabe des verstorbenen Kindes zu überzeugen. Dieser habe mit dem Verweis auf die bereits erfolgte Wiedergeburt abgelehnt. Daraufhin habe Karni Mata geschworen, Yamas Totenreich keine Seele mehr zu übereignen, sondern jede Seele stattdessen als Ratte auf der Erde wiedergebären

2. SCHRIFTTUM

zu lassen, um diese schließlich als hochangesehene Personen wieder auferstehen zu lassen. Der daraus abzuleitende Respekt der Ratte gegenüber gilt im Tempel, wohin Einheimische pilgern, um zu beten und Glück zu erfahren. Außerhalb des Tempels gelten Ratten bei Hindus zwar als Schädlinge, werden aber nicht getötet, sondern gefangen und andernorts wieder ausgesetzt [Hausemer 2008].



Abbildung 7: Fütterung von Wanderratten im „heiligen Rattentempel von Karni-Mata“ im indischen Bundesstaat Rajasthan (Aufnahme: INGRID BUNSE).

2.3 Klinik

2.3.1 *Streptobacillus*

2.3.1.1 *Streptobacillus moniliformis*

Streptobacillus moniliformis ist einer von zwei ätiologischen Erregern der Zoonose RBF. Vor gut 100 Jahren wurde RBF 1914 erstmals mit dem heutigen Erreger *S. moniliformis* assoziiert [Schottmüller 1914]. RBF wurde jedoch bereits vor rund 2300 Jahren in Indien erwähnt [Row 1918]. Unklar ist, ob mit dieser Beschreibung der zweite ätiologische Erreger, *Spirillum (Sp.) minus*, gemeint sein könnte, welcher

2. SCHRIFTTUM

häufiger in Asien auftritt und dort auch als ‚sodoku‘ (Rattengift) bezeichnet wird. Aufgrund einer bislang nicht geglückten Kultivierung von *Sp. minus* wird diese Spezies – in Ermangelung eines Typstamms und einer formalen Beschreibung – nicht in der „Approved List of Bacterial Names“ (<http://www.bacteriocict.fr/>) geführt. *Spirillum minus* lässt sich ebenfalls auf den Schleimhäuten des Oropharynx von Ratten, aber auch in deren Blut nachweisen und kommt möglicherweise auch im Konjunktivalsekret der Augen dieser Tiere vor [Gaastra *et al.* 2009]. Ältere Arbeiten beschreiben auch höhere Erregerzahlen von *Sp. minus* in der Zungenmuskulatur und Ohrspeicheldrüse verglichen mit dem Blut, sodass der Erreger ebenfalls mit dem Speichel und besonders nach Läsionen übertragen werden kann (zitiert in [Gaastra *et al.* 2009]). Dies könnte erklären, warum es eines initialen Traumas der Ratte bedarf, bis der Erreger ausgeschieden wird [Gaastra *et al.* 2009]. Beide RBF-Erreger lassen sich somit von latent infizierten Ratten auf den Menschen – natürlicher Weise jedoch nicht von Mensch zu Mensch – übertragen und verursachen ein klinisch nahezu identisches Krankheitsbild [Gaastra *et al.* 2009]. Lediglich ein schlecht abheilendes, Schanker-artiges Ulkus an der Bissstelle und regelmäßig wiederkehrende Fieberschübe sollen ausschließlich bei der *Sp. minus*-Infektion auftreten [Gaastra *et al.* 2009]. Wegen seiner Relevanz für diese Arbeit beziehen sich die Aussagen im Folgenden nur noch auf streptobazilläres, also jenes durch *S. moniliformis* ausgelöstes, RBF.

2.3.1.1.1 Klinik beim Menschen

Die gängigsten klinischen Symptome beim Menschen beinhalten Fieber, Schüttelfrost, Unwohlsein, Muskelschmerzen sowie ein makulopapuläres, petechiales oder pustulöses, insbesondere palmar und plantar auftretendes Exanthem [Levaditi *et al.* 1925, Elliott 2007, Gaastra *et al.* 2009]. Darüber hinaus kann es zu einer oft auf die Kniegelenke beschränkten, regelmäßig aber auch andere Gelenke betreffenden Polyarthritits und Synovitis [Torres *et al.* 2001, Wang & Wong 2007, Dubois *et al.* 2008], welche einer rheumatoiden Arthritis ähnlich ist [Legout *et al.* 2005], und seltener auch zu Abszessbildungen kommen [Dijkmans *et al.* 1984, Torres *et al.* 2001, Dubois *et al.* 2008, Addidle *et al.* 2012]. Dendle *et al.* analysierten retrospektiv das Auftreten einer Arthritis und stellten fest, dass sowohl septische [Dendle *et al.* 2006] als auch nicht-eitrige, immunpathologisch bedingte Formen beschrieben sind [Brown & Nunemaker 1942, Roughgarden 1965, Dendle *et al.*

2. SCHRIFTTUM

2006]. Seltener werden Erbrechen und Zungenulzera als klinische Symptome des RBF beschrieben [Miraflor *et al.* 2015]. In der Folge von RBF sind Bakteriämie, Pneumonie und Endokarditis besonders gefürchtet [Torres *et al.* 2003, Kondruweit *et al.* 2007, Abadeer *et al.* 2016], welche regelmäßig zu lebensbedrohlichen Komplikationen und einer deutlich erhöhten Letalität führen [Rupp 1992]. In der Regel sind RBF-Fälle durch erhöhte Leukozytenzahlen (Neutrophilie) in Blut und Synovia, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeiten und Werte für C-reaktives Protein (CRP) begleitet [Dendle *et al.* 2006, Miraflor *et al.* 2015]. Der Erreger lässt sich je nach beobachteter Symptomatik aus Wunden, Geschwüren, Blut, Abszessen, Organveränderungen, Synovia oder Liquor isolieren [Irvine & Wills 2006]. Es sollten wiederholt Blutkulturen angelegt werden, denn manchmal gelingt die Anzucht nicht auf Anhieb [Costa-Pinto *et al.* 2016, Mahmoodi *et al.* 2016]. Bei klassischem RBF liegt tatsächlich ein Biss oder Kratzer mit bewusster Wahrnehmung der Ratte zugrunde, jedoch reicht auch bereits der indirekte Kontakt zu Ratten oder Rattenurin aus, um atypisches RBF auszulösen. Besonders prominent sind in diesem Zusammenhang einige Lebensmittel-assoziierte Ausbrüche im letzten Jahrhundert. Bei solchen Ausbrüchen erkrankten zahlreiche Kinder unter anderem im Rahmen von Schulspeisungen an fieberhaften Infektionen, welche zudem durch starkes Erbrechen und Pharyngitiden geprägt waren [Parker & Hudson 1926, Place *et al.* 1926, 1934, Sprecher & Copeland 1947, Lambe *et al.* 1973, Shanson *et al.* 1983, McEvoy *et al.* 1987]. Unklar ist, ob der Erreger in Milch oder Wasser vorhanden war, zu welchen Ratten Zugang hatten. Jedoch wächst der Erreger nicht in Milch, sodass die Anreicherung eines infektiösen Inokulums zweifelbehaftet erscheint [Savage 1984]. Dieses Lebensmittel-assoziierte Krankheitsbild, welches in der Ortschaft Haverhill, Massachusetts erstmals berichtet wurde, hat zu der weiteren klinischen Bezeichnung ‚Haverhill-Fieber‘ der *S. moniliformis*-Infektion geführt [Parker & Hudson 1926, Place *et al.* 1926, 1934, Sprecher & Copeland 1947, Lambe *et al.* 1973, Shanson *et al.* 1983, McEvoy *et al.* 1987]. Die symptomatische Trias des RBF aus Fieber, Hautausschlag und Gelenkentzündung impliziert einige häufiger geäußerte Differentialdiagnosen wie septische Arthritis anderer Genese, chronische Meningokokkeninfektion, sekundäre Syphilis, Lyme-Borreliose, disseminierte Gonorrhoe, aber auch Rocky Mountain Fleckfieber und Infektionen mit Coxsackie-, Hepatitis-, Parvo- und Herpesviren sowie nicht infektiöse Ursachen wie Psoriasis und Dermatitiden anderer Genese [Dendle *et al.* 2006, Miraflor *et al.* 2015].

2. SCHRIFTTUM

Interessanterweise kann es allerdings auch zu falsch-positiven Kreuzreaktionen bei der Syphilis-Serologie nach RBF-Infektion kommen [Anderson *et al.* 1983].

2.3.1.1.2 Klinik bei Tieren

Andere Nagetierarten, aber auch Ratten selbst sowie einzelne Fallbeschreibungen bei Haus-, Zoo- und Nutztieren zeigen eine Empfänglichkeit dieser Tierarten gegenüber einer *S. moniliformis*-Infektion mit einer mehr oder weniger spezifischen Klinik. Dabei beruht ein Großteil auf der rein präsumtiven bzw. phänotypischen Charakterisierung der isolierten Stämme. Die meisten der Isolate wurden nicht konserviert, sodass es in Ermangelung molekularer Charakterisierungen spekulativ bleibt, ob es sich bei den Fällen tatsächlich um *S. moniliformis* gehandelt hat.

Zumindest für einige Stämme von Menschen, Ratten, Mäusen und Puten konnte zweifelsfrei die Speziesdiagnose *S. moniliformis* bestätigt werden [Hofmann 1994].

Ratten sind trotz der latenten Besiedlung gelegentlich von Konjunktivitis, Abszessbildungen, Mittelohrentzündungen und Pneumonien durch *S. moniliformis* betroffen [Young & Hill 1974, Hayashimoto *et al.* 2008, Rohde *et al.* 2008]. Die Tatsache, dass bei einigen humanen Fallberichten auch der spontane Tod der den Biss verursachenden Ratte berichtet wird, könnte darauf hindeuten, dass gelegentlich auch Ratten an *S. moniliformis* schwerer erkranken oder sterben können [Rygg & Bruun 1992, Prager & Frenck 1994, Hudsmith *et al.* 2001, Ojukwu & Christy 2002, Andre *et al.* 2005, Hayashimoto *et al.* 2008].

Mäuse (*Mus musculus*) zeigen eine stark von ihrer Genetik beeinflusste Empfänglichkeit für *S. moniliformis* [Kaspereit-Rittinghausen *et al.* 1990, Wullenweber *et al.* 1990, Wullenweber *et al.* 1991, Glastonbury *et al.* 1996]. So erkranken C57BL/6J Mäuse am stärksten unter Symptomen einer zervikalen Lymphadenitis und vereinzelt Leber- und Milzabszessen [Wullenweber *et al.* 1990] – BALB/c Mäuse gelten hingegen als resistent [Hofmann 1994]. Weiterhin sind ausbleibende Trächtigkeiten und Aborte bei Mäusen beschrieben worden [Sawicki *et al.* 1962]. Heute obsolet ist ein Fußballeninjektionsversuch, wodurch sich eine septische Arthritis entwickelt [Wullenweber 1995].

Puten (*Meleagris gallopavo*) wurden wiederholt als empfänglich für *S. moniliformis* registriert. Die Infektion verläuft mit Symptomen einer Tendovaginitis und Polyarthrit

2. SCHRIFTTUM

[Boyer *et al.* 1958, Yamamoto & Clark 1966, Mohamed *et al.* 1969, Glünder *et al.* 1982]. Einige Autoren erwähnen, dass ein Kontakt zu Ratten bestanden habe, und die biochemische Charakterisierung von Putenisolaten sowie die Untersuchung mittels DDH und 16S rRNS Gensequenzanalyse ergaben keine Abweichungen zu Stämmen von Ratten [Hofmann 1994].

Das Vorkommen von *S. moniliformis* wurde auch von Hunden, Katzen, Frettchen und Wieseln berichtet und in der Vergangenheit oft mit der oralen Aufnahme wilder Ratten begründet [Maynard *et al.* 1986, Clausen 1987, Wilkins *et al.* 1988, Peel 1993, Gordon & Jones 1999, Wouters *et al.* 2008]. Zwei Fallberichte von Hunden konnten *S. moniliformis* in einem Abszess sowie in einem stark an Haverhill-Fieber erinnernden Fall finden [Ditchfield *et al.* 1961, Das 1986]. Bei Letzterem zeigte der Hund vor seinem Tod Vomitus, Diarrhoe, schmerzhafte Hüftgelenke sowie ein petechiales Exanthem; er hatte zuvor potentiell mit Rattenurin kontaminierten Abfall gefressen. Bei einer Katze wurde vermutet, dass sie ihre Besitzerin mit *S. moniliformis* infiziert habe, ohne jedoch selbst erkrankt zu sein [Gascard *et al.* 1967].

Zwei weitere Fallberichte betreffen Tiere aus zoologischen Einrichtungen mit *S. moniliformis*-Infektionen. Bei einem Koala [Russell & Straube 1979] wurden multiple granulomatöse Prozesse gefunden und der Erreger in Reinkultur isoliert. Bei jeweils einem Rhesusmakaken und einem Springaffen wurden eine Klappenendokarditis bzw. eine septische Arthritis diagnostiziert [Valverde *et al.* 2002]. Die Autoren mutmaßten, dass kontaminierte Nahrung oder Wasser zu den beiden Infektionen geführt haben könnte.

2.3.1.2 *Streptobacillus hongkongensis*

Bislang konnte *Streptobacillus hongkongensis* lediglich vom Menschen und zwar von zwei humanen Patienten in Hongkong isoliert werden. Während ein 38 Jahre alter männlicher, ansonsten immunkompetenter Patient mit Mandelentzündung den Erreger in einem peritonsillären Abszess trug, wurde das zweite Isolat bei einem 64-jährigen Mann mit tophöser Gicht aus der Synovia eines septisch infizierten Ellenbogengelenks isoliert [Woo *et al.* 2014]. Dieselbe Arbeitsgruppe postulierte kürzlich, dass das natürliche Reservoir von *S. hongkongensis* und einer weiteren *Streptobacillus*-Spezies der humane Oropharynx sei (s. a. Kap. 2.2.1) [Lau *et al.*

2. SCHRIFTTUM

2016]. Bislang fanden sich keine weiteren Nachweise außerhalb Hongkongs oder bei Tieren.

2.3.1.3 Nicht näher identifizierte *Streptobacillus*-Phylotypen

Eine unlängst erschienene Studie untersuchte die Auswirkung der kindlichen Oral-Mikrobiota im Hinblick auf die Entstehung von Karies und schwarzen Verfärbungen am Milchzahngebiss [Li *et al.* 2016]. Dabei konnten die Autoren feststellen, dass die Gruppe von Plaques von kariösen Kinderzähnen durch das Vorhandensein der drei dominanten Phylotypen von *Selenomonas*, *Gemella* und *Streptobacillus* geprägt waren [Li *et al.* 2016]. Eine weitere Studie wies bereits 2014 *Streptobacillus*-Phylotypen – differenziert als *S. moniliformis* – bei oralen Plaques von Kleinkindern nach [Xu *et al.* 2014]. Inwieweit es sich bei den Arbeiten der chinesischen Arbeitsgruppen auch um *S. hongkongensis* oder die jüngst nachgewiesene unbeschriebene Spezies [Lau *et al.* 2016] gehandelt haben könnte, ist derzeit nicht bekannt.

2.3.2 *Sneathia*

Sneathia sanguinegens und '*Sn. amnii*' besiedeln den weiblichen Genitaltrakt sowie den Darmtrakt des Menschen und führen hier als fakultativ pathogene Mikroorganismen gelegentlich zu Erkrankungen [Harwich *et al.* 2012, Nelson *et al.* 2016]. In einer US-Studie konnten bei mindestens 30% der gynäkologischen Patientinnen mit unterschiedlichen Besuchsgründen *Sneathia* spp. in der Vagina nachgewiesen werden [Harwich *et al.* 2012]. Dabei dominierte „*Sn. amnii*“ in rund 76% der Proben, gefolgt von *Sn. sanguinegens* (18%) und einer unbeschriebenen Spezies (ca. 6%) [Harwich *et al.* 2012]. Insbesondere *Sn. sanguinegens* ist am Krankheitsbild der bakteriellen Vaginose (BV), einer mit purulentem Ausfluss gekennzeichneten Entzündung des weiblichen Genitals beteiligt. Diese kann bis zu 29% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betreffen und ist durch eine Verschiebung der prädominanten Vaginal-Mikrobiota von Laktobazillen hin zu anaeroben Bakterien geprägt [Koumans *et al.* 2007, Hillier *et al.* 2008]. Eine nach proximal fortschreitende Besiedlung unter Beteiligung von Zervix und Endometrium wird auch als inflammatorische Beckenerkrankung (*pelvic inflammatory disease*

2. SCHRIFTTUM

[PID]) bezeichnet. Wie bei der BV sind bei der PID neben *Sneathia* spp. weitere Bakterienarten beteiligt, welche im Verdacht stehen, die Ausprägung einer persistenten oder rekurrenten Endometritis sowie von Infertilität positiv zu beeinflussen [Haggerty *et al.* 2016]. Ein zweiter Symptomenkomplex, an dem auch „*S. amnii*“ beteiligt sein kann, schließt obstetrische Komplikationen wie Chorioamnionitis, spontane Aborte, postpartale oder neonatale Septikämien und Meningitis mit ein [De Martino *et al.* 2004, Harwich *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Kacerovsky *et al.* 2015, Nelson *et al.* 2016]. Chorioamnionitis führt sogar einer neueren Studie zufolge zur Besiedlung des Neonatendarms mit unter anderem *Sneathia* spp. und erhöht so das Risiko für Frühgeborene, an einer späten Sepsis zu erkranken und zu sterben [Puri *et al.* 2016]. Es gibt ferner Hinweise dafür, dass die Zusammensetzung des vaginalen Mikrobioms und hier im Besonderen das Vorhandensein von *Sneathia* spp. maßgeblich an der Entstehung venerischer Infektionen wie HIV, HPV und auf diese Weise sogar von Zervixkarzinomen beteiligt sein kann [Spear *et al.* 2008, Nawrot *et al.* 2010, Lee *et al.* 2013, Mitchell *et al.* 2013]. Vergleichsweise spät wurde auch beim Mann die ätiologische Bedeutung von *Sneathia* spp. als möglicherweise sexuell übertragbarer Erreger eitriger Urethritiden erkannt [Nelson *et al.* 2010, Manhart *et al.* 2013]. Kürzlich wurde eine – auf Basis der 16S rRNS-Gensequenz nicht mit *Sn. sanguinegens* identische – *Sneathia* sp. auch außerhalb des Reproduktionstrakts bei einem Fall einer septischen Arthritis des Ellenbogengelenks nachgewiesen [Bachy *et al.* 2011]. Relativ neu weiß man, dass *Sneathia* spp. möglicherweise auch im Respirationstrakt vorkommen können. Abgesehen von einem Nachweis in einem Lungentransplantat [Bittinger *et al.* 2014] fand die Studie von Bacci *et al.* erstmals *Sneathia*-Phylotypen neben weiteren Phylotypen aus der Gattung *Leptotrichia* in Sputumproben von Patienten mit zystischer Fibrose [Bacci *et al.* 2016]. *Sneathia* spp. wurden – bislang ohne klinische Bedeutung – auch anhand von Gensequenzen in der überwiegenden Mehrzahl der Vaginalspülproben von Kühen und Schafen nachgewiesen [Machado *et al.* 2012, Swartz *et al.* 2014, Jeon *et al.* 2015]. Bei verschiedenen Makakenarten, die als Tiermodell für die humane vaginale HIV-Infektion dienen, dominierte die Gattung *Sneathia* sogar (neben *Fusobacterium*) – ein deutlicher Unterschied zu den normalerweise von Laktobazillen beherrschten humanen Vaginal-Mikrobiota [Spear *et al.* 2012, Hu *et al.* 2015].

2. SCHRIFTTUM

2.3.3 *Leptotrichia*

Leptotrichia spp. werden besonders nach einer Immunsuppression anderer Genese gelegentlich aus Blutkulturen septischer Patienten – auch im Zusammenhang mit dem Lemierre Syndrom – isoliert [Vemelen *et al.* 1996, Bhally *et al.* 2005, Hot *et al.* 2008]. Auch sind sie im Zusammenhang mit Endokarditiden, Pneumonien und einem Leberabszess aufgetreten [Duperval *et al.* 1984, Messiaen *et al.* 1996, Kawanami *et al.* 2009]. Klinische Erscheinungen sind ferner aus ihren natürlichen Habitaten resultierend, indem *L. hofstadii*, *L. shahii* und *L. wadei* sowie nicht auf Speziesebene differenzierte Phylotypen gelegentlich auch aus Patienten mit Gingivitis, Zahnbelägen, -verfärbungen und -stein isoliert werden konnten [Eribe *et al.* 2004, Li *et al.* 2016] und *L. wadei* aus Zungenbelägen zudem eine signifikante Korrelation zu Mundgeruch bei Kindern zugeschrieben wird [Ren *et al.* 2016b]. Im Gegensatz dazu kommen andere Autoren zu dem Schluss, dass *Leptotrichia*-Phylotypen sogar seltener mit Karies verknüpft sein können als entsprechende Kontrollen [Xu *et al.* 2014]. Wenige Mikrobiomstudien erfassten weiterhin die vorläufige Relevanz von *Leptotrichia*-Spezies auf Erkrankungen anderer Körperregionen. Speichelproben von Asthmapatienten enthalten demnach tendenziell mehr Vertreter der *Leptotrichiaceae* [Jung *et al.* 2016]. Interessanterweise fanden Saltykova *et al.* in humanen Gallensaft-Mikrobiomen von Lebererkrankten verglichen mit Kontrollen eine reichere Diversität bakterieller Gattungen inklusive *Leptotrichia*, was mit dem Untergang von Lebergewebe erklärt wird [Saltykova *et al.* 2016]. Eine auf die vormals zur Gattung *Leptotrichia* zugehörigen *Sneathia* spp. hin ausgerichtete PCR-Untersuchung untermauerte die Rolle von *Leptotrichial Sneathia* spp. auch als Urethritis-Erreger bei Männern [Eribe *et al.* 2004, Manhart *et al.* 2013], wenngleich in dieser Nische erheblich häufiger von *Sneathia* spp. auszugehen ist.

2.3.4 Spezies mit unklarer Zuordnung innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae*

2.3.4.1 Nicht überprüfbare Fallberichte bei Tieren und Menschen mit unklarer Ätiologie

Historisch sind auch bei Nutztieren Streptobazillen nachgewiesen worden. Allerdings wurden die jeweils beschriebenen Isolate nicht konserviert und stehen somit für eine Überprüfung nicht zur Verfügung. Durch den Biss eines Schweines soll es zu einem

2. SCHRIFTTUM

humanen Fall von RBF gekommen sein [Smallwood 1929]. Bei kleinen und großen Wiederkäuern wurden *Streptobacillus*-ähnliche Bakterien („*S. actinoides*“ [„*B. actinoides*“]) im Zusammenhang mit Pneumonien bei Kälbern detektiert [Smith 1918, Gourlay *et al.* 1982]. In den vergangenen Jahrzehnten sind jedoch keine weiteren dieser Erreger mehr nachgewiesen worden und stehen zur Überprüfung auch heute nicht mehr zur Verfügung. Allerdings wurden kürzlich bei Kühen und Schafen *Streptobacillus*- und *Sneathia*-Gensequenzen nachgewiesen, die das Vorkommen entsprechender Bakterien bestätigen könnten (s. Kap. 2.2.1 u. 2.2.2). Auch bedürfen Fallberichte, nach denen sich Menschen durch Bisse von Gerbilen oder Hörnchen mit *S. moniliformis* infiziert haben [Schottmüller 1914, Gray 1967, McMillan & Boulger 1968, Wilkins *et al.* 1988], der Überprüfung, denn die zum Teil sehr alten Arbeiten lassen in Bezug auf die beteiligten Erreger keine eindeutigen Schlüsse mehr zu. Untypische klinische Berichte betreffen ferner *S. moniliformis* im weiblichen Reproduktionstrakt [Faro *et al.* 1980, Pins *et al.* 1996]. So ist der Erreger auch mit einer Amnionitis und Abszessen im Genitaltrakt von Frauen beschrieben worden, wobei der Infektionsweg und der Zusammenhang zum Wildreservoir im Dunkeln bleiben. Mit steigender Verfügbarkeit von Genomsequenzen ändert sich bisweilen auch die Aussagekraft der Ergebnisse signifikant: So erwiesen sich bei heutiger Betrachtung die vermeintlichen *Streptobacillus*-Sequenzen aus traditionell fermentiertem Philippinischem Senf [Larcia *et al.* 2011] lediglich noch zu 90% ähnlich zu Vertretern der *Leptotrichiaceae*, wodurch sich keine weiteren Anhaltspunkte für ein Vorkommen von Streptobazillen in diesen Produkten ergeben. Andererseits postulierten Nolan *et al.* noch vor Kurzem, dass bis dato keine Phylotypen von *Streptobacillus* bekannt seien [Nolan *et al.* 2009]. Inzwischen zeigen die reichhaltigen Nachweise jedoch, dass auch zukünftig mit neuen Spezies in neuen Habitaten gerechnet werden muss.

2.3.4.2 „*Streptobacillus moniliformis*“ bei Hüpfmäusen in Australien

Im Jahr 1979 wurde im Zoo von Perth bei endemischen Hüpfmäusen ein Erreger isoliert, welcher zunächst als *S. moniliformis* angesprochen wurde [Hopkinson & Lloyd 1981]. Der Ausbruch verlief als septikämische, akut tödliche Infektionswelle, welcher sieben von 20 Individuen zum Opfer fielen. Während der Sektion zeigten die Tiere geschwollene Lebern mit Hepatozytennekrosen und Mikroabszessen als alleinigen histo-pathologischen Veränderungen. Die Autoren spekulierten, dass in die

2. SCHRIFTTUM

Käfige der Hüpfmäuse wiederholt eingedrungene wilde Ratten den Erreger durch Bisse übertragen haben könnten. Inzwischen wurden nahe verwandte Stämme dieses Erregers auch bei wilden Hausratten in Japan gefunden [Kimura *et al.* 2008], jedoch keine Verbindung zu jenem Ausbruch gezogen. Die Aufklärung der näheren Zusammenhänge erfolgte im Rahmen dieser Arbeit (s. 5.2.2, **6.3 u. 6.5**).

2.3.4.3 „*Streptobacillus moniliformis*“ bei Meerschweinchen

Bereits vor 75 Jahren wies Smith (1941) erstmals auf einen pyogenen Erreger bei Meerschweinchen hin, welcher nachfolgend ausschließlich bei dieser Tierart und hier assoziiert mit klinischer Erkrankung nachgewiesen wurde. Die Erreger wurden historisch als *S. moniliformis* diagnostiziert, wenngleich schon alleine deren obligat anaerobes Wachstum Zweifel an der Richtigkeit aufkommen ließ [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974, Fleming 1976, Bemis *et al.* 2016]. In der Regel erkrankten die Tiere einseitig, seltener beidseits an stark geschwollenen, eitrigen submaxillären und zervikalen Lymphknotenabszessen, teils unter Beteiligung von Speicheldrüsen [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974, Fleming 1976, Bemis *et al.* 2016]. In der Regel entleerten sich diese Abszesse, nur in einem kleineren Teil kam es zu spontanen Selbstheilungen [Smith 1941]. Bei Sektionen fanden sich dicke Abszesskapseln um einen dickflüssig-cremigen bis verkäsenden Inhalt. Ähnliche Fälle wurden auch bereits 1938 im Lister-Institut festgestellt [Klieneberger 1939, 1940].

Im Tierversuch erwiesen sich Meerschweinchen, Ratten, Mäuse, Kaninchen und die Chorioallantoismembran von Hühnerembryos empfänglich, wobei die Säuger alle mehr oder weniger protrahiert unter der typischen Abszessbildung erkrankten [Smith 1941]. Eine Virulenzänderung durch häufiges Passagieren des Erregers im Versuchstier oder in Kultur waren nicht feststellbar [Smith 1941]. Bei dem Versuch, den natürlichen Infektionsverlauf beim Meerschweinchen nachzustellen, führte die subkutane Infektion nach einer lokalen Pustel immer zu Halslymphknotenabszessen, unregelmäßig schien dies auch nach oraler Infektion aufzutreten [Smith 1941]. Nach Smith (1941) kam es ferner bei dieser Wirtsspezies nie zu einer Generalisation, und intranasale und intraperitoneale Applikationen blieben gänzlich ohne Effekt. Nach Smith (1941) bestehen beim Meerschweinchen weiterhin Hinweise für eine sterile Immunität. Lokal wie beim Meerschweinchen, jedoch deutlich protrahierter, verläuft auch die Infektion beim Kaninchen, es sei denn, der Erreger wird intratestikulär

2. SCHRIFTTUM

appliziert und verursacht dann eine akute eitrige Orchitis. Allein bei subkutan infizierten Mäusen kommt es dagegen nach einem regionären Infektionsverlauf rasch zur Generalisation mit Organabszessen, jedoch – im Gegensatz zur *S. moniliformis*-Infektion – so gut wie nie zu einer Arthritis [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974]. Intravenös oder -peritoneal inokulierte Mäuse zeigen nach drei bis acht Tagen nicht etwa eine Septikämie wie bei *S. moniliformis* [Aldred *et al.* 1974], sondern ein generalisiertes, an miliare Tuberkulose erinnerndes Krankheitsbild von multiplen Organabszessen [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974], nie jedoch Halslymphknotenabszesse [Smith 1941].

Aus der Literatur ist dennoch ein Fall eines generalisierten Verlaufs bei einem Versuchs-Meerschweinchen (negatives Kontrolltier aus einem Tierversuch ohne bekannten Hintergrund) mit granulomatöser Pneumonie bekannt geworden [Kirchner *et al.* 1992]. Das Tier zeigte in der Sektion grau verfärbte Lungen, welche in Formalin untergingen und oberflächlich erhabene, 4-5 mm messende, derbe Knoten aufwiesen. Aus den Knoten war kein eitriges Sekret zu gewinnen, und alle übrigen Organe, insbesondere auch die Halslymphknoten, zeigten keine Veränderungen [Kirchner *et al.* 1992]. Histo-pathologisch wurde eine hochgradige pyogranulomatös-nekrotisierende Bronchopneumonie mit multifokalen gemischtzelligen Infiltraten und einem neutrophilen Exsudat in den Luftwegen diagnostiziert. Die Bronchialepithelien waren in manchen Lokalisationen hyperplastisch, in anderen vollständig fehlend.

Smith (1941) mutmaßte, dass Meerschweinchen sich über Läsionen in der Maulhöhle infizieren, wenn sie mit von Ratten kontaminierter Nahrung gefüttert werden. Berichte, nach denen die klinischen Erscheinungen durch Bisse von symptomlosen Artgenossen ausgelöst wurden [Bemis *et al.* 2016], könnten auf eine ebenfalls latente Besiedlung der Maulhöhle beim Meerschwein (*Cavia porcellus*) im Rahmen von Rangordnungskämpfen hindeuten. Systematische Untersuchungen hierzu fehlen derzeit. Interessanterweise erwiesen sich Meerschweinchen allerdings als resistent gegenüber einem von einer Ratte isolierten *S. moniliformis*-Stamm [Boot *et al.* 2007]. Weitere Informationen zu diesem Erreger finden sich in den Kapiteln 2.5.5 und 5.2.4 (s. **6.7**).

2. SCHRIFTTUM

2.3.4.4 „*Streptobacillus moniliformis*“ bei Atlantischen Lachsen

Eine unbekannte bakterielle Infektionskrankheit erfasste 1992 und 1993 Atlantische Lachse in einer irischen Aquakultur und führte zu hohen Verlusten [Palmer *et al.* 1994]. Die betroffenen Fische zeigten multifokale Gewebnekrosen, besonders in den Endothelien der Nieren. Aus diesen Läsionen waren teils intrazellulär wachsende Bakterien anzüchtbar, welche die Koch'schen Postulate erfüllten und aufgrund gewisser Ähnlichkeiten sowie gleicher Kulturbedürfnisse vorläufig in die weitere Verwandtschaft von *S. moniliformis* gestellt wurden [Maher *et al.* 1995]. Bei den parenteralen Infektionsversuchen ließ sich allerdings keine Ausbreitung der Infektion auf naive Fische erzielen [Palmer *et al.* 1994]. Die genaue Quelle der Infektion ist bis heute unbekannt, und die Erkrankung ist seitdem auch nicht wieder bei Lachsen in Erscheinung getreten. Kulturelle und morphologische Details finden sich in den Kapiteln 2.5.5 und 5.2.5 (s. **6.8**).

2.4 Epidemiologische Aspekte zu Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae*

Bei insgesamt spärlicher Datenlage können einzelne Vertreter der *Leptotrichiaceae* im natürlichen Reservoir wie *Sneathia* spp. im Genitaltrakt und *Leptotrichia* spp. in der Mundhöhle von Menschen regelmäßig nachgewiesen werden, wenngleich sich die Zusammensetzung der bakteriellen Komponenten in Abhängigkeit von Zeit und Lokalisation ändert. Dies scheint durch übergeordnete Einflüsse wie Ernährung, Sexualzyklus und das Vorhandensein weiterer pathogener Mikroorganismen mit beeinflusst zu sein [Wertz *et al.* 2008, Hullar *et al.* 2015, Guerrero-Preston *et al.* 2016, Knudsen *et al.* 2016].

Für den weltweit verbreiteten Zoonoseerreger *S. moniliformis* stellt sich die Frage nach der Durchseuchung von Tierbeständen am dringendsten. Die Auswertung der zum Teil recht alten Daten zur Prävalenz von RBF-Erregern in Ratten wird dadurch erschwert, dass nicht immer ganz genau zwischen den Erregern (*Sp. minus* oder *S. moniliformis*) unterschieden wird und diese zum Teil an sehr kleinen Tierkollektiven erhoben wurden [Anderson *et al.* 1983, Washburn 2000]. Dennoch konnten die immer wieder zitierten Angaben, denen zufolge 50-100% wilder Ratten asymptomatisch mit *S. moniliformis* infiziert sind [Ditchfield *et al.* 1961, Washburn 1995, Elliott 2007], auch in kürzer zurückliegender Vergangenheit bestätigt werden. Prävalenzen von 58% und 92% konnten für wilde japanische Ratten (*R. rattus* und *R.*

2. SCHRIFTTUM

norvegicus) mittels 16S rRNS-basierter PCR bestätigt werden [Kimura *et al.* 2008], auch wenn die gleichzeitig durchgeführte Kultur nur sieben Isolate aus der Abklärung von mehr als 1000 verdächtigen Kolonien ergab. Ratten aus Labortierzuchten sind jährlich mittels einer nicht näher spezifizierten PCR zu untersuchen und gelten dann als spezifiziert pathogenfrei (SPF) in Bezug auf *S. moniliformis* [Mähler *et al.* 2014]. Allerdings kann *S. moniliformis* nach versehentlicher Einschleppung hier große wirtschaftliche Schäden anrichten [Koopman *et al.* 1991, Wullenweber *et al.* 1992, Boot *et al.* 2006]. Im Gegensatz dazu sind Ratten aus unkontrollierten Zuchten regelmäßig mit *S. moniliformis* kolonisiert (Manuskript in Bearbeitung). Dies ist vor dem Hintergrund eines disponierten Personenkreises für RBF, zu dem klassischer Weise Kanalarbeiter, Landwirte und sozioökonomisch benachteiligte Personen gerechnet werden [Shvartsblat *et al.* 2004, Elliott 2007, Kondruweit *et al.* 2007, Gaastra *et al.* 2009, Regnath *et al.* 2015], relevant. Aber auch Tierärzte und Personal aus Tierarztpraxen, Tierpfleger und Personen, welche regelmäßig mit Ratten als Haus- oder Futtertiere umgehen, sind hier besonders disponiert und in der Vergangenheit bereits infiziert worden [Irvine & Wills 2006]. Über die genaue Prävalenz der *S. moniliformis*-Infektion beim Menschen sowie über die minimale Infektionsdosis ist nichts bekannt. Die Infektion wird aber in den letzten Jahren gelegentlich als gehäuft auftretende Infektionskrankheit („*emerging infectious disease*“), bezeichnet, weil eine Reihe von Risikofaktoren wie insbesondere der dichte und sorglose Umgang mit Ratten als Heimtiere sowie sozioökonomische Aspekte wie zunehmende Armut und Überbevölkerung hinzugekommen sind [Graves & Janda 2001, Irvine & Wills 2006]. Mindestens 50% der RBF-Fälle beim Menschen werden bei Kindern, welche jünger als neun Jahre sind, diagnostiziert [Washburn 2000]. Dagegen schätzt man, dass es pro Jahr etwa 40.000 Rattenbisse bei Menschen gibt [Anonym 1980] und dass ungefähr 1-10% zu RBF und anderen Infektionen führen [Ordog *et al.* 1985, Hagelskjaer *et al.* 1998]. Auch liegen Zahlen vor, wonach etwa 2% der gehaltenen Haustiere Nager sind [Conti *et al.* 1995]. Aktuellere Zahlen suggerieren mitunter ein noch höheres Gefährdungspotential: In den USA beträgt der Anteil der Tierbisse als Ursache des Besuchs einer medizinischen Notaufnahme immerhin 1% [Ellis & Ellis 2014]. Aus Deutschland liegen Zahlen vor, die zwischen 30.000-50.000 jährliche Bissverletzungen bei Menschen postulieren [Rothe *et al.* 2015]. Hunde- und Katzenbisse dominieren weltweit, auf Bisse von Menschen und übrigen Tieren wie Ratten, Hamster und

2. SCHRIFTTUM

Kaninchen entfallen weniger als 10%; insgesamt sind 59% der Opfer Kinder und Jugendliche. Das Infektionsrisiko nach einem Biss ist mit 10-20% angegeben, wobei 30-60% polybakterielle Mischinfektionen mit aeroben und anaeroben Mikrobiota darstellen [Rothe *et al.* 2015]. Einer Studie zufolge lebten 2013 in deutschen Haushalten 11,89 Millionen (Mio.) Hunde, 12,68 Mio. Katzen und 4,35 Mio. Nager als Haus- und Heimtiere (zitiert in [Rothe *et al.* 2015]). Etwas genauere Statistiken für Rattenbisse bei Menschen liegen – jeweils bezogen auf die Anzahl der wegen eines Tierbisses behandelten Menschen – für eine einjährige Periode aus der Provinz Barcelona, Spanien bei 5,3%, für eine zwölfjährige Periode aus Nigeria bei 3,6% (lediglich Kinder und Jugendliche), für eine vierjährige Periode aus New York City, USA bei 6,6% für Ratten und Mäuse und für eine dreijährige Studie aus Rafsandjan, Iran bei 3% („andere Tierbisse inklusive Ratten“) [Knobel Freud *et al.* 1997, Sheikholeslami *et al.* 2009, Osaghae 2011, Bregman & Slavinski 2012]. Einer argentinischen Studie zufolge wurden in der Region Buenos Aires zwischen 2002 und 2008 insgesamt 62 Fälle von Rattenbissen registriert [Seijo *et al.* 2009]. Die Opfer wurden überwiegend in die Beine und das Gesicht gebissen, und vier Patienten entwickelten im Anschluss klinische Symptome von RBF.

Somit scheint es sich auf den ersten Blick bei RBF trotz der weiten Verbreitung in Ratten um eine Zoonose mit geringer Relevanz für den Menschen zu handeln. Andererseits wird gerade RBF immer wieder als „unterdiagnostiziert“ („*under-reported*“, „*under-diagnosed*“) beschrieben [Gaastra *et al.* 2009], sodass die wahre Prävalenz vermutlich deutlich höher liegt. Dies liegt zum einen daran, dass es sich weltweit weder im human- noch im veterinärmedizinischen Bereich um eine meldepflichtige Infektion handelt. Auch steht RBF in der Wahrnehmung oder sogar Kenntnis von Ärzten und Tierärzten an untergeordneter Stelle wie eine Vielzahl von „das Bewusstsein schärfenden“ Fallberichten untermauern [Dworkin *et al.* 2010, Banerjee *et al.* 2011, Madhubashini *et al.* 2013, Fenn *et al.* 2014, Okamori *et al.* 2015, Regnath *et al.* 2015]. Dies wird noch dadurch kompliziert, dass der unmittelbare Rattenbiss oder -kontakt oft nicht wahrgenommen wurde, nicht erinnerlich ist oder überhaupt nicht stattgefunden haben muss. Auch wenn ein Infektionsverlauf mit lediglich unspezifischen grippeähnlichen Symptomen beobachtet wird, ist durch unterbliebenen Arztbesuch oder ungezielte Breitspektrum-Antibiose mit einem Übersehen der Infektion zu rechnen. Sogar bei gezielter Erreger-Diagnostik ergeben sich selbst in Ländern mit guter medizinischer Versorgung

2. SCHRIFTTUM

weitere Hindernisse wie die fehlende Verfügbarkeit kommerzieller serologischer Tests, wenige spezialisierte Labore und ein ausgesprochen empfindlicher und anspruchsvoll wachsender Erreger, welcher bereits durch Zusätze in kommerziellen Blutkulturen gehemmt [Lambe *et al.* 1973] oder durch die oft ebenfalls vorhandenen residenten Mikrobiota maskiert wird. Manchmal gelingt die Anzucht in Blutkultur auch nicht auf Anhieb [Costa-Pinto *et al.* 2016, Mahmoodi *et al.* 2016]. Dabei wird unbehandeltem RBF eine mit 7-13% vergleichbar hohe Letalitätsrate wie Brucellose bescheinigt, welche bei chronischen, endokarditischen Verläufen auf 51% ansteigen kann [Rupp 1992, Wullenweber 1995, Hagelskjaer *et al.* 1998, Graves & Janda 2001, Washburn 2005]. Bei HF haben die bislang bekannt gewordenen Fälle mit teilweise mehr als 200 Personen gezeigt, dass es anfangs im Grunde nie zu einer Assoziation mit einer durch Rattenurin verursachten Lebensmittelinfektion kommt, hier aber durch die unter Umständen hohe Zahl an Betroffenen die Chance auf einen Erregernachweis steigt [Parker & Hudson 1926, Place *et al.* 1926, 1934, Sprecher & Copeland 1947, Lambe *et al.* 1973, Shanson *et al.* 1983, McEvoy *et al.* 1987].

Zur Häufigkeitsverteilung der übrigen Vertreter der *Leptotrichiaceae* (außer *S. moniliformis*) liegen keine Informationen vor.

2.5 Morphologie, kulturelle Wachstumsbedingungen und phänotypische Eigenschaften

2.5.1 *Streptobacillus*

Mikroskopische Präparate gefärbter *S. moniliformis* und *S. hongkongensis*-Isolate zeigen in Abhängigkeit vom Alter der Kultur Gram-negative, pleomorphe, fusiforme, filamentöse, sporenlose, unbekapselte, säuresensible Stäbchenbakterien, welche in Haufen und Ketten angeordnet sind und – besonders in älteren Kulturen – bisweilen irreguläre, bulbäre Auftreibungen der Bakterienzellen zeigen [Gaastra *et al.* 2009]. Diese an einen Kugelstrang oder eine Perlenkette erinnernde Gestalt hat zu der lateinischen Übersetzung „*moniliformis*“ im Speziesepitheton geführt. Die normalerweise 0,1-0,7 x 1-5 µm messenden Bakterien neigen zur Pleomorphie und im Gegensatz zu Abklatschfärbungen direkt von der Infektionsstelle können Färbungen von Kulturmaterial bis zu 150 µm lange, unverzweigte Filamente aufweisen (Abb. 8; [Gaastra *et al.* 2009]). Sehr selten gelang der direkte

2. SCHRIFTTUM

histologische Nachweis des Erregers im bioptierten Gewebe [Ojukwu & Christy 2002, Miraflor *et al.* 2015].

Vertreter der Gattung sind anspruchsvoll wachsende Bakterien, welche einen Zusatz von Serum, Blut oder Ascitesflüssigkeit zum Kulturmedium und eine feuchte Umgebungsatmosphäre benötigen [Lambe *et al.* 1973, Savage 1984]. Auf festen Nährmedien wachsen Streptobazillen als kleine, weißlich-gräuliche, tropfenartige bis leicht konvexe Kolonien, welche nach 48-72 h einen Durchmesser von 0.1-0.4 mm erreichen [Gaastra *et al.* 2009]. Einzelne Kolonien wachsen spontan zellwandlos als so genannte L-Formen [Dienes 1947, Elliott 2007], welche auch durch 2 IU/ml Penicillinzusatz zum Medium induziert werden können [Freundt 1956b].

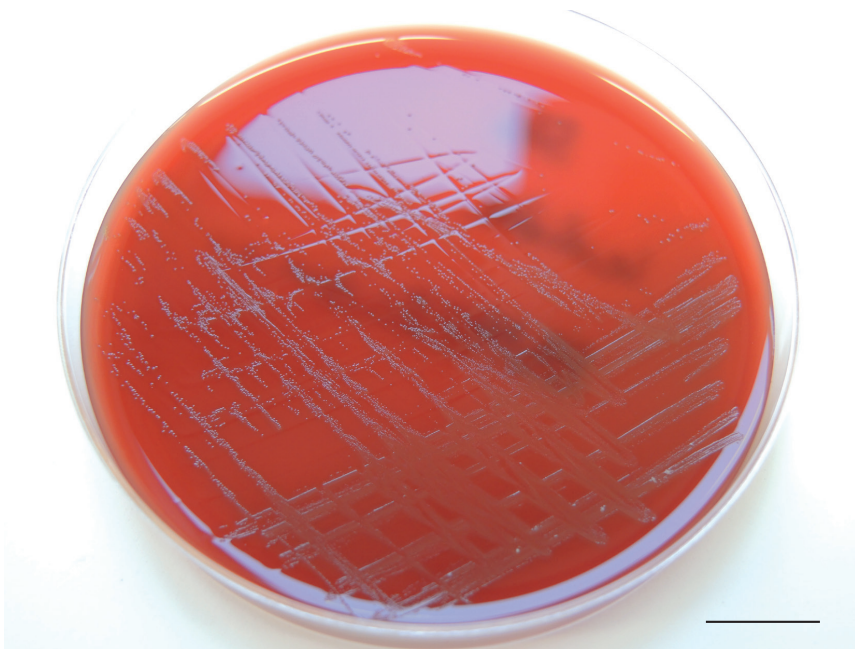


Abbildung 8: Koloniemorphologie von *Streptobacillus moniliformis* nach 72-stündiger mikroaerophiler Inkubation auf Columbia-Schafblutagar. Maßstab: 10 mm.

Die Ausbildung von L-Formen wurde *in vivo* als Folge der spezifischen Immunabwehr angesehen, aus welcher einerseits deren vermeintliche Apathogenität abgeleitet wurde [Freundt 1956], andererseits begründete sie klinische Relapse durch natürliche Penicillinresistenz [Domingue & Woody 1997]. Allerdings gibt es auch Belege für L-

2. SCHRIFTTUM

Form-Isolierungen aus pathologischen Prozessen [Dolman *et al.* 1951]. Werden die L-Formen dagegen subkultiviert, revertieren sie wieder zu bazillären Formen (mit Zellwand), und auch biochemisch unterscheiden sich beide Formen nicht [Cohen *et al.* 1968, Sens *et al.* 1989, Elliott 2007]. Das Gros der Isolate wächst ohne Hämolyse, einige Stämme mit vergrünend (α -), später bisweilen vollständig (β -) hämolysierenden Kolonien sind aber ebenfalls beschrieben worden [Ditchfield *et al.* 1961, Wullenweber *et al.* 1992].

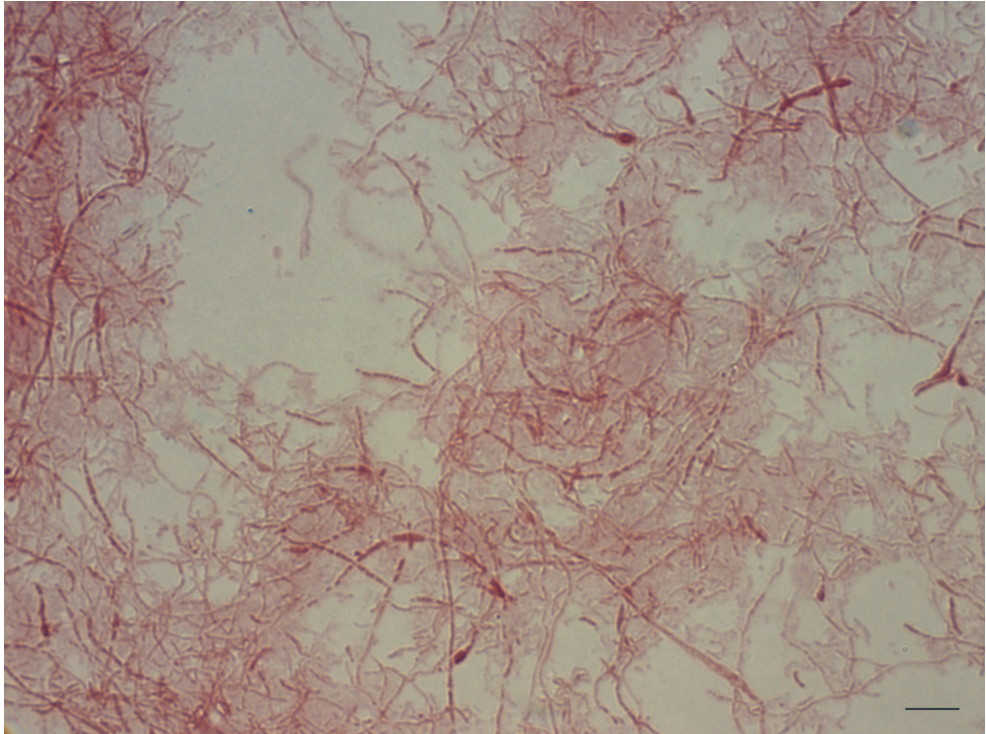


Abbildung 9: Gram-negative, pleomorphe Stäbchenbakterien einer sechs Tage alten Kultur von *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T. Die Bakterienzellen sind in Ketten und Haufen angeordnet und einzelne fallen durch unregelmäßige seitliche Auftreibungen auf, welche in Analogie an das lateinische Speziesepitheton „*moniliformis*“ einer Perlenkette ähnlich sehen. Die 0,1-0,7 x 1-5 μm messenden Bakterien bilden bis zu 150 μm unverzweigte Filamente. Ölimmersion, 1000-fache Vergrößerung. Maßstab: 5 μm .

Die überwiegende Mehrzahl der Isolate ist obligat kapnophil oder mikroaerophil, lediglich für *S. hongkongensis* wurde auch aerobes Wachstum beschrieben

2. SCHRIFTTUM

[Woo *et al.* 2014]. In Flüssigkulturen mit obligatem Serumzusatz bildet sich keine Trübung, sondern ein flockiger Bodensatz aus, welcher an Brotkrumen oder Baumwollknäuel erinnert ([Elliott 2007, Gaastra *et al.* 2009]; „*bread crumb*“- oder „*cotton ball*“-like).

Biochemische Tests sind aufgrund des spärlichen Wachstums von Streptobazillen nicht einfach zu standardisieren. Einen guten Überblick über spezifische Reaktionen geben beispielsweise [Edwards & Finch 1986, Wullenweber *et al.* 1990, Koopman *et al.* 1991, Wullenweber *et al.* 1992, Wullenweber 1995, Elliott 2007, Kimura *et al.* 2008, Gaastra *et al.* 2009], wobei insbesondere bei konventionellen Reaktionen auf den Zusatz von Serum zur Agarbase und ausreichend lange Inkubationszeiten in kapnophiler Atmosphäre zu achten ist. Die Testergebnisse sind aber oft nur schwer standardisierbar und selbst Wiederholungsmessungen desselben Isolates können inkongruente Ergebnisse produzieren [Hofmann 1994]. Einige Autoren empfehlen kommerzielle biochemische Systeme wie das API-E-System (bioMérieux, Nürtingen), ohne auf die besonderen Wachstumsbedingungen einzugehen [Kimura *et al.* 2008], aber das führt zu falschen Interpretationen [Wullenweber 1995]. Besser geeignet sind kommerzielle Systeme mit Endpunktmessung wie das API-Zym-System oder der Vitek2-compact mit Kartenprofil NH (für *Neisseria* und *Haemophilus* spp., beide bioMérieux) [Edwards & Finch 1986, Wullenweber *et al.* 1992, Hayashimoto *et al.* 2008, Woo *et al.* 2014]. Diese Tests benötigen keine weitere Kultivierung vitaler Bakterien, sodass die Ergebnisse besser standardisiert und vergleichbar zwischen Laboratorien sind. Positive Reaktionen fanden sich für *S. moniliformis* für alkalische Phosphatase, Butyrat-Esterase, Caprylate-Esterase, Myristat-Lipase, Leuzin-Arylamidase, Chymotrypsin, saure Phosphatase und Glukuronidase [Hayashimoto *et al.* 2008]. Negativ fallen die Reaktionen für Zytochromoxidase, Katalase, Urease, Nitrat, Voges-Proskauer und Indol aus [Savage 1984, De *et al.* 2010]. Andere Reaktionen können variabel ausfallen. Auch die regelmäßig für chemotaxonomische Fragestellungen untersuchten Fettsäuremuster von Streptobazillen wurden untersucht. Mittels Gaschromatografie, teilweise auch gekoppelt oder alleinig durch Massenspektrometrie ließen sich für *S. moniliformis* Tetradekansäure (C_{14:0}), Palmitinsäure (C_{16:0}), Oktadekansäure mit Linolsäure (C_{18:2}), Ölsäure (C_{18:1}) und Stearinsäure (C_{18:0}) als Hauptfettsäurekomponenten der Zellwand nachweisen [Rowbotham 1983, Rygg & Bruun 1992] und – unter Berücksichtigung typischen Wachstums – auch diagnostisch verwenden [Razin & Boschwitz 1968, Rowbotham

2. SCHRIFTTUM

1983, Edwards & Finch 1986, Anglada *et al.* 1990, Rygg & Bruun 1992, Pins *et al.* 1996, Torres *et al.* 2003].

Polare Lipide sind bislang nur unzureichend für die Gattung *Streptobacillus* untersucht worden. Ein gänzlichliches Fehlen von Quinonen sowie ein spezifisches Muster an Polyaminen, welches sich wiederum von solchen der α -, β - und γ -Proteobacteria unterschied, wurde postuliert [Hofmann 1994, Wullenweber 1995]. Auch eine mit dem Ziel der Spezies- sowie Isolatdifferenzierung durchgeführte Proteinmusteranalyse von Ganzzellpräparationen zeigte ein zufolge der Autoren speziesspezifisches Muster von 40-50 Proteinen im Bereich 18-100 kDa [Costas & Owen 1987]. Darunter fanden sich vier Hauptproteinbanden in der Region 60-67 kDa, welche 20-30% des Gesamtproteins darstellten [Costas & Owen 1987]. Mit dieser Methodik fanden die Autoren ferner Hinweise dafür, dass sich Stämme geografisch, nach Wirtsspezies (human vs. murin) und zudem HF-Stämme von RBF-Stämmen unterscheiden lassen [Costas & Owen 1987]. Insbesondere letztere Aussage konnte von anderen Autoren jedoch nicht bestätigt werden [Edwards & Finch 1986, Boot *et al.* 1993].

2.5.2 *Sneathia*

Bei beiden *Sneathia* spp. handelt es sich um Gram-negative, sporenlose, unbewegliche Stäbchenbakterien, welche im Fall von „*Sn. amnii*“ aus Ketten (>10 μ m) einzelner 1-2 μ m langer Stäbchen bestehen [Harwich *et al.* 2012]. Ebenfalls vorkommende kokkoide Zellen, welche besonders in älteren Kulturen häufig sind, werden mit L-Formen synonymisiert [Harwich *et al.* 2012]. Sowohl *Sn. sanguinegens* als auch „*Sn. amnii*“ sind schwierig zu kultivierende Mikroorganismen mit hohen Nährmedienansprüchen. Eine Kultur von *Sn. sanguinegens* kann unter strikt anaeroben Bedingungen auf vorreduzierten Nährböden mit Serumzusatz wie bspw. Kochblutagar bei 37°C nach 48-72 h Inkubation gelingen. Obwohl es unter identischen Bedingungen auch einige Kulturen von „*Sn. amnii*“ bzw. deren Juniorsynonym „*L. amnionii*“ gegeben hat, ließ sich die Mehrzahl der Stämme nicht weiter am Leben erhalten, und es ist kein Typstamm für diese Art designiert. Harwich *et al.* (2012) zufolge wächst „*Sn. amnii*“, wenngleich schlechter, auch begrenzt aerotolerant und ohne Blutzusatz, auf bluthaltigen Nährböden jedoch mit α -

2. SCHRIFTTUM

Hämolyse. Nach Angaben der Culture Collection, University of Göteborg, Sweden (CCUG) sind die Hauptfettsäurekomponenten für *Sn. sanguinegens* und „*Sn. amnii*“ Oktadekansäure mit Linolsäure (C_{18:2}), Palmitinsäure (C_{16:0}), Ölsäure (C_{18:1}) und Stearinsäure (C_{18:0}) [Anonym 2006]. Genomuntersuchungen zufolge kann „*Sn. amnii*“ aufgrund ihrer Enzymausstattung Laktat bilden und Glukose, Maltose, Glykogen und Glukosamin, nicht jedoch Stärke, Muzin und Mannose verstoffwechseln [Harwich *et al.* 2012]. Dies konnte – neben dem Unvermögen, auch Galaktose, Saccharose oder Fruktose abzubauen – in Fermentationstests bestätigt werden.

2.5.3 *Sebaldella*

Die insgesamt spärliche Literaturlage bezieht sich maßgeblich auf den Typstamm von *Se. termitidis*. Dabei handelt es sich um Gram-negative, sporenlose, unbewegliche Stäbchenbakterien von 0,3-0,5 x 2-12 µm Länge, welche zentrale Auftreibungen aufweisen können. Die Kolonien auf festen Nährmedien sind nach 24-48 h rund, 1-2 mm im Durchmesser, unpigmentiert weißlich transparent bis opak und nicht hämolysierend. Die Bakterien wachsen ausschließlich anaerob auf Nährmedien mit Serum- oder Blutzusatz [Collins & Shah 1986]. Die Art bildet aus Glukose, Fruktose, Maltose, Mannitol, Mannose, Rhamnose, Saccharose, Trehalose und Xylose, nicht jedoch aus Arabinose, Melizitose oder Stärke vor allem Essig-, Milch- und Ameisensäure. Sie ist ferner in der Regel H₂S-positiv und baut Harnsäure zu CO₂ ab, ist jedoch negativ für Gelatineverflüssigung, Urease, Chitinase, Nitrat und Indol. Das Fettsäuremuster besteht vornehmlich aus nicht-hydroxylierten und 3-hydroxylierten langkettigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, von welchen Hexadekan- und Oktadekansäure dominieren. Menaquinon kommt nicht vor [Collins & Shah 1986].

2.5.4 *Leptotrichia*

Bei den Vertretern der Gattung *Leptotrichia* handelt es sich um Gram-negative, sporenlose, unbewegliche, bevorzugt anaerob wachsende Stäbchenbakterien von fusiformer Gestalt, von welchen speziesspezifische Größenunterschiede im Bereich 0,3-0,9 x 2-17,5 µm auftreten [Eribe *et al.* 2004]. Die bislang beschriebenen Arten

2. SCHRIFTTUM

benötigten für ihr Wachstum hochwertige Nährmedien wie Columbia- und Hirn-Herz-Agar (BHI) bei 37°C [Eribe *et al.* 2004, Woo *et al.* 2010]. Die Spezies *L. goodfellowii*, *L. hofstadii* und *L. wadei* sind β -hämolyzierend. Im Gegensatz zu anderen Gattungen der *Leptotrichiaceae* sind die *Leptotrichia* spp. Katalase- und Äskulin-positiv. Die Hauptfettsäureanteile bestehen aus Ölsäurederivat (18:1), Palmitinsäure (16:0), Tetradekansäure (14:0) sowie einer 3-hydroxylierten 14:0 oder 15:0 Fettsäure [Eribe *et al.* 2004], wobei sich einzelne Arten sowohl hinsichtlich ihrer Fettsäuremuster als auch biochemisch differenzieren lassen [Eribe *et al.* 2004].

2.5.5 *Leptotrichiaceae*-Spezies mit unklarer Zuordnung

2.5.5.1 „*Streptobacillus moniliformis*“ bei Meerschweinchen

Die *S. moniliformis*-ähnlichen Erreger von Meerschweinchen fallen durch ihr obligat anaerobes Wachstum auf [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974, Fleming 1976, Bemis *et al.* 2016]. Fakultativ aerobes Verhalten wurde nach wiederholter Passage von Smith und ausschließlich bei Primärisolation auch von Aldred *et al.* und Kirchner *et al.* postuliert [Aldred *et al.* 1974, Kirchner *et al.* 1992]. Manche Autoren empfehlen den Zusatz von 1% neutralisiertem Leberverdau zum Nährmedium [Fleming 1976]. Aldred *et al.* (1974) heben die fehlende biochemische Aktivität, Zuckerfermentation, Urease- und Indolreaktion hervor [Aldred *et al.* 1974]. Zudem gelang eine Präzipitation mit einem Serum gegen ein *S. moniliformis*-Isolat einer Ratte. Eine detaillierte Beschreibung der Zell- und Kulturmorphologie findet sich bei [Smith 1941, Kirchner *et al.* 1992] in enger Analogie zu derjenigen von *S. moniliformis* (s. Kap. 2.5.1). Es handelt sich um einen extrem pleomorphen Organismus, in flüssigen Medien bildet sich ebenfalls ein flockiger Belag ohne Trübung des Mediums. Auf festen Nährmedien mit obligatem Serumzusatz ließen sich zwei unterschiedliche Kolonienmorphen differenzieren: 1-2 mm große, entrundete, flache, granuliert, gräuliche bis leicht bräunliche Kolonien (mit pleomorphen Stäbchenbakterien) und winzige, nur stecknadelspitzgroße Kolonien (nur bazilläre Stäbchenbakterien), welche sich beide nicht ‚morphenrein‘ vereinzeln ließen [Smith 1941]. Im Gegensatz zu *S. moniliformis* war der Erreger nicht durch bakteriendichte Filter von 0,8 μm filtrierbar [Smith 1941].

2. SCHRIFTTUM

2.5.5.2 „*Streptobacillus moniliformis*“ bei Atlantischen Lachsen

Die Assoziation des *Streptobacillus*-ähnlichen Erregers von Atlantischen Lachsen zu *S. moniliformis* begründete sich hauptsächlich in der zur damaligen Zeit höchsten 16S rRNS-Gen-Ähnlichkeit (90%). Darüber hinaus fanden sich etliche Parallelen in Form von identischen kulturellen und morphologischen Eigenschaften wie dem typischen flockigen Wachstum in Flüssigmedien, der anspruchsvollen Kulturbedingungen mit obligater Abhängigkeit eines Blut- oder Serumzusatzes zum Nährmedium, dem Vorhandensein einzelner Kolonien mit L-Formen auf festen Medien und der typischen mikroskopischen Pleomorphie Gram-negativer Stäbchenbakterien [Palmer *et al.* 1994, Maher *et al.* 1995].

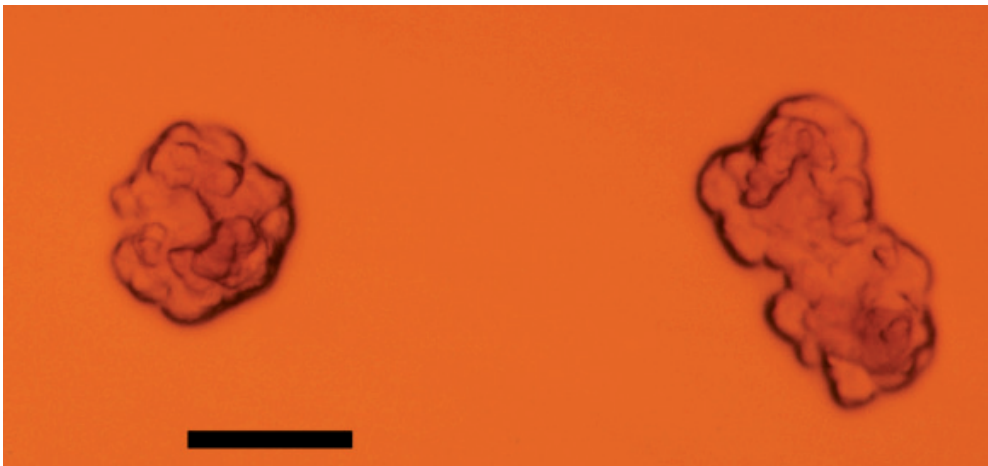


Abbildung 10: Ältere Kolonien von *Oceanivirga salmonicida* zeigen ein Backenzahn-ähnliches Wachstum (Aufnahme: R. PALMER). Maßstab = 0,25 mm.

Allerdings ließen sich auch deutliche Unterschiede wie etwa eine mit nur 15-22°C untypisch niedrige Optimaltemperatur (nicht bei 37°C) und ein bevorzugt halophiles Wachstum bei 1-2% Kochsalzzusatz zum Medium erkennen. Auch gelang die aerobe Kultur des Erregers nach 4-14-tägiger Inkubation, wenngleich mikroaerophile und anaerobe Kulturbedingungen zu größeren Kolonien führten. Die Autoren schlossen daraus auf die Existenz eines nahe verwandten Taxons aus der Verwandtschaft von

2. SCHRIFTTUM

S. moniliformis [Palmer *et al.* 1994, Maher *et al.* 1995]. Die Autoren charakterisierten den Erreger weiterhin an folgenden Eigenschaften: Es wird eine zarte α - β -Hämolyse auf Pferdeblutagar nach 14 Tagen ausgebildet. Die Kolonien sind klein, leicht opak und von wachsartig-trockener Konsistenz, welche je nach Inkubationsatmosphäre 0,1-0,6 mm groß werden. Ältere Kolonien zeigen ein Backenzahn-ähnliches Wachstum (s. Abb. 10). Die Mikroskopie der Bakterienzellen ergaben pleomorphe, fusiforme bis filamentöse, sporenlose, unbekapselte, schwach säurefeste Stäbchenbakterien mit Abmessungen von circa 0,40 μm (Breite) und 0,60 μm (Länge) von Festnährmedien und 0,40 μm Breite und bis zu 5 μm Länge in Flüssigkultur, welche in Ketten und Haufen angeordnet waren [Palmer *et al.* 1994].

Elektronenmikroskopisch stellten sich die Erreger in 470 nm Schnitten der Milz und Niere verendeter Lachse sowohl intra- als auch extrazellulär als typische Gram-negative Bakterien mit dreifacher Zellmembran dar [Palmer *et al.* 1994]. Besondere Häufungen wiesen Gewebsmakrophagen und die Endothelien der Glomerula auf, die dicht gepackte Bakterien innerhalb einer zytoplasmatischen Vakuole enthielten (Abb. 11; [Palmer *et al.* 1994]). Dabei unterschied sich der Erreger von *Leptotrichia* spp. dergestalt, dass keine Membranfaltungen oder schuppenähnlichen Vorstülpungen der Zellmembran zu beobachten waren [Smith *et al.* 1994, Maher *et al.* 1995, Eribe *et al.* 2004]. Ein repräsentatives Isolat zeigte die folgenden positiven biochemischen Reaktionen: Arginin-Dihydrolase, Lipase, Pyrrolidonyl-Arylamidase, Glukose, Fruktose und Maltose. Die Fettsäureprofile sind $\text{C}_{16:0}$, $\text{C}_{18:0}$, $\text{C}_{18:1}\omega 9\text{c}$ und $\text{C}_{18:2}\omega 6,9\text{c}/_{18:0}$ ANTE [Palmer *et al.* 1994].

2. SCHRIFTTUM

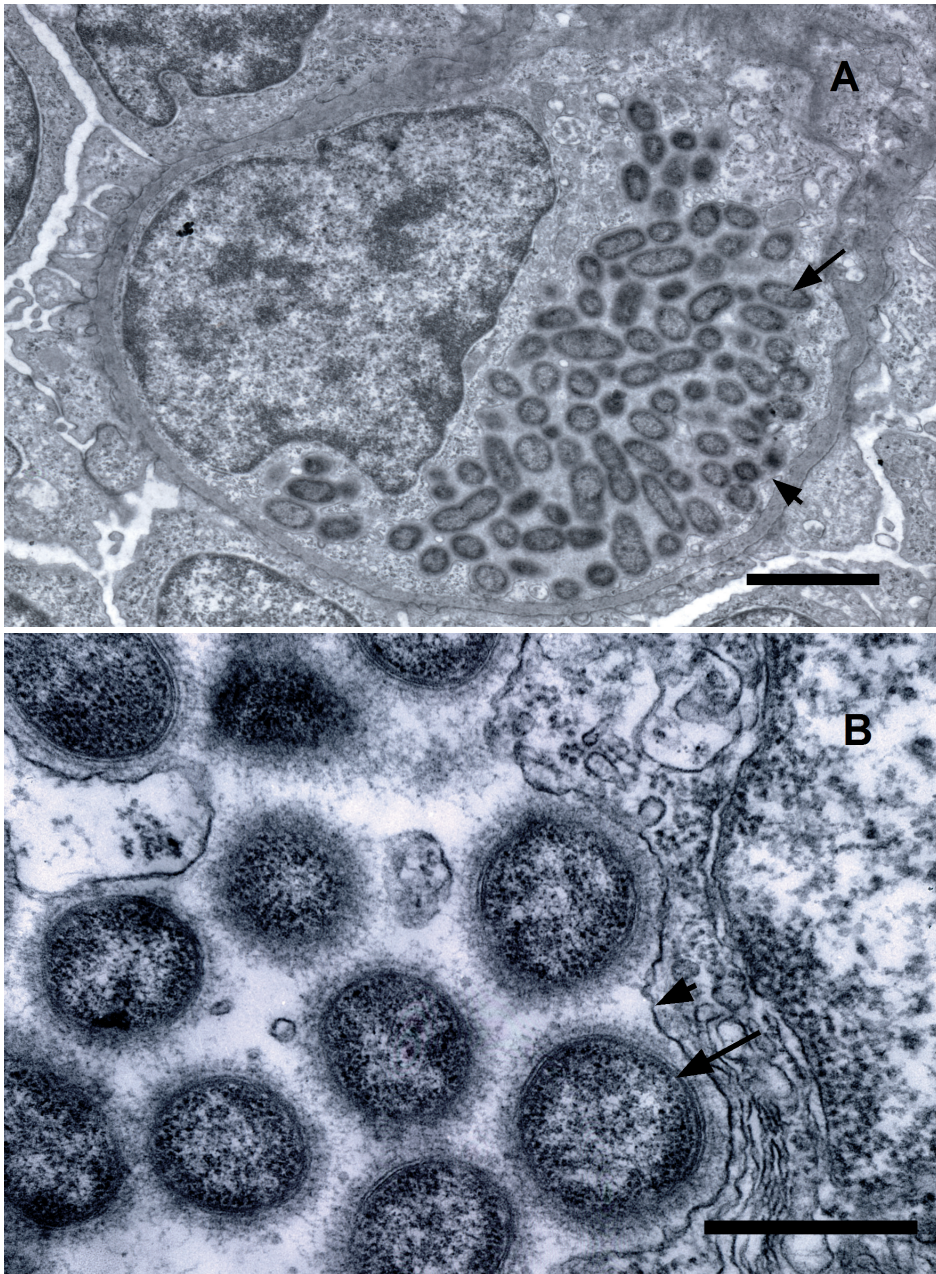


Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierengewebe eines mit *Oceanivirga (O.) salmonicida* infizierten Atlantischen Lachses (Aufnahmen: R. PALMER). Große Pfeile zeigen intrazelluläre *O. salmonicida*. Kleine Pfeile zeigen auf die Wirtszellmembran einer zytoplasmatischen, erregerrhaltigen Vakuole. A. Maßstab = 2,0 μm . B. Maßstab = 0,5 μm .

2. SCHRIFTTUM

2.6 Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung und Chemotherapie

2.6.1 *Streptobacillus*

Empfindlichkeitsprüfungen von klinischen Isolaten von *S. moniliformis* sind mit unterschiedlichen Methoden generiert worden, am weitesten verbreitet waren Testungen mittels Agardiffusionstest [Roughgarden 1965, Wullenweber *et al.* 1990, Rygg & Bruun 1992] oder Epsilometer-Test [Woo *et al.* 2014], gefolgt von Bestimmungen der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) im Agar-Dilutionstest [Edwards & Finch 1986] oder mittels einer Umschlagspunktmessung (*breakpoint*) im Mikrobouillondilutionstest [Hofmann 1994, Wullenweber 1995]. Nur wenige Messungen bezogen sich auf einen (damals etablierten) Standard (DIN 58940) [Wullenweber *et al.* 1990] bzw. auf die Interpretationskriterien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; <http://clsi.org/>) oder des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; <http://www.eucastr.org/>). Weil jedoch noch nie Interpretationskriterien speziell für *S. moniliformis* definiert wurden, sind Bewertungen auf Basis von „sensibel“, „intermediär resistent“ und „resistent“ aus heutiger Sicht obsolet. Dennoch widerspiegeln alle durchgeführten Tests übereinstimmende Wachstums-Hemmungsmuster *in vitro* [Wullenweber 1995], deren Richtigkeit auch in mannigfaltiger Weise klinisch *in vivo* bestätigt werden konnte. Demnach besteht eine hohe Empfindlichkeit von *S. moniliformis* gegenüber den meisten eingesetzten Wirkstoffen, und es ergeben sich lediglich natürliche Resistenzen gegenüber Polymyxin B, Nalidixinsäure und Sulfamethoxazol/Trimethoprim [Roughgarden 1965, Gaastra *et al.* 2009]. Daneben wurden allerdings auch *S. moniliformis*-Stämme beschrieben, welche als resistent gegenüber Norfloxacin, Aminoglykosiden und Cephalosporinen bewertet wurden [Wullenweber 1995, Freunek *et al.* 1997, Cunningham *et al.* 1998], und auch *S. hongkongensis* gilt – allerdings lediglich auf Basis von zwei Stämmen und ohne nähere Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus – als Ciprofloxacin-resistent [Woo *et al.* 2014].

Nach übereinstimmender Auffassung besteht die Therapie der ersten Wahl in der Gabe von Penicillin bei humanem RBF, welches bei unkomplizierten Fällen für zehn bis 14 Tage (meist als intravenöse Therapie während der ersten Woche) verabreicht werden sollte [Mahmoodi *et al.* 2016]. Komplizierte Verläufe sollten dagegen für mindestens vier Wochen mit hochdosierten intravenösen Penicillingaben – bei

2. SCHRIFTTUM

Verdacht auf Endokarditis zusätzlich mittels Gentamicin – abgedeckt werden [Costa-Pinto *et al.* 2016]. Bislang ließen sich keine β -Laktamaseaktivität oder Hinweise auf entsprechende Gene bei *S. moniliformis* nachweisen [Edwards & Finch 1986, Nolan *et al.* 2009]. In Fällen einer Penicillin-Unverträglichkeit kann auch auf Streptomycin oder Tetrazyklin ausgewichen werden [Wullenweber 1995, Anonym 1998]. Wegen der besseren Anflutung im Zielgewebe werden für Arthritiden auch die Wirkstoffe Rifampicin und Clindamycin eingesetzt [Legout *et al.* 2005]. Einer Literaturlauswertung zufolge wurden weiterhin auch Flucloxacillin, Gentamicin, Cephalosporine, Ciprofloxacin und Vancomycin mit Erfolg eingesetzt [Dendle *et al.* 2006]. Allerdings beschreiben andere Autoren auch die erfolglose Therapie mit Fluorchinolonen und Gentamicin, in deren Folge sich der Erreger sogar weiterhin kultivieren ließ [Mahmoodi *et al.* 2016]. Veterinärmedizinische Behandlungen fanden bislang als Versuch der Eradikation einer infizierten Labornagerkolonie mit Ampicillin über zwei Wochen, gefolgt von Chlortetrazyklin über eine Woche im Trinkwasser statt [Wullenweber *et al.* 1990]. Zwar konnte nach Abschluss der Behandlungen bei einem überwiegenden Teil der Mäuse und Ratten kein Erreger mehr nachgewiesen werden, aber eine vollständige Elimination gelang dennoch nicht bei sämtlichen Tieren, sodass eine vollständige Räumung erfolgte. Für wertvolle SPF-Labornagerbestände gelten daher prophylaktische Maßnahmen, welche eine Erregereinschleppung von vornherein ausschließen sollen. Weil aufgrund anderer Prioritäten sicher auch mittel- oder langfristig nicht mit einer Etablierung von Normungspunkten (*breakpoints*) seitens der Normungsinstitute (CLSI, EUCAST) für *S. moniliformis* zu rechnen ist, sollte auf Basis der vielfältig vorhandenen empirischen Therapieregimes für Menschen und Haustiere mit Penicillinen behandelt werden [Edwards & Finch 1986, Berger *et al.* 2001, Kadan *et al.* 2002, Dendle *et al.* 2006, Elliott 2007, Gaastra *et al.* 2009].

2.6.2 *Sneathia*

Aufgrund der dargestellten Fälle in der Literatur scheinen die durch *Sneathia* spp. bedingten Infektionen unter Einfluss von Penicillin beherrscht werden zu können, wenngleich bei der initialen Chemotherapie der Intensivpatienten kein Resistenztest vorlag und deshalb die Therapie zumeist mit einer Kombination unterschiedlicher Breitspektrum-Chemotherapeutika initiiert wurde [De Martino *et al.* 2004, Devi *et al.*

2. SCHRIFTTUM

2014]. Entgegen dem üblicherweise im weiblichen Genitaltrakt lokal eingesetzten und grundsätzlich gut wirksamen, im Biofilm auf dem Vaginalepithel jedoch schlecht anflutenden Metronidazol [Fredricks *et al.* 2009, Harwich *et al.* 2012] konnten Urethritiden bei Männern durch *Leptotrichia/ Sneathia* spp. am erfolgreichsten mit Doxzyklin ausgeheilt werden [Manhart *et al.* 2013]. Untersuchungen an „*Sn. amnii*“ belegen dagegen eine Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Ciprofloxacin [Harwich *et al.* 2012]. Bei polybakteriellen Infektionen im Rahmen eines PID erwiesen sich schematische, von der US-Gesundheitsbehörde CDC empfohlene Medikationen mit Doxzyklin und Cefoxitin als suboptimal wirksam gegenüber *Sneathia* spp. und konnten in Kontrolluntersuchungen keine Freiheit von *Sneathia* spp. belegen [Haggerty *et al.* 2009]. Nach Aussage dieser Autoren sind zumindest einige Stämme von *Sneathia* spp. Metronidazol-resistent. Bemerkenswert, wenngleich mehr von diagnostischem Interesse ist hingegen eine oft als Alternative zur Gramfärbung angewandte Vancomycin-Testung, bei der 99% der Gram-negativen Bakterien inklusive der *Leptotrichia*-Spezies intrinsisch resistent sind, „*Sn. amnii*“ jedoch im Wachstum gehemmt wurde [Harwich *et al.* 2012]. Dies deutet auf einen devianten Aufbau der äußeren Membran von „*Sn. amnii*“ hin.

2.6.3 *Leptotrichia*

Bei systemischen Infektionen erwiesen sich Penicilline als erfolgreich bei der Behandlung von mit *Leptotrichia* infizierten Patienten [Duperval *et al.* 1984, Hot *et al.* 2008, Woo *et al.* 2010, Lo 2012] bei gleichfalls hochgradiger Empfindlichkeit *in vitro* gegenüber den meisten übrigen eingesetzten Wirkstoffen [Duperval *et al.* 1984]. Andere Behandlungsschemata beinhalteten Imipenem [Kawanami *et al.* 2009], Vancomycin, Clindamycin, Gentamicin und weitere β -Laktamantibiotika (zusammengefasst in Lim *et al.* [2016], ohne dass jedoch auf die Methodik der Testung näher eingegangen wird). Bei Lo [2012] wurde mit Fluorchinolonen keine Ausheilung erzielt, sodass die Autoren in Ermangelung eindeutiger CLSI-Grenzwerte stattdessen den parenteralen Einsatz von Penicillinen empfahlen.

2. SCHRIFTTUM

2.7 Virulenzfaktoren und Pathogenität

2.7.1 *Streptobacillus*

Sämtliche bisherigen Betrachtungen zu Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren beschränken sich auf *S. moniliformis* und „*Sn. amnii*“. In einer Vollgenomanalyse des Typstamms von *S. moniliformis* wurden keine designierten Virulenz-assoziierten Gene identifiziert [Nolan *et al.* 2009], indem die annotierten Gene mit insgesamt neun Datenbanken, darunter TIGR-Fam, Pfam, PRIAM, KEGG und COG, für eine funktionelle Vorhersage von Genen abgeglichen worden waren. Bisherige Überlegungen zur Pathogenität diskutierten eine mögliche Rolle der sehr vereinzelt auftretenden hämolysierenden Eigenschaften einzelner Stämme [Ditchfield *et al.* 1961, Wullenweber *et al.* 1992] sowie den außerordentlich hohen Gehalt an DNS-abbauenden Enzymen (DNase) sämtlicher untersuchter Stämme, welche unabhängig vom bakteriellen Wachstum abgegeben wird [Hofmann 1994]. Weitere Hypothesen hinsichtlich Pathogenität beinhalteten das Lipopolysaccharid [Wullenweber *et al.* 1992] sowie die Mannose-resistente Agglutination von Erythrozyten. Für Letztere konnte zweifelsfrei das Vorhandensein von Adhäsinen bestätigt werden, welche im Sinne einer Vorbedingung für eine 'erfolgreiche' Infektion des Wirts als Pathogenitätsmerkmal interpretiert werden kann. Bei den Versuchen wurden Erythrozyten von elf verschiedenen Donorspezies (Mensch, BALB/c und C57B1/6J Mäuse, Ratte, Pute, Meerschweinchen, Hamster, Huhn, Schaf, Pferd, Schwein und Rind) auf ihre adhäsiven Eigenschaften gegenüber 14 *S. moniliformis*- und einem phänotypisch abweichenden Stamm von einer Hüpfmaus hin untersucht [Hofmann 1994]. Sämtliche Stämme zeigten in unterschiedlichem Ausmaß zu den einzelnen Donor-Erythrozyten adhäsive Eigenschaften. Die stärksten Reaktionen wurden bei Erythrozyten von Pute, Mensch, Meerschweinchen und Schwein erfasst, gefolgt von Ratte und Huhn. Obwohl gerade C57BL/6J Mäuse für ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Streptobazillose bekannt sind [Wullenweber *et al.* 1990], wurden deren Erythrozyten weniger stark agglutiniert verglichen mit denen der als resistent geltenden BALB/c Mäuse [Hofmann 1994]. Durch Zusatz von Mannose, einem bekannten Adhäsin-Rezeptoragonisten, ließen sich keine signifikanten Unterschiede an der Hämagglutination erkennen, weshalb von einer Mannose-unabhängigen Agglutination auszugehen ist [Hofmann 1994]. Auch fanden sich keine Hinweise auf besondere Reaktionen zwischen den Erythrozyten der

2. SCHRIFTTUM

'Originalwirte', also solchen Tierarten, von welchen die jeweiligen Streptobazillen ursprünglich isoliert worden waren, und den roten Blutkörperchen anderer Tierarten. Unterschiede im Hämagglutinationsverhalten zwischen RBF- und HF-Stämmen von *S. moniliformis* waren nicht zu beobachten [Hofmann 1994].

Eine Abhängigkeit des pathogenen Potentials scheint allerdings auch auf der Wirtsseite zu bestehen, worauf bislang nicht identifizierte Unterschiede zwischen den hoch empfindlichen C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu den als resistent geltenden Mäusen mit BALB/c Genetik hindeuten [Wullenweber *et al.* 1990, Wullenweber *et al.* 1991]. Bislang wurden jedoch keine Untersuchungen zum Vorhandensein genetischer Determinanten für unterschiedliche Wirtsempfänglichkeiten durchgeführt. Irvine & Wills [2006] spekulieren über die Pathogenese der *S. moniliformis*-Sepsis dergestalt, dass diese über *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) vermittelt werden könnte. Sie führen eine parallele, Mausgenetik-abhängige erhöhte Empfindlichkeit der C57BL/6J Genetik bei der murinen *Listeria monocytogenes*-Infektion an, welche durch eine frühe Interleukin (IL)-12-Produktion gekennzeichnet scheint [Liu *et al.* 2002]. Expression von TLR auf dendritischen Zellen und Stimulation mit mikrobiellen Liganden führte bei dieser Genetik – und im Gegensatz zur BALB/c Genetik – zur höheren Freisetzung von IL-12 bei gleichzeitig geringerer Freisetzung des ‚*monocyte chemoattractant protein 1*‘ [Liu *et al.* 2002]. Dies könnte auch im Fall von *S. moniliformis* im Sinne einer TLR-medierten Signalkaskade mit gesteigerter pro-inflammatorischer Immunantwort bei C57BL/6J Mäusen gedeutet werden [Irvine & Wills 2006]. Jedoch wurden inzwischen solche analogen Empfindlichkeitsunterschiede bei diesen und anderen Mausgenetiken auch bei anderen bakteriellen Infektionen aufgezeigt [Lin *et al.* 1996, Liu *et al.* 2002, Miyairi *et al.* 2007, Yadav *et al.* 2011]. Nicht immer scheinen diesen Determinanten nur einzelne Gene zugrunde zu liegen [Yadav *et al.* 2011], aber bei der murinen *Chlamydia psittaci*-Infektion scheint die unterschiedliche Expression bestimmter Interferon γ -abhängiger p47 GTPasen Einfluss auf die Art der Aktivierungskaskade von Entzündungszellen zu nehmen: Eine resistente C57BL/6J Maus nimmt bei Aktivierung von TLR einen von Makrophagen und natürlichen Killerzellen geprägten Infektionsverlauf, während derselbe bei einer empfindlichen DBA/2J Maus durch eine massiv überschießende Entzündungsreaktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten geprägt ist [Miyairi *et al.* 2007]. Als prädominante Entzündungszellen konnten bislang bei der *S. moniliformis*-Infektion ebenfalls überwiegend neutrophile

2. SCHRIFTTUM

Granulozyten identifiziert werden [Anonym 1998, Berger *et al.* 2001, Sato *et al.* 2016]. Bekannt ist ferner, dass Maus-Makrophagen nach der Phagozytose von *S. moniliformis* vorzeitig absterben [Savage 1972].

2.7.2 *Sneathia*

Auch bei „*Sn. amnii*“ wird wegen der hämolytischen Aktivität auf bluthaltigen Nährböden ein Hämolsingen vermutet [Harwich *et al.* 2012]. Es konnte die Freisetzung von ~9% Hämoglobin aus humanen Erythrozyten, nicht aber eine Hämagglutination durch „*Sn. amnii*“ beobachtet werden. Interessanterweise wirkte „*Sn. amnii*“ ebenfalls innerhalb von 2 h zytotoxisch auf Zervixkarzinomzellen, ohne dass ein Hämolsin oder ein weiteres annotiertes Toxin identifiziert wurden [Harwich *et al.* 2012]. Dem zytotoxischen Effekt ging eine bakterielle Adhärenz mit nachfolgender Perforation voraus. Das Genom weist lediglich jeweils ein Gen für ein Adhäsion-Homolog sowie ein putatives Fibronektin-Bindungsprotein auf, verfügt aber weiterhin über drei Homologe der Hia-Zelloberflächenproteine und eine Reihe von YadA-ähnlichen Proteinen, welche bekanntermaßen als Autotransporter zu Wirtszellen fungieren können [Terti *et al.* 1992, St Geme & Cutter 2000]. Daneben weist das Genom von „*Sn. amnii*“ eine Toxin-Antitoxin-Kassette auf, welche im Sinne einer Stabilisierung fremder (Plasmid)-DNS, Stressresistenz und Persister-Genotyp interpretierbar ist [Bukowski *et al.* 2011, Wang & Wood 2011, Harwich *et al.* 2012]. Zur Invasion von Uterus und Amnion könnten Sialidasen und Invasine notwendig sein, welche zumindest als putative Homologe vorhanden sind [Harwich *et al.* 2012]. Schließlich verweisen Harwich *et al.* (2012) auf ein im Genom vorhandenes CRISPR-System (s. Kap. 2.1.5) mit neun 36 bp Wiederholungen (*direct repeats*), welches an das putative *cas* Gen angrenzt und welches der bakteriellen Adaptation, Persistenz und (antiviralen) Resistenz in bestimmten Ökosystemen dienlich ist.

2.8 Molekulare Charakterisierung und Genome von Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae*

Zu Beginn der Untersuchungen zu dieser Arbeit im Jahr 2013 standen lediglich die Genome der Typstämme von *L. buccalis* [Ivanova *et al.* 2009], *S. moniliformis* [Nolan *et al.* 2009] und *Se. termitidis* [Harmon-Smith *et al.* 2010] sowie diejenigen von „*Sn.*

2. SCHRIFTTUM

amni“ [Harwich *et al.* 2012] und zwei weiteren *Leptotrichia* spp. für Genomanalysen zur Verfügung. Die molekulare Charakterisierung von Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae* war teils wegen ihrer Rolle als Krankheitserreger, vor allem aber auch wegen ihrer lange ungeklärten systematischen Position von besonderem Interesse [Nolan *et al.* 2009, Harmon-Smith *et al.* 2010, Harwich *et al.* 2012]. Diese Studien lieferten wichtige Kenngrößen in Bezug auf prinzipielle Genomgrößen und Genrepertoires und bestätigten die zuvor mit anderen systematischen Methoden erzielte taxonomische Klassifikation. Die mit Ausnahme von *Se. termitidis* kleinen Genome wiesen allerdings bislang keine eindeutigen Hinweise für Virulenz-assoziierte Gene auf, obwohl es sich teilweise um obligat humanpathogene Mikroorganismen handelt. Selbst bei „*Sn. amni*“ konnten Harwich *et al.* [2012] zwar einen hämolytischen/zytotoxischen Phänotyp feststellen, Hinweise auf dezidierte molekulare Virulenzeigenschaften fanden sich – abesehen von der prinzipiell kleinen Genomgröße – jedoch nicht (s. a. Kap. 2.7.2). Im Gegensatz dazu weist das in Genomgröße und G/C-Gehalt übereinstimmende, auch in dieser Arbeit als Außengruppe (*outgroup*) verwendete Typstammgenom der nahe verwandten Gattung *Fusobacterium* gleich mehrere putative Virulenzdeterminanten der pathogenen Bakterienspezies *Salmonella* spp., *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* und *Shigella flexneri* auf [Kapatral *et al.* 2002]. Im Folgenden finden sich die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Genomcharakteristika der Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae*.

2.8.1 *Streptobacillus*

Der verhältnismäßig niedrige G/C-Gehalt von 24-26% von *S. moniliformis* hat in der Vergangenheit dazu geführt, diesen Organismus anfangs in die Verwandtschaft der Mycoplasmatales zu stellen [Savage 1984], was sich scheinbar auch durch das Auftreten der zellwandlosen L-Formen und die anspruchsvollen Kulturbedingungen zu bestätigen schien.

Eine Reihe von Arbeiten versuchte, unterschiedliche Isolate von *S. moniliformis* u.a. auch genetisch zu vergleichen [Hofmann 1994]. So fand diese Autorin ein hohes Maß an DNS-DNS-Homologie bei 14 untersuchten *S. moniliformis*. Ein in mehrfacher

2. SCHRIFTTUM

Hinsicht atypisches Isolat von einer australischen Hüpfmaus wies immer noch eine DNS-DNS-Homologie von 68% gegenüber dem *S. moniliformis*-Typstamm auf, wodurch sich bestenfalls Hinweise auf eine andere Subspezies ergeben hätten [Johnson 1984, Wayne *et al.* 1987]. Die Genomsequenzierung des *S. moniliformis*-Typstamms [Nolan *et al.* 2009] erbrachte ein 1662578 Basenpaare (bp) großes, zirkuläres bakterielles Chromosom mit einem 10702 bp großen Plasmid, durch welche zusammen 1511 Protein-kodierende und 55 RNA-Gene kodiert sind (Kodierungsdichte 93%). Das Plasmid enthält lediglich acht Gene, denen jedoch keine Funktion bzw. eine Verwandtschaft zu Pathogenitäts- oder Virulenz-assoziierten Genen anderer Taxa zuzuordnen ist. Der durchschnittliche Zwischengenabstand und G/C-Gehalt betragen 77 bp [Harwich *et al.* 2012] bzw. 26,28% [Nolan *et al.* 2009].

2.8.2 *Sneathia*

Der G/C-Gehalt von *Sn. sanguinegens*, der einzigen validen Spezies der Gattung, beträgt 22-25% [Logan *et al.* 2010]. Die als „*Sn. amnii*“ ohne hinterlegten Typstamm publizierte und deshalb nicht offiziell anerkannte Spezies zeigte in ihrem Genom eine Größe von 1339284 bp (G/C-Gehalt ~28%), in welchen 1282 Protein-kodierende Gene enthalten sind [Harwich *et al.* 2012]. Die durchschnittliche Genlänge beträgt 969 bp (323 AS), der durchschnittliche Zwischengenabstand 80 bp. Somit ist die Dichte Protein-kodierender Gene mit 92% sowohl innerhalb der *Leptotrichiaceae* als auch im Allgemeinen recht hoch, denn gemittelt ergeben sich 87% (Bandbreite 85-90%; [McCutcheon & Moran 2011, Land *et al.* 2015]. Mit 968 Genen/Mbp handelt es sich um die höchste Gendichte (bei 110 überlagernden Genen) und das bislang kleinste Genom innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae*, was mit einem hohen Selektionsdruck auf diese Spezies erklärt wird [Harwich *et al.* 2012].

2.8.3 *Sebaldella*

Das Genom des Typstammes von *Se. termitidis* wurde wegen seiner isolierten phylogenetischen Position bereits sequenzanalysiert und enthält 4486650 bp, welche 4210 Protein-kodierende und 54 RNS-Gene kodieren (Zwischengenabstand 128 bp,

2. SCHRIFTTUM

Kodierungsdichte 87,3% [Harwich *et al.* 2012]) [Harmon-Smith *et al.* 2010]. In der Genomgröße eingeschlossen sind zwei Plasmide (13648 und 54160 bp). Auch *Se. termitidis* weist einen relativ niedrigen G/C-Gehalt von 33,38% auf [Harmon-Smith *et al.* 2010].

2.8.4 *Leptotrichia*

Die Vertreter der Typgattung der Familie *Leptotrichiaceae* weisen einen G/C-Gehalt von 25,0-29,7% auf [Edwards & Gharbia 2010]. Die Typspezies *L. buccalis* zeichnet sich durch einen Zwischengenabstand von 129 bp, eine Kodierungsdichte von 87,3% und ein 2,47 Mbp großes Genom aus [Harwich *et al.* 2012]. Auf Basis einer 16S rRNS-Gen-Phylogenie ist die Gattung mit ihren derzeit sieben Spezies monophyletisch und steht als Schwesterklade den Gattungen *Streptobacillus* und *Sneathia* gegenüber (s. Abb. 1; [Edwards & Gharbia 2010]. Inzwischen wurde eine RNS-geleitete, einzelsträngige RNS-angreifende CRISPR-Struktur bei *L. shahii* beschrieben, welche gegen RNS-Phagen Schutz verleiht [Abudayyeh *et al.* 2016].

2.9 Molekulare Diagnostik

Für den Nachweis und zur Identifizierung von *S. moniliformis* und der anderen Vertreter der *Leptotrichiaceae* wurden bislang verschiedene PCR-Protokolle veröffentlicht, welche zumeist auf einer partiellen 16S rRNS-Gensequenzierung beruhen [Boot *et al.* 2002, Boot *et al.* 2008, Dubois *et al.* 2008, Kimura *et al.* 2008, Rohde *et al.* 2008, Loridant *et al.* 2011]. Gerade zur phylogenetischen Analyse ist es sinnvoll, die Ergebnisse anhand weiterer funktioneller Gene abzusichern (s. Kap. 2.1.5). Zu diesem Zweck stehen eine Reihe von Nachweisen der Gene *groEL* (Chaperonin), *gyrB* (bakterielle Gyrase, B-Untereinheit), *recA* (Rekombinase, A-Untereinheit), *rpoB* (DNS-abhängige RNS-Polymerase, B-Untereinheit) innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* zur Verfügung. Eine Übersicht über die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer sowie der entsprechenden PCR-Bedingungen liefert Tabelle 1. Innerhalb des Phylums Fusobacteria sind neben der genannten auch bereits weiteren Gene wie die 16S-23S rRNS interne transkribierende Spacerregion (ITS), konservierte Indels und Gene für Gruppen-spezifische Proteine, 43 kDa äußere Membranproteine und Zink-Proteasen für Speziesidentifikationen und

2. SCHRIFTTUM

phylogenetische Analysen verwendet worden [Lawson *et al.* 1991, Jalava & Eerola 1999, Conrads *et al.* 2002, Jin *et al.* 2004, Strauss *et al.* 2008, Shah *et al.* 2009, Kim *et al.* 2010, Woo *et al.* 2010, Sun *et al.* 2013, Gupta & Sethi 2014]. Weiterhin wurde ein ursprünglich für den *in situ* Nachweis von *Fusobacterium* spp. gedachtes Diagnostikum als kreuzreagierend mit *S. moniliformis* und *Leptotrichia* sp. erkannt [Sigge *et al.* 2007]. Somit könnte dieser Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstest (FISH) auch für den direkten Gewebe-basierten Nachweis von *S. moniliformis* eingesetzt werden.

2. SCHRIFTTUM

Tabelle 1: Nachweissysteme funktioneller Gene, welche für die Vertreter der *Leptotrichiaceae* als geeignet beschrieben wurden.

Zielstruktur (Gen)	Oligo-nukleotid-Primer	Sequenz	Erwartete Größe des PCR-Produkts (bp)	Referenz
16S rRNS	LPW8385 LPW8387	5'-GAACGCTGACAGAATGCTTA-3' 5'-CCAATCACTATCCACACCTTA-3'	1425	[Woo <i>et al.</i> 2010]
Chaperonin (<i>groEL</i>)	LPW8389 LPW8441	5'-GTTGTGGAAGGNATGCARTTYGA-3' 5'-CAGCTCCAACTTTTATTACAGCT-3'	555	[Woo <i>et al.</i> 2010]
Gyrase (B-Untereinheit) (<i>gyrB</i>)	LPW10271 LPW8399	5'-GGAAMWGAYRTAAGAGAAGG-3' 5'-TTCATTTCTCCTAGNCCYTTTRTA-3'	796	[Woo <i>et al.</i> 2010]
Rekombinase (A-Untereinheit; <i>recA</i>)	LPW8402 LPW10124	5'-GGTGCCGTTATGAAAYTNGNGA-3' 5'-GAACCCAGGCTCCAGCTTT-3'	813	[Woo <i>et al.</i> 2010]
DNS-abhängige RNS-Polymerase (B-Untereinheit; <i>rpoB</i>)	LPW8697 LPW8698	5'-AAATGGCACTTGAGCTGT-3' 5'-CAATCCCAACAGTAATTCCA-3'	768	[Woo <i>et al.</i> 2010]
16S rRNS	LPW57	5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	*	[Woo <i>et al.</i> 2014]
16S rRNS	LPW205 LPW26378 LPW26129	5'-CTTGTTACGACTTCACCC-3' 5'-AGGACAATGRAAAKAGAAAG-3' 5'-TATCTCAGTCCCTTGTTG-3'	*	[Woo <i>et al.</i> 2014]
16S rRNS	LPW26128 LPW26379	5'-AAGTTGGGACTCTAATG-3' 5'-CTATTCAATTCYCATTTGTC-3'	*	[Woo <i>et al.</i> 2014]

Fortsetzung Tabelle 1

Rekombinase
(A-Unterinheit; *recA*)

LPW18647	5'-GGWKCYRTHATGAARYTYGGWGA-3'	*	[Woo <i>et al.</i> 2014]
LPW18648	5'-ARCTRAACCAYGMWCCRCT-3'		
16S rRNS	S5 5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3'	269	[Kimura <i>et al.</i> 2008]
	AS2 5'-GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3'		
16S rRNS	SbmF 5'-GAGAGAGCTTTGCATCCT-3'	1222	[Rohde <i>et al.</i> 2008]
	SbmR 5'-GTAACCTCAGGTGCAACT-3'		
Gyrase (B-Unterinheit)	MZK-F 5'-AAGATAGGGTAATGCTTACAGAAGGAG-3'	1316	[Hayashimoto <i>et al.</i> 2008]
(<i>gyrB</i>)	MZK-R 5'-AATCTACCTTGTTTTGCAGATCCAC-3'		
16S rRNS	5'-AGAGTTTGATGGCTCAG-3'	1400	[Chen <i>et al.</i> 2007]
	5'-GGAACGTATTCCACCGTAGCA-3'		

*: in Publikation nicht angegeben

3. ZIELSETZUNG

3. ZIELSETZUNG

Trotz einer nahezu 90 Jahre währenden Monotypie der Gattung *Streptobacillus* und der vermeintlich hohen phänotypischen Einheitlichkeit von *S. moniliformis*-Isolaten [Hofmann 1994] deuten insbesondere die Mikrobiom-Untersuchungen inzwischen auf eine deutliche Heterogenität und Speziesdiversität innerhalb der Gattung hin [Kimura *et al.* 2008, Wouters *et al.* 2008, Dewhirst *et al.* 2012, Kong *et al.* 2012, Woo *et al.* 2014, Chaves-Moreno *et al.* 2015], welche durch die Beschreibung von *S. hongkongensis* untermauert wurde [Woo *et al.* 2014]. Daneben sind Isolate bekannt geworden, welche zwar vorläufig als *S. moniliformis* oder *S. moniliformis*-ähnlich charakterisiert wurden, jedoch aufgrund der Wirtsspezies, ihrer Wachstumseigenschaften oder des Phänotyps zweifelbehaftet in Bezug auf die Richtigkeit ihrer Zuordnung sind [Fleming 1976, Hopkinson & Lloyd 1981, Hofmann 1994, Maher *et al.* 1995, Kimura *et al.* 2008]. Zum korrekten Verständnis der Epidemiologie und nicht zuletzt des zoonotischen Potentials sind jedoch zweifelsfreie Kenntnisse der Phylogenie der involvierten Erregerspezies und der von diesen besiedelten Wirtstierspezies unerlässliche Voraussetzungen.

Die klinisch-mikrobiologische Diagnostik des RBF wurde bereits als ‚diagnostisches Dilemma‘ bezeichnet [Rumley *et al.* 1987, Mahmoodi *et al.* 2016], weil es sich abgesehen von einer relativ unbekanntem Infektionskrankheit um einen hochgradig empfindlichen Erreger handelt, der durch sein schwaches, langsames Wachstum und seine hohen Kulturanprüche oft übersehen wird [Elliott 2007]. Für diesen Zweck benötigt man optimaler Weise robuste Methoden, mit welchen sich auch verwandtschaftliche Beziehungen zwischen unterschiedlichen Infektionsstämmen im Hinblick auf epidemiologische Zusammenhänge beantworten lassen. Diese Forderung gewinnt noch an Bedeutung, wenn – wie eingangs gemutmaßt – eine höhere Diversität an Spezies besteht.

Auf Basis eines Typstamm-Genoms [Nolan *et al.* 2009] fand man bislang keine Gene, welche mit der Virulenz des Erregers in Verbindung gebracht werden konnten. Für Infektionserreger wie *S. moniliformis* mit erheblicher Pathologie und Letalität erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass solche genetischen Grundlagen fehlen, denn im Verlauf der Infektion kommt es zu einer Vielzahl entzündlicher Veränderungen, deren Pathogenese am besten mit einer Schädigung von Endothel-

3. ZIELSETZUNG

und Immunzellen zu erklären ist. Obwohl die Pathogenese des RBF weitgehend unverstanden ist, leitet *S. moniliformis* den vorzeitigen Zelltod von Mausmakrophagen ein [Savage 1972]. Im Verlauf der humanen Infektion herrscht ein von neutrophilen Granulozyten dominiertes Krankheitsbild vor [Anonym 1998, Berger *et al.* 2001, Sato *et al.* 2016]. Bislang sind diese Beobachtungen jedoch nicht mit molekularen Daten zu untermauern. Darüber hinaus stellt nur ein Genom eine zu geringe Grundlage dar, um nach Virulenz-assoziierten Genen und weiteren Pathogenitätsmerkmalen zu suchen. Auch sind Aussagen zur intraspezifischen Variabilität nur durch einen Vergleich einer möglichst repräsentativen Auswahl an Stämmen zu treffen.

Zur Erlangung profunderer Einblicke in die Diversität innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* erschien es geboten, eine unter spatio-temporalen Aspekten ausreichend große Kollektion von Stämmen anzulegen, mit welchen sich die nachfolgend aufgeführten Ziele der hier beschriebenen Arbeiten realisieren ließen:

1. Vergleichende phänotypische und genotypische Untersuchungen an den Stämmen einzuleiten, um Gemeinsamkeiten und Diversitäten an einer bis dato weltweit einzigartigen Sammlung dieser selten isolierten Mikroorganismen zu erfassen und diese unter besonderer Berücksichtigung einer modernen Erregerdiagnostik auszunutzen,
2. Kenntnisse über phylogenetische Beziehungen innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* zu gewinnen und die gewonnenen Erkenntnisse taxonomisch umzusetzen,
3. durch die Vollgenomsequenzierung sämtlicher Stämme in der Lage zu sein, erstmals umfassendere genomische Analysen an einem größeren Kollektiv dieser bislang wenig beachteten Mikroorganismengruppe durchführen zu können. Dabei erschien insbesondere das Ziel der Identifikation von putativen Pathogenitätsmerkmalen und Virulenzfaktoren von Interesse und
4. aufgrund der geschilderten Probleme bei der Kultivierung und Diagnostik sollte für den besonders bedeutsamen RBF-Erreger nach einer Kultur-unabhängigen, speziesspezifischen, nicht invasiven Typisierungsmethode gesucht werden, mit welcher sich Transmissionsketten nachvollziehen und gesicherte Erreger-Wirtsbeziehungen leichter nachweisen lassen.

4. METHODIK

4. METHODIK

Für die vorliegenden Arbeiten sind die in den entsprechenden Veröffentlichungen (siehe Materialien in Abschnitt 6) beschriebenen Methoden und Verfahren angewandt worden:

- Aerobe, kapnophile, mikroaerophile und anaerobe Kultivierung von Isolaten auf unterschiedlichen festen und flüssigen Nährmedien sowie Lyophilisieren (Gefriertrocknen) von Isolaten
- Optimierung der Nachweise konventioneller biochemischer Röhrchentests („bunte Reihe-Reaktionen“), kommerzieller biochemischer Tests (API-ZYM, VITEK2-compact, Merlin Micronaut) und Evaluation von Antibigramme (Agardiffusionstest, Epsilometertest, Mikrobouillondilution)
- Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM; in Kooperation durchgeführt vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart)
- Präparation von Isolaten mittels Ameisensäure-Azetonitril-Extraktion für die Matrix-assistierte (überschichtete) Laser Desorption/Ionisation-Flugzeit („time of flight“)-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)
- Erstellen eigener MALDI-TOF-Datenbankeinträge zur Erweiterung bestehender Datenbanken
- Kultivierung und Präparation von Isolaten für die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)
- Kultivierung und Präparation von Isolaten für die Fettsäureanalytik (in Kooperation durchgeführt vom Institut für angewandte Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen [JLU])
- Kultivierung und Präparation von Isolaten für die Gewinnung von DNS
- Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Zielsequenzen der 16S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNS) von *S. moniliformis*
- DNS-DNS-Hybridisierungen (in Kooperation durchgeführt vom Institut für angewandte Mikrobiologie der JLU)
- Vollgenomsequenzierung isolatspezifischer DNS mittels „next generation sequencing“, Annotieren von Vollgenomen (in Kooperation durchgeführt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU, dem Robert

4. METHODIK

Koch-Institut, Berlin [RKI] und dem Deutschen Krebsforschungszentrum [DKFZ], Heidelberg)

- Erstellen von Multisequenz-Angleichungen („*Alignments*“) verschiedener funktioneller Gene
- Erstellen und Auswerten von Verwandtschaftsanalysen (Phylogenien) mittels NJ-, ML- und MP-Algorithmen
- Berechnung durchschnittlicher Nukleotididentitäten (ANI), *in-silico* DNS-DNS-Hybridisierungen mittels GGDC sowie Ermittlung von Proteinhomologiegraden anhand von POCP-Werten
- Vorhersage, Zuordnung und Analyse von Proteinfunktionen (in Kooperation durchgeführt vom RKI)

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Aufbau einer Stammsammlung

Für Vergleichszwecke wurde eine Stammsammlung für Streptobazillen und andere *Leptotrichiaceae* angelegt, indem möglichst umfassend versucht wurde, Stämme aus offiziellen Stammsammlungen sowie Feldisolate, zu welchen Publikationen vorlagen, zu akquirieren. Dazu wurden die Autoren entsprechender Publikationen angeschrieben und nach der Verfügbarkeit der Isolate befragt. Ein Großteil der Stämme wurde aus der Stammsammlung des DKFZ bereitgestellt, weitere Stämme bzw. deren DNS wurden aus Erlangen, Hannover, Marseille und Tokio bezogen. Auf diese Weise konnten insgesamt 49 Stämme bzw. Genome miteinander verglichen werden, darunter 24 *S. moniliformis*, 6 *Streptobacillus* spp. sowie 18 Referenzstämme anderer Vertreter der *Leptotrichiaceae* und ein Vergleichsgenom von *Fusobacterium nucleatum*. Zwei Stämme (1 *S. moniliformis*, 1 *Se. termitidis*; s. Positionen 48 u. 49 d. Tabelle 2) wurden erst vergleichsweise spät der Sammlung hinzugefügt, sodass die Ergebnisse dieser Stämme nur zu einem Teil der Untersuchungen dieser Arbeit eingeflossen sind. Im Hinblick auf *S. moniliformis* beinhaltet diese Stammsammlung somit Stämme, welche über einen Zeitraum von fast 90 Jahren von nahezu allen Kontinenten gesammelt worden waren und bildete die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit berücksichtigten Isolate und Stämme aus der Familie der *Leptotrichiaceae*, deren Herkunft und gegebenenfalls deren klinische Relevanz sowie Übersicht bereits publizierter Genome dieser Vertreter.

Stamm-Nr.	Stamm-bezeichnung	Bakterien-spezies	Jahr	Wirts-spezies	Klinik/Herkunft der Probe	Land	Stammreferenz	Genomreferenz	Zugriffsnummer
1	DSM 12112 [†] (=ATCC 14647 [†])	<i>S. moniliformis</i>	1925	Mensch	RBF	FRA	[Levaditi <i>et al.</i> 1925]	[Nolan <i>et al.</i> 2009]	CP001779.1, CP001780.1
2	CIP 55-48	<i>S. moniliformis</i>	1947	Maus	Lymphadenitis	GB	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWQV000000000
3	ATCC 27747	<i>S. moniliformis</i>	1964	Pute	septische Arthritis	USA	[Yamamoto & Clark 1966]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWQW000000000
4	NCTC 10773	<i>S. moniliformis</i>	1971	Mensch	Septikämie, Blut	GB	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LYRU000000000
5	NCTC 11194	<i>S. moniliformis</i>	1977	Mensch	RBF	GB	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWQX000000000
6	IPDH 144/80	<i>S. moniliformis</i>	1980	Pute	septische Arthritis	GER	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWQY000000000
7	CIP 81-99	<i>S. moniliformis</i>	1981	Mensch	Septikämie, Blut (Biss wilder Ratte)	FRA	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWSZ000000000
8	AHL 370-4	<i>S. moniliformis</i>	1982	Maus	Otitis	AUS	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTA000000000
9	NCTC 11941	<i>S. moniliformis</i>	1983	Mensch	HF	GB	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKD000000000
10	IPDH 109/83	<i>S. moniliformis</i>	1983	Pute	septische Arthritis	GER	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTB000000000
11	ATCC 49567	<i>S. moniliformis</i>	1989	Maus	Lymphadenitis	GER	[Wullenweber <i>et al.</i> 1990]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTC000000000
12	Kun 3 (RVM)	<i>S. moniliformis</i>	1991	Ratte	keine Klinik	NL	[Boot <i>et al.</i> 2002]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTD000000000
13	ATCC 49940	<i>S. moniliformis</i>	1992	Ratte	Otitis media	GER	[Wullenweber <i>et al.</i> 1992]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTE000000000
14	B10/15	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	wilde Ratte	k. A.	NL	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTF000000000
15	A378/1	<i>S. moniliformis</i>	1995	wilde Ratte	Vaginaltupfer	GER	DKFZ	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTG000000000
16	VA11257/2007	<i>S. moniliformis</i>	2007	Mensch (Landwirt)	RBF, Endokarditis	GER	[Kondruweit <i>et al.</i> 2007]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTI000000000
17	VK105/14	<i>S. moniliformis</i>	2008	Ratte (Heimtier)	Abszess	GER	TiHo	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LWTJ000000000
18	BS/1	<i>S. moniliformis</i>	2009	Labormaus	nach Rattenbiss	GER	DKFZ	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKJ000000000

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fortsetzung Tabelle 2

19	Marseille	<i>S. moniliformis</i>	2009	Ratte	RBF	REU	[Loridant <i>et al.</i> 2011]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKI000000000
20	IKC1	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	Ratte	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKH000000000
21	IKC5	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	Ratte	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKG000000000
22	IKB1	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	Ratte	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKF000000000
23	TSD4	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	Ratte	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	LXKE000000000
24	131000547 ^T (DSM 29248 ¹)	<i>S. felis</i>	2013	Katze	Pneumonie	GER	[Eisenberg <i>et al.</i> 2014, Eisenberg <i>et al.</i> 2015c]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016e]	LOHX000000000
25	DSM 26322 ^T (HKU33 ¹)	<i>S. hongkongensis</i>	2014	Mensch	Abszess	HON	[Woo <i>et al.</i> 2014]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016e]	LOHY000000000
26	AHL 370-1 ^T	<i>S. notomytis</i>	1979	Hüpfmaus	Septikämie, Leber	AUS	[Hopkinson & Lloyd 1981]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2015d]	SAMN04038436
27	KWG2	<i>S. notomytis</i>	k. A.	Ratte (R. r.)	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	SAMN04099645
28	KWG24	<i>S. notomytis</i>	k. A.	Ratte (R. r.)	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016d]	SAMN04099670
29	OGS16 ^T	<i>S. ratti</i>	k. A.	Ratte (R. r.)	keine Klinik, RaTu	JAP	[Kimura <i>et al.</i> 2008]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016e]	SAMN04099675
30	CCUG 41628 ^T	<i>Sn. sanguinegens</i>	1999	Mensch	Blut	SWE	[Hanff <i>et al.</i> 1995, Collins <i>et al.</i> 2001]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016a]	LOQF000000000
31	Sn35	" <i>Sn. amnii</i> "	k. A.	Mensch	Vaginal-Mikrobiota	k. A.	[Hanwich <i>et al.</i> 2012]	[Hanwich <i>et al.</i> 2012]	NZ_CP011280
32	NCTC 11300 ^T (ATCC 33386 ¹)	<i>Se. termittidis</i>	1962	Termite	Darm	k. A.	[Sebald 1962]	[Harmon-Smith <i>et al.</i> 2010]	CP001739
33	DSM 1135 ^T (C-1013-b)	<i>L. buccalis</i>	2009	Mensch	Zahnstein	USA	k. A.	[vanova <i>et al.</i> 2009]	CP001685
34	DSM 19756 ^T (LB 57)	<i>L. goodfellowii</i>	2013	Mensch	Aortenklappenplastik	GER	k. A.	k. A.	NZ_AZXW000000000
35	F0264	<i>L. goodfellowii</i>	k. A.	Mensch	Mundhöhle	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_ADAD000000000
36	F0254 ^T	<i>L. hofstaedii</i>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_ACVB000000000
37	DSM 19757 ^T	<i>L. shahii</i>	2013	Mensch	Gingivitis	NOR	k. A.	k. A.	NZ_ARDD000000000

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fortsetzung Tabelle 2

38	DSM 19758 ^T	<i>L. wadei</i>	2004	Mensch	Speichel	NOR	[Eribe <i>et al.</i> 2004]	k. A.	NZ_ARDS000000000
39	F0279	<i>L. wadei</i>	k. A.	Mensch	subgingivale Plaque	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_AWVVM000000000
40	W10393	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 212	2015	Mensch	orales Mikrobiomprojekt	k. A.	k. A.	k. A.	CP012410
41	W9775	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 215	2015	Mensch	orales Mikrobiomprojekt	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_AWVVR000000000
42	F0581	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 225	2015	Mensch	orales Mikrobiomprojekt	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_AWVVS000000000
43	F0557	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 879	2015	Mensch	orales Mikrobiomprojekt	k. A.	k. A.	k. A.	NZ_AWVVL000000000
44	CCUG 39713 ^T	<i>C. abscessus</i>	1998	Meer- schweinchen	Kopfabzess	SWE	k. A.	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016a]	LOQG000000000
45	1510011837	<i>C. abscessus</i>	2015	Meerschwein- chen	Kopfabzess	GER	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016a]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016a]	LOQH000000000
46	NCIMB 703044 ^T (=AVG2115 ^T)	<i>O. salmonicida</i>	1992	Atlantischer Lachs	Septikämie	IRL	[Palmer <i>et al.</i> 1994, Maher <i>et al.</i> 1995]	[Eisenberg <i>et al.</i> 2016c]	LOQI000000000
47	ATCC 25586 ^T	<i>F. nucleatum</i>	k. A.	Mensch	Hals- u. Gesichtsläsion	k. A.	k. A.	[Kapatal <i>et al.</i> 2002]	AE009951
48	151002920	<i>Se. termitidis</i>	2015	Fettschwanz- maki	Zahnwurzelvereiterung	GER	[Eisenberg <i>et al.</i> 2015b]	keine	nicht sequenziert
49	A40/13	<i>S. moniliformis</i>	k. A.	Ratte, Heim- tier (R. n.)	spontaner Tod	JAP	[Hayashimoto <i>et al.</i> 2008, Eisenberg <i>et al.</i>]	keine	nicht sequenziert

^T: Typstamm; k. A.: keine Angabe; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA; NCTC: National Collection of Type Cultures, London, Großbritannien; CIP: Collection Institut Pasteur, Paris, Frankreich; IPDH: Institut für Geflügelkrankheiten, Hannover; RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, Niederlande; AHL: Animal Health Laboratory, South Perth, Australien; ZfV: Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover; DKFZ: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg; TiHo: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; C.: *Cavibacter*, F.: *Fusobacterium*; O.: *Oceanivirga*, L.: *Leptotrichia*; R. n.: *Rattus norvegicus*; R. r.: *Rattus rattus*; S.: *Streptobacillus*; Se.: *Sebadella*; Sn.: *Sneathia*; RBF: Rattenbissfieber; RaTu: Rachtentupfer; AUS: Australien; FRA: Frankreich; GB: Großbritannien; GER: Deutschland; HON: Hong Kong; IRL: Irland; JAP: Japan; NL: Die Niederlande; REU: La Réunion; NOR: Norwegen; SWE: Schweden; USA: Vereinigte Staaten von Nordamerika.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.2 Phylogenetische Untersuchungen

Im Gegensatz zu einer verwandtschaftlichen Einteilung bei den Eukaryoten, welche vornehmlich auf Basis ihrer unterschiedlichen Differenzierung eine deutlich unterschiedliche Morphologie aufweisen, sind diese morphologischen Unterschiede nicht zwangsläufig auch auf Prokaryoten übertragbar. Vielmehr wurde neben der Relevanz einer phylogenetisch fundierten Bakterientaxonomie [Fox *et al.* 1980, Woese 1987] bereits frühzeitig auf die geringe taxonomische Aussagekraft morphologischer und physiologischer Merkmale und die damit verbundenen Schwierigkeiten hingewiesen [Woese 1987, Stackebrandt & Goodfellow 1991]. Im Gegenteil birgt ein Vergleich von Prokaryoten allein auf morphologischer Basis die Gefahr einer künstlichen, unwirklichen Einteilung, sodass phylogenetische Systeme von Prokaryoten zwangsläufig und primär unter Einbeziehung genomischer Informationen gestützt werden müssen. Die in dieser Arbeit untersuchten Bakterienspezies zeichnen sich durch eine große morphologische Ähnlichkeit aus, welche auch in der Vergangenheit dazu führte, dass die wenigen aufgefundenen physiologischen Unterschiede nicht ausreichten, um Spezies als eigenständig zu erkennen [Fleming 1976, Hopkinson & Lloyd 1981, Hofmann 1994]. Dementsprechend groß erwies sich die Notwendigkeit für diese Arbeit, einerseits die relative Unbrauchbarkeit morphologisch-physiologischer Merkmale abschließend festzustellen und gleichzeitig mittels molekularer Erhebungen besser geeignete Marker zu etablieren, welche für zukünftige inter-spezifische Abgrenzungen eine höhere Aussagekraft bieten. Manche dieser molekularen Methoden gelten nach wie vor als Goldstandard wie beispielsweise die DDH zur Erkennung von Genomunterschieden zwischen verschiedenen Taxa (s. Kap. 2.1.5 u. 2.1.6). Durch die auch in dieser Arbeit verwendeten WGS ließen sich jedoch – verbunden mit bekannten praktischen Problemen infolge spärlichen Wachstums dieser Bakteriengruppe [Hofmann 1994] – besser standardisierbare Alternativen finden, welche die entsprechenden Fragestellungen einer Speziation besser beantworten konnten. Hier sind ANI, GGDC und POCP besonders hervorzuheben, welche letztlich durch eine Analytik der gemeinsamen orthologen Gene (MCG; s. Kap. 2.1.5) bestätigt wurden. Im Folgenden sind die Schritte bei der Erkennung und Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit neu beschriebenen Genera und Spezies der Familie *Leptotrichiaceae* aufgeführt.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.2.1 *Streptobacillus felis* sp. nov.

Ein vorläufig als *Streptobacillus* sp. bezeichnetes Isolat aus der Routinediagnostik bildete die Grundlage für die weiteren Untersuchungen mit diesem Erregerkomplex. Bei der Sektion einer gestorbenen Katze aus einem mittelhessischen Milchviehbetrieb wurde eine akute Bronchopneumonie diagnostiziert (s. **6.1**). Neben einem mäßigen Nachweis kontaminanter Bakterienspezies wurde ein hochgradiges Bakterienwachstum feiner, stecknadelspitzgroßer Kolonien festgestellt, welche ausschließlich bei kapnophiler und mikroaerophiler Kulturatmosphäre kultivierbar waren. Die Bakterien wurden präsumtiv als Gram-negative, pleomorphe, nicht sporenbildende, nicht säurefeste, fusiforme bis filamentöse Stäbchenbakterien mit teilweise sichtbaren Auftreibungen der Zellen bestimmt. Sie wuchsen insgesamt nur sehr zart und anspruchsvoll, das heißt ausschließlich bei einem Zusatz von Blut oder Serum zu den Nährmedien. Auf festen Nährmedien bildeten sich nach 72 h beigefarbene, feine, 0,1-0,2 mm große, trockene, wachs- bis butterartig krümelige, leicht konvexe Kolonien. Einzelne Kolonien konnten anhand ihrer „Spiegelei-Form“ als zellwandlose L-Formen identifiziert werden. In flüssigen Nährmedien bildete sich keine Trübung, sondern ein flockiger Bodensatz aus. Neben wachstumsbedingt variablen Ergebnissen in Bezug auf den Zuckerstoffwechsel erwies sich das Isolat als negativ für Zytochromoxidase, Katalase, Urease, Indolbildung und Nitratreduktion. Diese präsumtiven Merkmale in ihrer Gesamtheit sind indikativ für den RBF-Erreger *S. moniliformis* [De et al. 2010], welcher jedoch trotz seiner zoonotischen Relevanz in keinem kommerziell verfügbaren biochemischen Testlayout identifiziert werden kann. Auf Schafblutagar bildete sich eine zunächst sehr zart-vergrünende α -Hämolyse aus, welche sich nach etwa 14-tägiger Kultur zu einer vollständigen Hämolyse entwickelte. Ungeachtet der weitreichenden Übereinstimmungen mit der zum damaligen Zeitpunkt monotypischen Gattung ergaben sich Zweifel an der korrekten Spezieszuordnung zu *S. moniliformis*, weil sich das Isolat in seiner 16S rRNS-Sequenz nur zu 97,6% homolog zur Typspezies zeigte und sich die höchsten Homologien (98%) zu den Sequenzen einer nicht kultivierten *Streptobacillus* sp. einer Hundemaul-Mikrobiomstudie (*canine oral taxon 370 clone 2B078*; GenBank: JN713542.1; [Dewhirst et al. 2012]), gefolgt von den *Streptobacillus* sp.-Stämmen KWG2 und KWG24 (GenBank: AB330759 und AB330760; [Kimura et al. 2008]) aus wilden japanischen Ratten ergaben (s. a. **6.5**). Dennoch reichte dieser Abstand aus, dass zwei ursprünglich auf den Nachweis von

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

S. moniliformis hin ausgerichtetete, auf dem 16S rRNS-Gen beruhende PCRs auch die DNS des Katzenisolates amplifizierten, wobei eine dieser PCRs [Kimura *et al.* 2008] hinsichtlich einer veränderten Annealingtemperatur auf 53°C für 1 min optimiert werden konnte. So ließ sich erstmals für diese PCR eine diagnostische Sensitivität von 2×10^2 *S. moniliformis*-Bakterien belegen, bei welcher ebenfalls 10 pg eines seriell verdünnten, gereinigten DNS-Lysates von *S. moniliformis* DSM 12112^T, dotiert in homogenisiertem Rattenlungengewebe, nachzuweisen waren (s. 6.1). Auch fanden sich mittels der in dieser Arbeit erstmals diagnostisch eingesetzten Flugzeit-Massenspektrometrie zwar Belege für die korrekte Zuordnung zur Gattung *Streptobacillus*, jedoch auch Evidenzen für eine unbeschriebene Spezies (s. 6.1). Dieser Fragestellung wurde unter Ausnutzung eines Vergleichs weiterer funktioneller Gene sowie der Genomunterschiede zur Typspezies (Typstamm) der Gattung (*S. moniliformis*) nachgegangen (s. 6.2). Mittels einer konventionellen DDH konnte gezeigt werden, dass das Feldisolat von der Katze lediglich zu $\leq 19,9\%$ (reziproker Wert 28,7%) mit der DNS des Typstamms von *S. moniliformis* (DSM 12112^T) hybridisierte. Nach der gängigen Definition, wonach eine Homologie von $>70\%$ der beiden Vergleichsgenome auf dieselbe Subspezies einer Spezies und von $>60\%$ bis $<70\%$ auf unterschiedliche Subspezies einer Spezies hindeuten [Johnson 1984, Wayne *et al.* 1987], bestätigte sich die Hypothese, dass es sich bei dem Katzenisolat um eine eigenständige Spezies handelt. Diese Aussage wurde von unabhängigen phylogenetischen Analysen gestützt. Hierzu wurden die funktionellen Gene *gyrB*, *recA* und *groEL* ausgewählt, welche sich jüngst für die Beschreibung neuer *Leptotrichiaceae*-Taxa als hinlänglich diskriminatorisch und somit geeignet erwiesen hatten [Woo *et al.* 2010, Woo *et al.* 2014]. Für diese Vergleiche wurden neben den partiellen Nukleotid- auch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen berücksichtigt, um etwaige nicht-synonyme Ersetzungen auf Proteinebene nachvollziehen zu können [Glaeser & Kämpfer 2015]. Die für diese Zwecke hauptsächlich eingesetzte 16S rRNS-Gen-Sequenzanalyse wurde ebenfalls durchgeführt, musste jedoch wegen unzureichender Aussagekraft auf Speziesebene durch korrespondierende Ergebnisse der übrigen funktionellen Gene abgesichert werden [Glaeser & Kämpfer 2015]. Wichtig ist, dass die phylogenetischen Aussagen der jeweiligen Hierarchien und Algorithmen auf Gen- und Proteinebene prinzipiell dieselben Schlüsse zulassen [Glaeser & Kämpfer 2015]. Wie aus den Abbildungen 12-15 für die gesamte untersuchte Gruppe zu erkennen ist, entsprechen sich die Topologien der

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

phylogenetischen Bäume in Bezug auf das Katzenisolat weitestgehend, was zusätzlich durch die hohen *Bootstrap*-Werte (>70%) unterstützt wird. Demnach gehört das Katzenisolat eindeutig in die Gattung *Streptobacillus* und zeigt die nächste Verwandtschaft zu *S. moniliformis*, gefolgt von *S. hongkongensis* und *Sn. sanguinegens*.

Die eindeutige Trennung der drei damals bekannten *Streptobacillus*-Spezies auch von der nahe verwandten *Se. termitidis* wurde sowohl mittels MALDI-TOF MS als auch erstmals mittels FT-IR bei dieser Bakteriengruppe unter Beweis gestellt (s. 6.2).

Sehr viel schwächer wichten dagegen die physiologischen Unterschiede zwischen dem Katzenisolat und *S. moniliformis* (s. 6.1 u. 6.2). Zwar werden mit Cellobiose, Arginindihydrolase und einigen weiteren Reaktionen Unterschiede zwischen den beiden Typstämmen aufgezeigt. Diese verblassen allerdings vor dem Hintergrund einer intra-spezifischen Variabilität von *S. moniliformis* und dem ebenfalls nur schlecht biochemisch abgrenzbaren *S. hongkongensis* (s. 6.2 u. 6.3). Die physiologischen Parameter und hier insbesondere die niedrigen minimalen Hemmstoffkonzentrationswerte (MHK; s. Kap. 2.6) mit Ausnahme von Nalidixinsäure und potenzierten Sulfonamiden rechtfertigen wiederum eine Zuordnung zur selben Gattung, können das Katzenisolat jedoch nicht eindeutig von *S. moniliformis* und dem zwischenzeitlich beschriebenen *S. hongkongensis* [Woo *et al.* 2014] trennen. Dennoch erscheint es auf Basis der deutlichen molekularen und spektroskopischen Unterschiede gerechtfertigt, das Katzenisolat in Form einer eigenständigen, dritten Spezies abzugrenzen, welche aufgrund der Isolierung aus einer Katze und der klinischen Relevanz für diese Spezies als *S. felis* beschrieben wurde (s. 6.2). Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse machten es erforderlich, die Definitionen der Gattung *Streptobacillus* und der Typspezies *S. moniliformis* zu überarbeiten, indem die speziellen Kulturbedingungen einzelner obligat anaerober Stämme und das Hämolyseverhalten berücksichtigt wurden (s. 6.2).

Unter Einbeziehung von Gensequenzen aus Umweltproben (Phylotypen, OTUs) erscheint es auf Basis des aktuellen Datenbestands (Stand Dezember 2016) fraglich, ob es sich bei den *Streptobacillus*-Sequenzen aus dem Maul und dem Gastrointestinaltrakt von Hunden [Wouters *et al.* 2008, Xenoulis *et al.* 2008, Dewhirst *et al.* 2012] und auch den übrigen Nachweisen [Ditchfield *et al.* 1961, Das 1986] aus Hunden wirklich um *S. moniliformis* handelt. Auf Basis einer Phylotypen-

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

berücksichtigenden 16S rRNS-Gen-Phylogenie scheinen diese Sequenzen nämlich entfernter mit dem klassischen RBF-Erreger verwandt zu sein als mit *S. felis*, oder sie repräsentieren weitere, noch unbeschriebene Spezies (s. Abb. 16). Vor diesem Hintergrund müssen Berichte zu einer vermeintlichen Vektorrolle von Hunden [Maynard *et al.* 1986, Peel 1993, Anonym 1998, Torres *et al.* 2003, Wouters *et al.* 2008] und vielleicht auch Katzen [Gascard *et al.* 1967] für humanes RBF kritisch hinterfragt werden oder sind als Hinweise auf ein bislang unbekanntes zoonotisches Potential anderer Streptobazillen außerhalb von *S. moniliformis* zu werten.

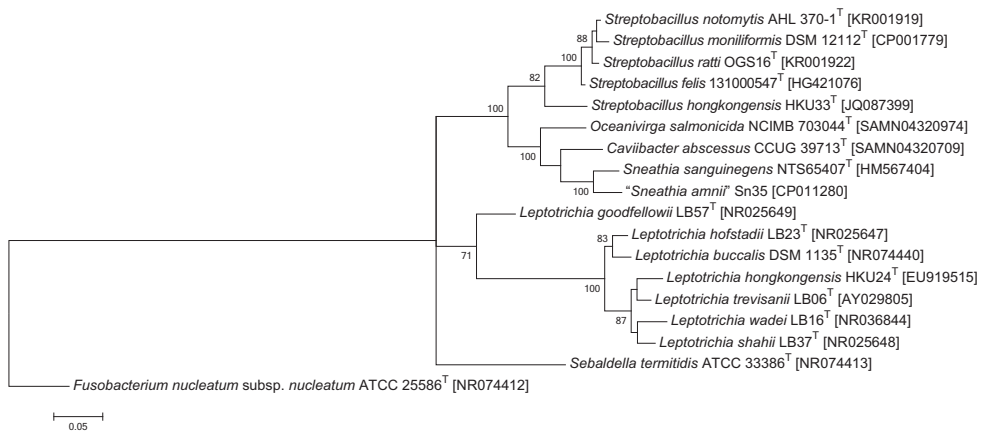


Abbildung 12: Phylogenetischer Baum der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welcher auf den partiellen 16S rRNS-Gensequenzen (1572 Nukleotide [nt]) beruht (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c]). Der Baum wurde in MEGA5.2.2 (Tamura & Nei, 1993) mittels Maximum-Likelihood Methode mit +G-Modell und 100 Wiederholungsberechnungen kalkuliert. Nummern an den Aufzweigungen zeigen *Bootstrap*-Werte >70% an. Belegnummern in Klammern; Außengruppe: *Fusobacterium nucleatum*; Maßstab: 0,05 nt-Austausche pro nt-Position.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Möglich erscheint auch, dass das Speziesspektrum von Streptobazillen in Ratten und anderen Nagern größer ist als angenommen (vgl. a. 6.5 u. 6.6), sodass als natürlicher Reservoirwirt von *S. felis* theoretisch auch ein Beutetier anstatt der Katze selbst infrage kommt. Bemerkenswert ist allerdings auch, dass trotz der bekanntermaßen regelmäßigen Kontakte zwischen Katzen und auch Hunden mit Ratten einerseits und der hohen Durchseuchung von Ratten mit *S. moniliformis* andererseits, bislang keine solchen Infektionen von Katzen und nur in extrem begrenztem Maße von Hunden [Ditchfield et al. 1961, Das 1986] bekannt geworden sind. Interessanterweise wurde abgesehen vom Typstamm inzwischen jedoch ein weiteres Streptobacillus-Isolat aus einer Katze in der Schweiz isoliert, welches auf Basis der hinterlegten Gensequenzen aus dieser Arbeit als *S. felis* identifiziert werden konnte (V. PERRETEN, persönliche Mitteilung).

5.2.2 *Streptobacillus notomytis* sp. nov.

Ein Fallbericht beschreibt ein verlustreiches Infektionsgeschehen, welches sich 1979 im Zoo von Perth bei endemischen Hüpfmäusen ereignete und bei dem der isolierte Erreger zunächst als *S. moniliformis* angesprochen wurde [Hopkinson & Lloyd 1981]. Der Ausbruch verlief als septikämische, akut letale Infektionswelle, welcher sieben von 20 Individuen zum Opfer fielen (s. Kap. 2.3.4.2). Während der Sektion zeigten die Tiere geschwollene Lebern mit Hepatozytennekrosen und Mikroabszessen als alleinigen histo-pathologischen Veränderungen. Die Autoren spekulieren, dass in die Käfige der Hüpfmäuse wiederholt eingedrungene wilde Ratten (genaue Rattenspezies unbekannt) den Erreger durch Bisse übertragen haben könnten [Hopkinson & Lloyd 1981]. Ein repräsentativer Stamm AHL 370-1^T dieser Serie stand auch bereits anderen Autoren für Vergleiche zur Verfügung [Costas & Owen 1987, Boot et al. 1993, Hofmann 1994]. So fand sich in einer Ganzzellproteinanalyse ein für diesen Stamm gegenüber den übrigen 21 *S. moniliformis*-Stämmen abweichendes Proteinauftrennungsmuster, welches lediglich zu <79% homolog zu den übrigen untersuchten Stämmen war [Costas & Owen 1987]. Dieselbe Arbeit zitiert auch eine persönliche Mitteilung, nach welcher ebenfalls serologische Unterschiede für diesen Stamm bestehen sollen, wenngleich Boot et al. keine Antigenunterschiede zwischen *S. moniliformis* und Stamm AHL 370-1^T finden konnten [Boot et al. 1993]. Auch in den Untersuchungen von Hofmann erwies sich dieser Stamm als phänotypisch und

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

genotypisch unterschiedlich zu einer Reihe von 15 ebenfalls getesteten *S. moniliformis* [Hofmann 1994]. Diese bestanden vornehmlich in einer fehlenden Schwefelwasserstoff-Produktion und Aktivität von Valin- und Cystin-Arylamidase bei vorhandener α -Glukosidase-Aktivität. Eine damals ebenfalls durchgeführte Untersuchung des partiellen 16S rRNS-Gens sowie eine mit 60-70% Homologie durchgeführte DDH konnten aber keine ausreichenden Argumente für die Eigenständigkeit auf Speziesebene finden [Hofmann 1994]. Demzufolge kam Hofmann (1994) zu dem Schluss, dass der Stamm AHL 370-1^T in eine eigene Subspezies einzuordnen ist. Inzwischen konnten in einer vergleichenden Untersuchung einer größeren Anzahl von *Streptobacillus*-Isolaten nicht nur weitere Hinweise für die Eigenständigkeit von Stamm AHL 370-1^T, sondern auch Parallelen zu zwei Stämmen (KWG2, KWG24) von wilden japanischen Hausratten gefunden werden (s. **6.3**). Erst eine über die 16S rRNS-Gen-basierte Phylogenie hinausgehende Analytik durch Zuhilfenahme weiterer funktioneller Gene bestätigte letztlich die Speziesgleichheit von AHL 370-1^T, KWG2 und KWG24, welche zur Beschreibung der wegen ihres ersten Auffindens bei Hüpfmäusen (*Notomys alexis*) als *S. notomytis* benannten Spezies geführt hat (s. **6.5**). Die den japanischen Stämmen zugrundeliegende Publikation erkannte ebenfalls bereits Unterschiede vorrangig innerhalb der ersten 300 Nukleotide des partiellen 16S rRNS-Gens von insgesamt drei abweichenden Stämmen (zum dritten Stamm OGS16^T s. Kap. 5.2.3), interpretiert diese jedoch im Zusammenhang mit einer abweichenden Wirtsspezies (*R. rattus* gegenüber *R. norvegicus*; [Kimura *et al.* 2008]). Wegen des weiten Zurückdrängens ist die Hausratte (*R. rattus*) mancherorts inzwischen vom Aussterben bedroht, sodass ein Beweis für eine unterschiedliche Ko-Evolution von Wirtsspezies und Erregerspezies, wie er beispielsweise bei Leptospiren beschrieben ist [Mayer-Scholl *et al.* 2014], noch aussteht, denn die Mehrzahl der untersuchten klinischen *Streptobacillus*-Stämme und -Isolate stammt von Wanderratten (*R. norvegicus*) oder nicht näher determinierten Wirtsspezies (s. **6.3**). Dennoch belegen die unabhängigen Isolierungen aus Australien und Japan, dass der Erreger geographisch weiter verbreitet ist und – wengleich noch nicht bei Menschen – durchaus zu einer RBF-analogen Klinik befähigt scheint [Hopkinson & Lloyd 1981]. Der phänotypisch fast nicht von *S. moniliformis* unterscheidbare *S. notomytis* zeichnet sich neben den schon beschriebenen durch folgende Unterschiede, auch gegenüber *S. hongkongensis* und *S. felis* aus:

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die auf dem 16S rRNS-Gen beruhenden Unterschiede sind mit 99,4% und 99,0% Sequenzhomologie gegenüber *S. moniliformis* und *S. felis* zu gering, um eine eigenständige Spezies daraus ableiten zu können, gegenüber *S. hongkongensis* (95.6%) jedoch größer (s. **6.5**). Das nächst näher verwandte Taxon einer anderen Gattung ist *Sn. sanguinegens* (92.9%). Weiterhin sind die schon für *S. felis* benannten vergleichenden Untersuchungen der funktionellen Gene *rpoB*, *groEL* und *recA* und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen eindeutiger differenzierend und belegen klar die Zuordnung von *S. notomytis* zur Familie *Leptotrichiaceae*, die Zugehörigkeit zur Gattung *Streptobacillus* und die Eigenständigkeit gegenüber den drei übrigen *Streptobacillus*-Spezies. Dabei war die Topologie sämtlicher Bäume identisch, wonach auch die drei *S. notomytis*-Stämme einen monophyletischen Ursprung haben (s. **6.5**) und – nach Beschreibung einer fünften *Streptobacillus*-Spezies – zwischen *S. moniliformis* und *S. felis* ein eigenes Cluster bilden, was durch sehr hohe *Bootstrap*-Werte untermauert ist (s. Abb. 12-15). Obwohl bei *S. felis* genutzt, erwiesen sich konventionelle DDH bei Streptobazillen schon allein wegen ihres spärlichen Wachstums und der bereits bei Hofmann (1995) insbesondere mit Stamm AHL 370-1^T gemachten Erfahrungen als problematisch. Eigene vergleichende Untersuchungen konnten hingegen die durchschnittliche Basengleichheit (ANI) als gut geeignetes *in-silico*-Instrument für Genomvergleiche bei der Gattung *Streptobacillus* überprüfen (s Kap. 5.4 u. **6.3**). Der Vergleich zwischen AHL 370-1^T und dem Typstamm (*S. moniliformis* DSM 12112^T) der Gattung ergab einen ANI-Wert von 87.16% und somit einen belastbaren Beweis für die Eigenständigkeit von *S. notomytis* (s. **6.5**). Hingegen wies der Stamm AHL 370-1^T gegenüber KWG2 und KWG24 ANI-Werte von 98.72 und 96.79% auf und belegt nach gängiger Definition dadurch Konspezifität [Richter & Rossello-Mora 2009]. Als generelle Überprüfung der ANI-Methodik und um statistische Absicherungen in Form von Konfidenzintervallen zu erfassen, wurde zusätzlich ein eigenständiger direkter, ANI-unabhängiger Vergleich zweier Genome mittels GGDC (vers. 2.0; <http://ggdc.dsmz.de/>) verwendet [Meier-Kolthoff *et al.* 2013], für welchen sogar noch eine höhere Übereinstimmung zur konventionellen DDH postuliert wird (s. **6.5**).

Beide für den Nachweis von *S. moniliformis* publizierte PCR-Protokolle [Kimura *et al.* 2008, Rohde *et al.* 2008] erzeugten die in der Gelelektrophorese detektierten charakteristischen Amplifikate von ungefähr 269 und 1222 bp Länge, wiesen somit auch *S. notomytis* nach.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Während keine mikro- oder koloniemorphologischen Unterschiede von *S. notomytis* gegenüber den anderen *Streptobacillus*-Spezies gefunden wurden und auch das Spektrum an Nährmedien und die atmosphärischen Kultivierungsbedingungen vergleichbar waren, bestanden dennoch Unterschiede in einer besonders kleinen Koloniegröße und einem noch spärlicheren Wachstum der Spezies *S. notomytis* (s. **6.5**). Auch konnte diese Spezies mittels spektroskopischer Verfahren anhand ihres ribosomalen Proteinmusters (MALDI-TOF MS) sowie einer auf sämtlichen Biomolekülen beruhenden Analytik (FT-IR; [Naumann 2000]) eindeutig von den übrigen Spezies unterschieden werden (s. Abb. 17, 18, Kap. 5.3.3, 5.3.4, **6.3** u. **6.5**). Dabei entsprach die Topologie der MALDI-TOF-Klusteranalyse derjenigen der Phylogenien.

In Bezug auf eine eindeutige Spezieszuordnung ergeben sich größere Unsicherheiten bei der biochemischen Charakterisierung. Ein Vergleich der *Streptobacillus*-Typstämme mittels eines kommerziell verfügbaren Testsystems (VITEK2-compact, NH-Karte) lässt zumindest unterschiedliche Bioprofile erkennen. Durch einen Vergleich mit jeweils weiteren Stämmen erweisen sich diese Unterschiede jedoch nicht mehr als speziesspezifisch, sodass eine Unterscheidbarkeit allein durch biochemische Methoden ebenfalls nicht gegeben ist (s. **6.3** u. **6.5**, vgl. Tabelle 3). Die Kombination aus Zell- und Kulturmorphologie, Wachstumsansprüchen und der bereits für *S. felis* geschilderten einheitlich negativen Schlüsselreaktionen für Zytochromoxidase, Katalase, Urease, Indolbildung und Nitratreduktion können dennoch für eine präsumtive Gattungsdiagnose sehr hilfreich sein.

Mittels Mikrobouillondilution lassen sich für die bislang beschriebenen *Streptobacillus*-Spezies sehr ähnliche MHK-Profile für die einzelnen Wirkstoffe feststellen. Demnach fällt auch *S. notomytis* durch niedrige MHK-Werte gegenüber den meisten getesteten Wirkstoffen mit Ausnahme von Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Colistin und Streptomycin auf (s. Tabelle 4). Allerdings muss – wie bereits im Kapitel „Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung“ (s. Kap. 2.6) erwähnt – darauf hingewiesen werden, dass es in Ermangelung von klinischen Grenzwerten durch ein Normungsinstitut für die in dieser Arbeit beschriebenen Mikroorganismen lediglich sinnvoll ist, die MHK-Werte vergleichend zu diskutieren, ohne jedoch eine Interpretation der Wirksamkeit unter *in vivo*-Bedingungen vorzunehmen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Es fallen weiterhin sehr ähnliche Fettsäuremuster wie bei *S. moniliformis* auf, welche durch C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} und C_{18:2} (Summenbestandteil 5) charakterisiert sind. Auch diese sollten daher lediglich zur Gattungdiagnose, nicht aber, wie von manchen Autoren beschrieben, zur diagnostischen Speziesbestimmung verwendet werden [Rowbotham 1983, Rygg & Bruun 1992, Pins *et al.* 1996].

5.2.3 *Streptobacillus ratti* sp. nov.

Der Typstamm OGS16^T von *S. ratti* wurde schon in einer japanischen Studie als auf Basis der 16S rRNS-Gensequenz von *S. moniliformis* abweichender Stamm beschrieben und stammt von ehemals wilden Hausratten ([Kimura *et al.* 2008]; s. **6.6**). Im Gegensatz zu den beiden Paratypstämmen von *S. notomytis* (KWG2, KWG24) wurde in eigenen Untersuchungen bereits die Unterschiedlichkeit von OGS16^T erkannt (*Streptobacillus* sp. 2', s. **6.3**). Jedoch stand für diese Studie zunächst nur die DNS dieses Stammes zur Verfügung. Hier gliedert sich *S. ratti* in der *groEL*- und *recA*-basierten Phylogenie als Schwester-Taxon zu *S. notomytis*, wohingegen die Spezies auf Basis des 16S rRNS-Gens ein Schwester-Taxon zu *S. moniliformis* und beim *gyrB*-Gen eines zu *S. moniliformis* und *S. notomytis* bildet (s. Abb. 12-15, **6.6**). Diese Topologie spiegelt sich auf Aminosäureebene nur in der GroEL-Phylogenie so wider, in Bezug auf das Rekombinase A-Protein (RecA) ist *S. ratti* Schwester-Taxon mit *S. moniliformis*, und bei der Gyrase B-Untereinheit (GyrB) klustert *S. ratti* neben *S. moniliformis* und weiterhin neben *S. notomytis* (s. Abb. 12-15, **6.6**). Dies unterstreicht zum einen die Notwendigkeit des Vergleichs der unterschiedlichen Auswirkungen der Nukleotid- auf die Aminosäureebene [Glaeser & Kämpfer 2015] und belegt zudem eine sehr nahe Verwandtschaft von *S. ratti* zu den beiden vorgenannten Taxa. Dabei reicht allein die Betrachtung der 16S rRNS-Gen-basierten Unterschiede zu *S. moniliformis*, *S. notomytis* und *S. felis* mit 99,3%, 99,0% und 98,6% definitionsgemäß nicht aus, um die Eigenständigkeit von *S. ratti* zu erkennen [Glaeser & Kämpfer 2015]. Erwartungsgemäß wird *S. ratti* aufgrund der hohen 16S rRNS-Gen-Homologie daher auch in den beiden ursprünglich *S. moniliformis*-spezifischen PCRs erkannt. In Bezug auf die übrigen funktionellen Gene und auch zu *S. hongkongensis* (95,5% 16S rRNS-Gen-Homologie) bestehen jedoch höhere Distanzen. Alle Phylogenien belegen zweifelsfrei die Unterschiedlichkeit von *S. ratti* zu den übrigen Gattungen der Familie, und die ANI-Vergleiche zu *S.*

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

moniliformis DSM 12112^T sowie den übrigen Typstämmen unterstützen mit lediglich 74,8-89,1% ferner die Stellung einer eigenständigen Spezies. Diese Ergebnisse sind erneut anhand der im Kapitel 5.1.2 beschriebenen Vorgehensweise in einer *in-silico* DDH überprüft und bestätigt worden (s. **6.6**).

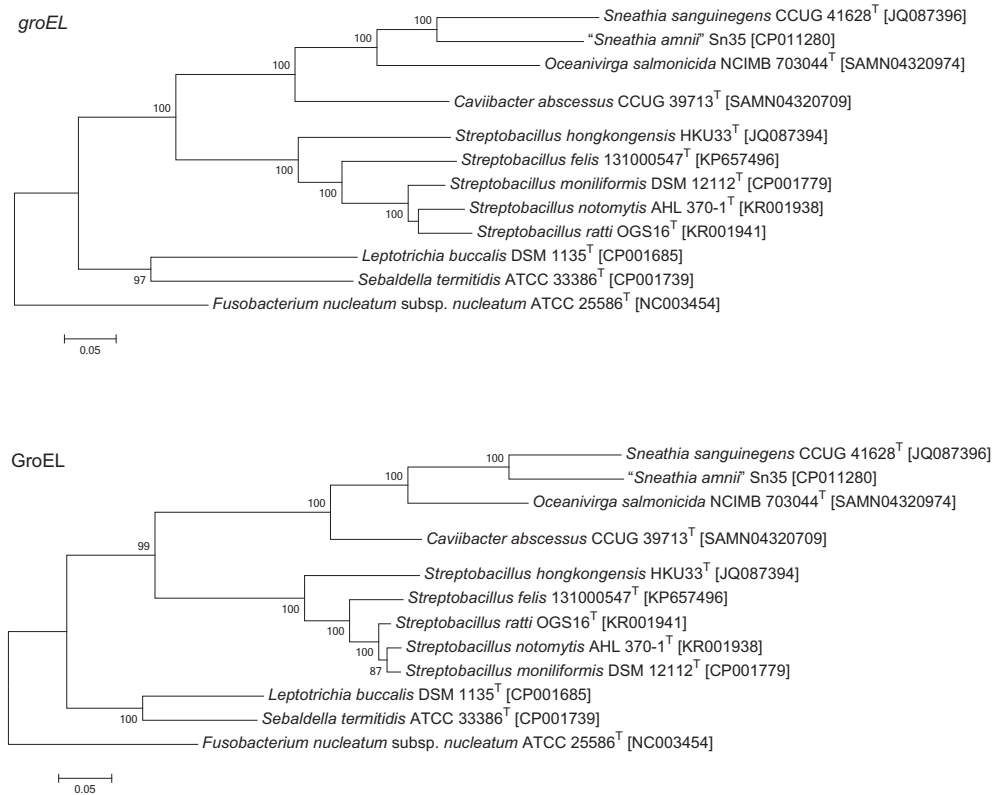


Abbildung 13: Phylogenetische Bäume der Typstämmе sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *groEL*-Gen- (1626 Nukleotide [nt]) und GroEL-Aminosäuresequenzen (539 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c]). Die Bäume wurden in MEGA5.2.2 (Tamura, *et al.*, 2011) mittels Maximum-Likelihood Methode mit GTR+G+I Modell (nt) oder dem JTT+G+I Modell (AS) und 100 Wiederholungsberechnungen kalkuliert. Nummern an den Aufzweigungen zeigen *Bootstrap*-Werte >70% an. Belegnummern in Klammern; Außengruppe: *Fusobacterium nucleatum*; Maßstab: 0,05 nt- und 0,05 AS-Austausche pro nt- oder AS-Position.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die für die Speziesbeschreibung erforderliche Untersuchung physiologischer Merkmale bestätigte die Erfahrungen mit den anderen Taxa. Demnach ist es nicht oder nur mit kleineren Unterschieden möglich, eindeutig diskriminierende morphologische oder kulturelle Unterschiede, Stoffwechselfparameter, Fettsäuremuster oder Resistenzphänotypen zu benennen, welche *S. rattii* von den anderen *Streptobacillus*-Taxa unterscheiden (s. Tabellen 3-5 u. 6.6). Auch der *S. rattii*-Typstamm wächst mit einer α -Hämolyse, eine Eigenschaft, welche ihn allerdings auch mit einigen Stämmen von *S. moniliformis*, *S. hongkongensis* und *S. felis* verbindet (s. 6.2). Mittels MALDI-TOF MS war es vergleichsweise einfach möglich, alle *Streptobacillus*-Spezies inklusive *S. rattii* voneinander zu unterscheiden, sofern man über selbst erstellte Datenbankeinträge verfügt, welche der kommerziellen Datenbank hinzugefügt werden müssen. Es konnten die Ergebnisse der Phylogenien, insbesondere die nahe Verwandtschaft zu *S. moniliformis* und *S. notomytis*, auch mittels MALDI-TOF MS bestätigt werden (s. Abb. 17). Die in dieser Arbeit verwendeten Spektreninformationen wurden nach einem festgelegten Qualitätsstandard erstellt und in einer offenen Datenbank für Anwender der unlängst geschaffenen MALDI-User Platform eingestellt (s. 6.11).

Interessanterweise bestehen für die eingangs hypothetisierte Ko-Evolution zwischen Erregern und ihren Wirten (s. Kap. 5.2.2) bei *S. rattii* biogeografische Informationen, die solche Thesen stützen könnten. Demnach wurde Stamm OGS16^T von einer in einer Schädlingsbekämpfungsfirma gezüchteten Hausratte isoliert, deren Vorfahren 1989 auf der Insel Chichijima, einer der Ogasawara (Bonin) Inseln, welche ungefähr 1000 km vor der Südküste Japans liegt, gefangen und seitdem separiert gehalten worden waren (K. IMAOKA, pers. Mitteilung). Die lange und dauerhafte Separation vom Festland könnte zu einer separaten Speziation von *S. rattii* geführt haben, was durch Folgeuntersuchungen zu belegen wäre.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

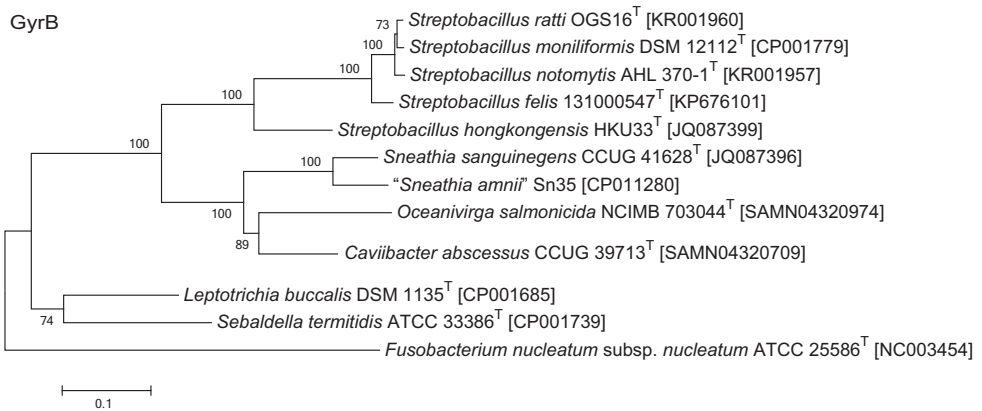
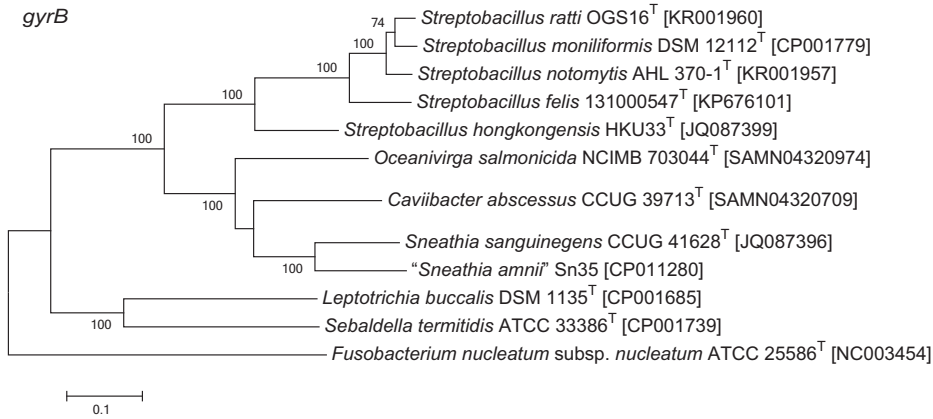


Abbildung 14: Phylogenetische Bäume der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *gyrB*-Gen- (2034 Nukleotide [nt]) und *GyrB*-Aminosäuresequenzen (677 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c]). Die Bäume wurden in MEGA5.2.2 (Tamura, *et al.*, 2011) mittels Maximum-Likelihood Methode mit GTR+G+I Modell (nt) oder dem JTT+G+I Modell (AS) und 100 Wiederholungsberechnungen kalkuliert. Nummern an den Aufzweigungen zeigen *Bootstrap*-Werte >70% an. Belegnummern in Klammern; Außengruppe: *Fusobacterium nucleatum*; Maßstab: 0,1 nt- und 0,1 AS-Austausche pro nt- oder AS-Position.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.2.4 *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. („*Streptobacillus moniliformis*“ von Meerschweinchen)

Bereits in den ersten Beschreibungen vor 75 Jahren mutmaßt Smith (1941), dass der ursächliche Erreger dieser Meerschweinchenerkrankung möglicherweise nicht der RBF-Erreger *S. moniliformis* sei, sondern dass „zukünftig noch mehr Erregerspezies mit dezidierten Krankheitsbildern in anderen Wirtsspezies aus der Gattung *Haverhillia* (synonym *Streptobacillus*)“ gefunden werden [Smith 1941].

Sämtliche bekannt gewordenen Isolate und Berichte betreffen natürliche Infektionen bei Meerschweinchen (*Cavia porcellus*; [Smith 1941, Aldred *et al.* 1974, Fleming 1976, Kirchner *et al.* 1992, Boot *et al.* 2007, Elliott 2007]), weshalb der Gattungsname ‚*Caviibacter*‘ und das Speziesepitheton ‚*abscessus*‘ wegen der typischen klinischen Manifestation in Form eitrig-abszedierender Lymphadenitiden gewählt wurden. Die Grundlage für die Beschreibung dieses Taxons in einer neuen Gattung bildeten zwei Isolate, welche aus typischen Zervikallymphknotenabszessen bei Meerschweinchen isoliert worden waren (s. Kap. 2.3.4 u. **6.7**). Während CCUG 39713^T bereits 1998 in Schweden isoliert wurde, stellt 151011837 ein deutsches Isolat aus dem Jahr 2015 dar.

Wie schon bei den vorangegangenen Speziesbeschreibungen wurden die genetischen und physiologischen Merkmale für *C. abscessus* mit den übrigen Vertretern verglichen. Während beide *C. abscessus*-Stämme hinsichtlich ihrer 16S rRNS-, *rpoB*, *groEL* und *recA*-Gene identisch waren und einen ANI-Wert von 99,57% besaßen, divergierten die übrigen *Leptotrichiaceae*-Taxa erheblich. So ergab eine 16S rRNS-Gen-Phylogenie die nächst verwandten Spezies *Sn. sanguinegens* (93.4% Homologie) und „*Sn. amni*“ (93.2%), gefolgt von den Typstämmen *S. moniliformis* (91.3%), *S. ratti* (91.2%), *S. notomytis* (91.0%), *S. hongkongensis* (90.9%) und *S. felis* (90.9%). Alle übrigen Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae* zeigten weniger als 89% Homologie. Die hohen Distanzen zu den *Streptobacillus*-Spezies erklären, warum die ebenfalls auf dem 16S rRNS-Gen beruhenden PCR-Systeme *C. abscessus* nicht erkennen [Kimura *et al.* 2008, Rohde *et al.* 2008, Eisenberg *et al.* 2015a]. Interessanterweise scheinen Meerschweinchen allerdings noch weitere *Leptotrichiaceae* zu beherbergen, was durch eine Unspezifität eines Vorläufers der PCR nach Kimura (2008) offenbar wurde und sich als deutlich von

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

C. abscessus verschiedene und möglicherweise unbeschriebene *Leptotrichia* sp. herausstellte [Boot *et al.* 2008] (s. **6.7**).

Unter Berücksichtigung ausgewählter Phylotypen (Stand Dezember 2016) bestand die höchste 16S rRNS-Gen-Homologie zu den Genomsequenzen '*Leptotrichiaceae* bacterium UTK MI 14-3285' (KR612328; 99.9%) aus einem Zervikalabszess eines Meerschweinchens aus den USA, gefolgt von '*Eubacterium* clone E1-K6' aus einem Korneageschwür (AJ289183; 94.6%) [Schabereiter-Gurtner *et al.* 2002], (Abb. 16, s. **6.7 [Fig. S1]**).

Nahezu identische Topologien der entsprechenden Bäume ergaben sich auch für die Nukleotid- und Aminosäureanalysen der anderen funktionellen Gene (Abb. 12-15). Gegenüber den Typstämmen der am nächsten verwandten Gattungen *Sn. sanguinegens* und *S. moniliformis* ergaben sich für *C. abscessus* CCUG 39713^T ANI-Werte von lediglich 72.05% und 70.42% und für alle übrigen Spezies der Gruppe von 67,14-71.42%. Diese Werte wurden durch die erneut durchgeführte *in-silico* DDH mit Werten <22.10% gegenüber allen verfügbaren *Leptotrichiaceae*-Genomen bestätigt [Meier-Kolthoff *et al.* 2013].

Erneut erwies sich auch für diese Spezies die Flugzeit-Massenspektrometrie als einfach durchzuführende, robuste und anderen phänotypischen Tests überlegene Methode, welche alle bislang beschriebenen Spezies deutlich voneinander zu unterscheiden vermochte (Abb. 17).

Weniger für eine Trennung auf Speziesebene geeignet zeigten sich wiederum die physiologischen Parameter der Biochemie und Fettsäureanalytik. Nachfolgend sind die schon für die anderen Gattungen dargestellten prinzipiellen Wachstumsbedingungen, Kultur- und Stoffwechselcharakteristika verkürzt dargestellt. Nach 2-5 Tagen wachsen die *C. abscessus*-Stämme CCUG 39713^T und 151011837 obligat anaerob auf Nährmedien mit Blut- oder Serumzusatz als besonders winzige, 0.1-0.4 mm große Kolonien ohne Hämolyse, gelegentlich kommt es zur Bildung von L-Formen, und in flüssigen Medien bildet sich ein flockiger Bodensatz ohne Trübung der Bouillon. Die Zellformen der Gram-negativen Stäbchenbakterien sind pleomorph wie bei *Streptobacillus*. Wichtige negative Schlüsselreaktionen sind erneut Zytochromoxidase, Katalase, Nitratreduktion und Indolbildung. Weitere physiologische Merkmale finden sich in Tabelle 3. Die

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Hauptfettsäureanteile stellen $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1\omega9c}$ und $C_{18:2\omega6,9c/18:0}$ ANTE dar (s. Tab. 5) und unterscheiden sich somit nicht von den *Streptobacillus*-Spezies [Rowbotham 1983, Rygg & Bruun 1992, Pins *et al.* 1996]. Im Resistenztest zeigen die bislang untersuchten *C. abscessus*-Stämme erhöhte MHK-Werte für Colistin, Spectinomycin, Erythromycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (s. Tab. 4), womit sie sich prinzipiell nicht von *Streptobacillus*-Spezies unterscheiden (s. **6.7**).

Es existierten lange Zeit keine eindeutigen Kriterien oder Definitionen für Unterschiede, welche eine neue Gattung gegenüber einer neuen Spezies begründen. Als Bezugsgröße wurde kürzlich der POCP-Wert als Prozentsatz konservierter Proteine eingeführt [Qin *et al.* 2014]. Die Autoren schlagen aufgrund ihrer Ergebnisse vor, dass neben weiteren Kriterien zwei Bakterientaxa besser in unterschiedliche Gattungen aufgeteilt werden sollten, sofern der abgeleitete Prozentsatz der konservierten Proteine geringer als 50% ausfällt [Qin *et al.* 2014]. Dies ist für den *C. abscessus*-Typstamm mit Werten zwischen 30-40% der Fall. Andere Autoren fordern darüber hinaus, dass unterschiedliche Gattungen nicht allein auf genetischen, sondern auch auf phänotypischen Unterschieden gegründet werden sollten [Tindall *et al.* 2010, Kämpfer 2012]. Auf Basis der für *Caviibacter* vorliegenden Werte lässt sich eine eigenständige Gattung allerdings auch aufgrund der folgenden Argumente gut rechtfertigen: Aus sämtlichen phylogenetischen Untersuchungen leitet sich die monophyletische Stellung dieses Taxons ab, und die ANI-Werte sind durchweg niedriger als bei den neuen *Streptobacillus*-Spezies (s. **6.7**). Die Gattung *Caviibacter* zeigt substantielle Unterschiede zu den beiden nächst verwandten Gattungen: gegenüber *Streptobacillus* fallen die bereits historisch einheitlich festgestellten, obligat anaeroben Wuchsbedingungen auf. Währenddessen scheint es sich bei den bislang bekannten *Sneathia*-Spezies um Erreger zu handeln, welche vorrangig oder sogar ausschließlich die Schleimhäute des humanen Genital- und Darmtrakts besiedeln und bei den auftretenden klinischen Episoden regelmäßig lokale Schleimhautinfektionen oder systemische Komplikationen, selten Arthritis, aber noch nie Abszesse verursachten. Gleiches muss bislang auch für die *Sneathia*-Spezies in Tieren vermutet werden, denn alle derartigen Nachweise beschränken sich derzeit auf Sequenzen aus den Genital-Mikrobiota von Makaken, Schafen und Kühen (s. Kap. 2.2.2 u. 2.3.3). Bislang ist *C. abscessus* ausschließlich bei Meerschweinchen nachgewiesen worden, sodass zu mutmaßen ist, dass dieser Erreger ausschließlich und mit einem typischen klinischen Bild bei dieser

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wirtsspezies auftritt. Meerschweinchen schienen im Gegensatz sogar resistent gegenüber *S. moniliformis* zu sein [Boot *et al.* 2007]. Zwar sind auch bei Menschen, Ratten und Mäusen Abszesse durch *S. moniliformis* beschrieben worden [Wullenweber *et al.* 1990, Pins *et al.* 1996, Rohde *et al.* 2008, Addidle *et al.* 2012], jedoch zeigt sich meist darüber hinaus ein für die jeweiligen Spezies vielgestaltigeres Krankheitsbild.

5.2.5 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. („*Streptobacillus* sp.“ von Atlantischen Lachsen)

Der Anfang der 1990er Jahre erstmals bei in Aquakultur gehaltenen Atlantischen Lachsen in Irland aufgetretene Erreger mit entscheidenden Parallelen zu *Streptobacillus* wurde im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit einer erneuten Betrachtung unterzogen. Die damals auf diesen Erreger zurückzuführende, verlustreiche Fischerkrankung ist seitdem nicht wieder aufgetreten und auch anderswo nicht zur Kenntnis gelangt. Die Autoren der Erstbeschreibung der Erkrankung schlossen, dass der Erreger zu einer neuen Spezies oder Gattung gehören könnte [Maher *et al.* 1995]. Auf Basis der bemerkenswerten DNS-Heterogenität dieses Erregers zeigten die erhobenen Daten, dass dieser am besten in eine neu zu etablierende Gattung innerhalb der Familie Leptotrichiaceae gestellt werden sollte.

Die damals publizierte 16S rRNS-Gensequenz (GenBank: X83517.1) ist aufgrund technischer Sequenzierfortschritte nur zu 97,94% identisch mit derjenigen aus dem unlängst erstellten Genom des einzig konservierten Stamms AVG2115T (NCIMB 703044T). Die größte Sequenzhomologie bestand seinerzeit zu *S. moniliformis* mit 90,3% [Maher *et al.* 1995]. Die Beschreibung neuer Spezies hat in der Zwischenzeit dazu geführt, dass die heute größten Homologien nicht mehr zu *S. moniliformis* [Maher *et al.* 1995], sondern zu *Sn. sanguinegens* und „*Sn. amnii*“ (92,5-92,7%), *C. abscessus* (92,2%) und erst danach zu den *Streptobacillus*-Spezies (89,7-91,3%) bestehen (s. **6.8**). Diese Distanz reicht dennoch aus, um ein Amplifikat in einer vermeintlich *S. moniliformis*-spezifischen PCR zu erzielen [Rohde *et al.* 2008], wohingegen die zweite PCR den Fisch-Erreger nicht erkennt [Kimura *et al.* 2008].

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

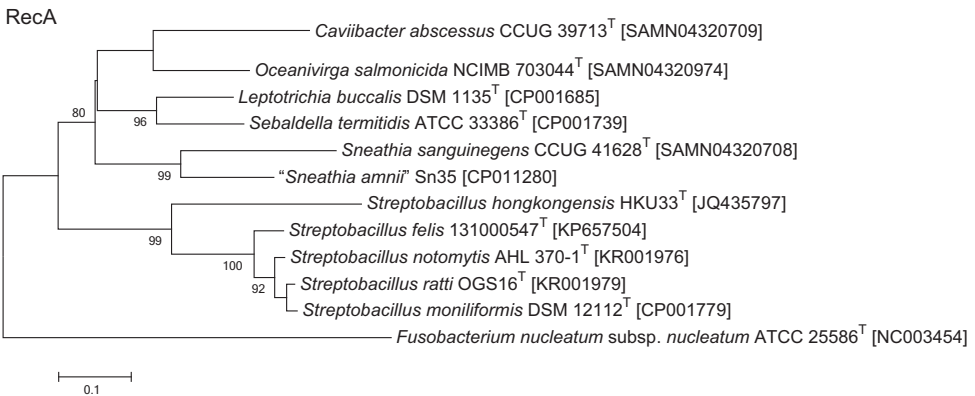
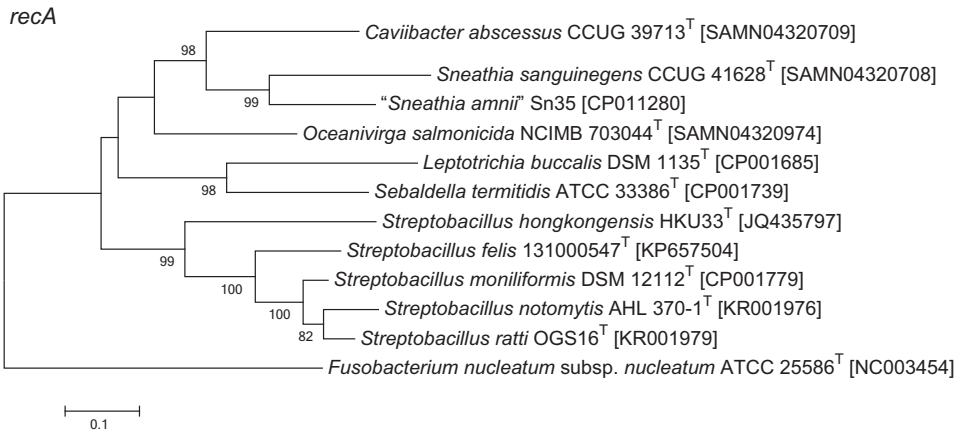


Abbildung 15: Phylogenetische Bäume der Typstämme sämtlicher Gattungen der Familie *Leptotrichiaceae*, welche auf den partiellen *recA*-Gen- (1156 Nukleotide [nt]) und RecA-Aminosäuresequenzen (392 [AS]) beruhen (modifiziert nach Eisenberg *et al.* [2016c]). Die Bäume wurden in MEGA5.2.2 (Tamura, *et al.*, 2011) mittels Maximum-Likelihood Methode mit GTR+G+I Modell (nt) oder dem JTT+G+I Modell (AS) und 100 Wiederholungsberechnungen kalkuliert. Nummern an den Aufzweigungen zeigen *Bootstrap*-Werte >70% an. Belegnummern in Klammern; Außengruppe: *Fusobacterium nucleatum*; Maßstab: 0,1 nt- und 0,1 AS-Austausche pro nt- oder AS-Position.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Interessanterweise finden sich die am nächsten verwandten Sequenzen in Umweltproben ebenfalls aus dem marinen Bereich, nämlich bei atlantischen und pazifischen Meeressäugern. Hierzu gehören mit 94-99% Sequenzhomologie unlängst veröffentlichte Sequenzen aus Gastrointestinaltrakt-Mikrobiomstudien freilebender und in Zoos gehaltener Flaschennasendelfine (*Tursiops truncatus*) und Kalifornischer Seelöwen (*Zalophus californianus*; [Bik *et al.* 2016]). Dennoch ist das natürliche Reservoir von *O. salmonicida* gegenwärtig noch unbekannt. Ob andere marine Säugetiere neben Seelöwen und Delfinen hierfür in Betracht kommen, ist ungewiss. Vorstellbar wären beispielsweise Seehunde, welche in unmittelbarer Nähe zu den Lachsfarmen vorkamen und – getrennt durch ein Netz – Kontakt zu den Lachsen hatten (R. PALMER, pers. Mitteilung).

Aufgrund der aufgefundenen Topologien und der genetischen Distanzen wurde für das neue Taxon der Gattungsname '*Oceanivirga*' (*O.*; eine genaue Zuordnung zu einem bestimmten Weltmeer ist derzeit unklar; *virga*, lateinisch: schlanker Ast, Stäbchen), also ein stäbchenförmiges Bakterium aus dem Salzwasser (von Meerestieren) und das Speziesepitheton '*salmonicida*' (*salmo*, *-nis*, lateinisch: Lachs; *-cida*, lateinisch von *caedo*: schneiden, töten, also 'Lachstöter') gewählt. Auch für *O. salmonicida* bestanden ähnliche Voraussetzungen wie für *C. abscessus* (s. Kap. 5.2.4) in Bezug auf die Eigenständigkeit innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae*, weshalb folgende Argumente für die Etablierung eines eigenen Genus herangezogen wurden: Die aus den Abbildungen 12-15 ersichtlichen Phylogenien auf Nukleotid- und Aminosäurebasis belegen erneut die Zugehörigkeit zur Familie *Leptotrichiaceae* und die monophyletische Stellung dieses Erregers. *Oceanivirga salmonicida* klustert separat, aber in einem gemeinsamen Ast mit den Gattungen *Caviibacter* und *Sneathia*, gefolgt von einem separaten Ast mit sämtlichen *Streptobacillus*-Spezies. Lediglich in den *recA/RecA*-Phylogenien erweisen sich – allerdings nur mit niedrigen *Bootstrap*-Werten – die Typspezies der Gattungen *Leptotrichia* und *Sebaldella* dichter mit dem Cluster *Oceanivirga/Caviibacter/Sneathia* verwandt als mit *Streptobacillus* (s. Abb. 15). Die separate Stellung von *Oceanivirga* wird durch die Werte der ANI und *in-silico* DDH wie bei den anderen Taxa gestützt: Zu den anderen *Leptotrichiaceae*-Taxa ergeben sich ähnlich stark abweichende ANI-Werte von 66.00% bis 72.08% wie bei *Caviibacter*, welche über die *in-silico* DDH von 19,2% \pm 2,29 bis 26,2% \pm 2,42 abgesichert sind. Die Gattungseigenständigkeit von *Oceanivirga* wird ferner durch die POCP-Werte zu den anderen Gattungen gestützt

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[Qin *et al.* 2014]: Die Gattungen *Oceanivirga* versus (vs.) *Caviibacter* besitzen lediglich 46,25%, *Oceanivirga* vs. *Sneathia* 41,03% und *Oceanivirga* vs. *Streptobacillus* nur 32,87% konservierte Proteine und rechtfertigen nach der Definition von Qin *et al.* (2014) und auf Basis zahlreicher phänotypischer Unterschiede [Tindall *et al.* 2010, Kämpfer 2012] somit unterschiedliche Gattungen.

Mithilfe der MALDI-TOF MS konnte Stamm NCIMB 703044^T wiederum eindeutig von den übrigen Vertretern der Familie *Leptotrichiaceae* unterschieden werden. Auch mit dieser Methode fanden sich die höchsten spektralen Gemeinsamkeiten mit *C. abscessus* (s. Abb. 17).

Bei den weiteren physiologischen Merkmalen stechen einige Parallelen insbesondere zu den Gattungen *Streptobacillus* und *Sneathia* wie etwa das anspruchsvolle und flockige Wachstum ohne Trübung in Flüssigmedien mit Serumzusatz, das Auftreten von L-Formen, die schon wiederholt beschriebenen negativen Schlüsselreaktionen für Zytochromoxidase, Katalase, Nitratreduktion und Indolbildung sowie homologe Hauptfettsäurekomponenten bestehend aus C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} and C_{18:2 ω 6,9c/18:0} ANTE hervor (s. **6.8**). Allerdings bestehen – zumindest auf Basis des Typstamms – auch klare Differenzen, wie ein Temperaturoptimum von nur 15-22°C, das aerobe und halophile Wachstum bei 1-2% Kochsalzkonzentration im Nährmedium und eine fehlende Übereinstimmung in den MHK-Werten.

Über die im Kapitel 2.5.5 beschriebenen Wachstumsbedingungen hinausgehenden physiologischen Merkmale sind in Tabelle 3 hinterlegt. Demnach ist eine allein auf diesen Kriterien basierende Unterscheidbarkeit auf Spezies- oder Gattungsebene erneut nicht gewährleistet. Die Untersuchungen der MHK-Profile bestätigen die Ergebnisse aus der ursprünglichen Beschreibung [Palmer *et al.* 1994]. Erhöhte MHK-Werte (in mg/L) wurden für Cefovecin ($\geq 0,5$), Chloramphenicol (≥ 16), Colistin (≥ 4), Enrofloxacin (≥ 2), Florfenicol (≥ 8), Gentamicin (≥ 8), Oxacillin (≥ 2), Pradofloxacin (≥ 1), Spectinomycin (≥ 64) und Sulfamethoxazol/Trimethoprim ($\geq 4/76$) gemessen. Vollständige Hemmungen (niedrige MHK-Werte) bestanden hingegen gegenüber den untersuchten Wirkstoffen Amoxicillin/Clavulansäure ($\leq 0,125/0,0625$), Ampicillin ($< 0,125$), Ceftiofur ($< 0,125$), Cephalothin (< 1), Clindamycin ($\leq 0,03125$), Erythromycin (≤ 1), Penicillin G ($< 0,0625$), Tetrazyklin ($< 0,0625$), Tiamulin (< 8), Tilmicosin (< 1) und Tulathromycin (< 2). Trotz einzelner Abweichungen sollten die lediglich auf Basis

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

eines Stammes erhobenen Unterschiede in den MHK-Werten gegenüber den Gattungen *Sneathia* und *Streptobacillus* vorsichtig interpretiert werden (Tabelle 4).



5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 16 (vorherige Seite): Phylogenetische 16S rRNS-Gensequenzanalyse valider Spezies aus der Familie *Leptotrichiaceae* (unterstrichen) unter Einbeziehung nahe verwandter Phylotypen aus Umweltproben. Der Baum wurde nach dem Maximum Parsimony (MP)-Algorithmus mittels ARB unter Nutzung von DNAPARS berechnet und basiert auf der 16S rRNS-Gensequenz zwischen den Positionen 97 bis 1356 (bezogen auf die *E. coli*-Referenzsequenz; [Brosius *et al.* 1978]). Kürzere Sequenzen wurden nach der Erstellung des Baumes unter Beibehaltung der ursprünglichen Topologie hinzugefügt. Große Kreise beschreiben Verzweigungen, welche ebenfalls durch hohe *Bootstrap*-Werte (BW) im entsprechenden Baum nach dem Maximum Likelihood (ML)-Algorithmus charakterisiert sind. Kleine Kreise kennzeichnen Abzweigungen, welche sich auch in den MP und Neighbor Joining-Bäumen ergeben, jedoch im ML-Baum lediglich durch BW <70% gekennzeichnet sind. Die Pfeile verweisen auf putative unbeschriebene Spezies aus Tieren. GenBank/EMBL/DBJ Belegnummern in Klammern dargestellt; die angegebenen Zahlen geben BW >70% bei 100 Wiederholungsberechnungen an. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T diente als Außengruppe. Maßstab: 0,1 Nukleotidaustausche pro Nukleotidposition. ^T bezeichnet Typstammsequenzen.

5.3 Phänotypische und physiologische Untersuchungen

5.3.1 Biochemie

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits biochemische Stoffwechselfparameter der einzelnen Spezies präsentiert, und es wurde auf deren teilweise erhebliche test-, labor- und stammspezifische Variabilitäten hingewiesen, welche bereits aus der Literatur bekannt sind [Roughgarden 1965, Cohen *et al.* 1968, Edwards & Finch 1986, Costas & Owen 1987, Hofmann 1994, Wullenweber 1995]. Insbesondere müssen biochemische Charakteristika, welche nur an einer kleinen Anzahl von Isolaten oder Stämmen derselben Spezies erhoben wurden, *a priori* vorsichtig interpretiert werden. Bei der Durchführung konventioneller, so genannter „bunte Reihe“-Reaktionen muss den besonderen Wachstumsbedingungen der Gruppe in Form eines Serumzusatzes entsprochen werden, und durch das langsame Wachstum sollten die Tests erst nach sieben Tagen abgelesen werden. Dabei

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

zeigten die untersuchten Stämme mehrheitlich eine Übereinstimmung mit den bereits publizierten Reaktionsmustern [Edwards & Finch 1986, Wullenweber *et al.* 1990, Koopman *et al.* 1991, Wullenweber *et al.* 1992, Wullenweber 1995, Elliott 2007, Kimura *et al.* 2008, Gaastra *et al.* 2009]. Problematisch ist der Einsatz kommerzieller Tests, welche ein schnelles Wachstum der Erreger voraussetzen wie bspw. das API-E-Testsystem (bioMérieux) [Kimura *et al.* 2008], dessen Ergebnisse nicht zuletzt aufgrund fragwürdiger Inkubationsbedingungen kontrovers diskutiert werden [Wullenweber 1995]. Vergleichsweise häufig kam dagegen der kommerziell verfügbare API-Zym-Test (bioMérieux) zum Einsatz [Edwards & Finch 1986, Wullenweber *et al.* 1992, Hayashimoto *et al.* 2008], welcher durch Messung enzymatischer (Rest)-Aktivitäten eines hohen Inokulums unabhängig von der Proliferation der eingebrachten Bakterien ist. Letztlich wurde in dieser Arbeit auf eine Auswahl kommerzieller Systeme [ein eigens designter *Streptobacillus*-Identifikationstest (Merlin Micronaut, Bornheim), VITEK2-compact (NH-Karte) und API-Zym zurückgegriffen, um möglichst gut standardisierte und somit weitgehend Labor-unabhängige Testbedingungen vorzufinden und kulturelle Schwierigkeiten mit dieser Erregergruppe zu minimieren (s. **6.3**). Auch wenn nach jetziger Einschätzung biochemische Stoffwechselreaktionen letztlich nicht diskriminatorisch auf Speziesebene sind, zeigt die Tabelle 3 doch zumindest eine Übersicht der biochemischen Reaktionsmuster und alle wesentlichen weiteren physiologischen Unterschiede innerhalb der Gruppe der *Leptotrichiaceae*, für welche insgesamt Daten von 19 Feldisolaten und Referenzstämmen von *S. moniliformis*, drei Stämmen von *S. notomytis*, zwei Stämmen von *C. abscessus* sowie jeweils einem Stamm von *S. hongkongensis*, *S. felis*, *S. rattii* und *O. salmonicida* mit eingegangen sind. Übereinstimmende Testergebnisse lagen für sämtliche Stämme lediglich in Bezug auf die negativen Schlüsselreaktionen Zytochromoxidase, Katalase, Urease, Nitratreduktion und Indolbildung vor. Die hier präsentierten Daten spiegeln im Wesentlichen die Ergebnisse aus der Literatur wider, welche mittels derselben Testsysteme, jedoch nur an vergleichsweise wenigen Stämmen von *S. moniliformis* erhoben wurden. Jedoch zeigt sich im Gegensatz zu anderen Autoren auch eine breitere Variabilität innerhalb der Spezies *S. moniliformis* in Bezug auf die Stoffwechselfparameter. Bereits bekannte kleinere Unterschiede im Reaktionsmuster [Smith & Sampson 1960, Lambe *et al.* 1973, Wittler & Cary 1974, Edwards & Finch 1986, Kimura *et al.* 2008] sind neben unterschiedlichen Tests auch mit

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

unterschiedlichen Chargen eines Tests sowie mit subjektiven (semiquantitativen) Bewertungsunterschieden der den Test ablesenden Person zu erklären.

Unterschiede zwischen HF- gegenüber RBF-Stämmen von *S. moniliformis*, wie von Costas & Owen (1987) postuliert, waren biochemisch nicht nachzuvollziehen, worauf schon andere Autoren verweisen [Boot *et al.* 1993, Hofmann 1994, Wullenweber 1995]. Diese sind gleichwohl auch nicht zu erwarten, denn beide Infektionen gehen von Ratten aus, und die Zeitspanne zwischen Rattenkontakt und Infektion bzw. Isolation eines Stammes reicht üblicherweise nicht aus, um eine Adaptation des Stammes an seinen Wirt und die Expression eines unterschiedlichen Phänotyps zu erklären. Existierende Unterschiede sind daher besser durch unterschiedliche Genexpressionen nach oraler bzw. parenteraler Infektion zu erklären [Gaastra *et al.* 2009], abgesehen von einer insgesamt nur sehr geringen Zahl von untersuchten HF-Stämmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auf Basis einer Kombination aus Wachstumscharakteristika, Mikromorphologie und einer Reihe wichtiger negativer Schlüsselreaktionen (Zytochromoxidase, Katalase, Urease, Nitratreduktion und Indolbildung) lediglich auf die Gattung *Streptobacillus* bzw. nahe verwandte Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae* geschlossen werden kann. Die übrigen untersuchten biochemischen Reaktionen fielen jedoch – selbst innerhalb der Spezies *S. moniliformis* – sehr variabel aus, womit sie für sich genommen nicht geeignet erscheinen, diese Taxa bis auf Speziesebene zu unterscheiden.

Tabelle 3: Physiologische Merkmale der in dieser Arbeit untersuchten Stämme.

Parameter	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hämolyse auf Schafblutagar [§]	-	+/-	+	+	-	+	-	-	(+)
Phosphatase (nicht spezifiziert) [†]	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phenylalanin-Arylamidase [†]	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Ala-Phe-Pro-Arylamidase [†]	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Alkalische Phosphatase [†]	S	+/-	+	+	-	-	+	-	S
Esterase (C4) [‡]	S	+/-	S	+	+	-	S	S	S
Esterase-Lipase (C8) [‡]	+	S/+	S	+	+	+	-	S	S/+
Leuzin-Arylamidase [†]	-	+/-	-	-	S	-	S	-	+
α-Chymotrypsin [†]	+	S/+	-	-	+	+	-	-	-
Saure Phosphatase [†]	S	-/s	+	+	-	-	+	-	+
Naphthol-AS-BI-	-	-	S	-	-	-	-	+	-
Phosphohydrolase [†]	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α-Glukosidase [†]	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Verwendete Testsysteme: VITEK2-compact mit NH-Karte[†], API-Zym[#] (beide bioMérieux) und klassische präsumtive und biochemische Reaktionen[§]; Taxa: 1, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112[†]; 2, Ergebnisse von sechs *Streptobacillus moniliformis*-Referenzstämmen (ATCC 27747, ATCC 49567, ATCC 49940, NCTC 11194, CIP 55-48 und CIP 81-99); 3, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322[†]; 4, *Streptobacillus felis* 131000547[†]; 5, *Streptobacillus notomysis* AHL 370-1[†]; 6, *Streptobacillus rattii* OGS16[†]; 7, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628[†]; 8, *Cavibacter abscessus* CCUG 39713[†]; 9, *Oceanivirga salmonicida* NCIMB 70304[†]; +, positiv; -, negativ; +/- variabel; # Score-Werte nach Herstellerangaben (0-5) zeigen die Stärke der enzymatischen Reaktionen an (0-2, negativ [-]; 3, schwach [s]; 4-5, positiv [+])

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.2 Antibiogramm und Chemotherapie

Für die Therapie des RBF beim Menschen gilt Penicillin als Mittel der ersten Wahl, und auch die übrigen β -Laktamantibiotika zeigten in vorausgegangenen Studien eine breite Wirksamkeit [Edwards & Finch 1986]. Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme von *S. moniliformis* und den übrigen *Streptobacillus* spp. zeigten sämtlich *in vitro* niedrige MHK-Werte gegenüber β -Laktamantibiotika, und auch das Ausweichmedikament für Patienten mit Penicillin-Überempfindlichkeit, Tetrazyklin [Elliott 2007], hemmte trotz der unterschiedlichen Herkunft der Stämme auch in den niedrigsten eingesetzten Wirkstoffkombinationen das Wachstum zumindest *in vitro*. Allerdings dürfen – wie bereits im Kapitel Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung (s. Kap. 2.6) erwähnt – die in dieser Arbeit beschriebenen MHK-Werte zwar in Form hoher oder niedriger MHK-Werte zwischen einzelnen Stämmen beziehungsweise zwischen Spezies verglichen werden. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf eine klinische Wirksamkeit *in vivo* ist in Ermangelung von klinischen Grenzwerten durch ein Normungsinstitut allerdings nicht statthaft.

Die Erfassung eines aktuellen Status quo mit aktuellen Wirkstoffen machte eine neuerliche Testung erforderlich, auch, weil für die neu beschriebenen Spezies mehrheitlich noch keine Resistenzeigenschaften erfasst waren. Dazu musste zunächst die heute zeitgemäße Mikrobouillondilutionsmethode etabliert werden, weil die Mehrzahl der Ergebnisse bislang mittels Agardiffusionstest erhoben wurden (s. Kap. 2.6). Allerdings kann trotz Ausnutzung kommerzieller MHK-Plattenlayouts wegen des spärlichen Wachstums dieser Bakterien keine automatische photometrische Endpunktmessung erfolgen, sondern es bedarf längerer Inkubationen mit manueller Ablesung der Ergebnisse. Dem Hersteller zufolge war das Panel 1, mit welchem das Gros der Untersuchungen durchgeführt worden war (s. Tab. 4a), nicht mehr lieferbar, sodass für die übrigen Stämme auf das Panel 2 ausgewichen werden musste (s. Tab. 4b). Innerhalb der Gruppe der *Streptobacillus*-Spezies ergibt sich ein recht ähnlicher „MHK-Phänotyp“, welcher keine eindeutige diagnostische Unterscheidung der Spezies zulässt. Das Wachstum der Streptobazillen wurde lediglich relativ durchgängig von den kombinierten Wirkstoffen Trimethoprim/Sulfamethoxazol sowie von Colistin – selbst von den höchsten eingesetzten Wirkstoffmengen (8/152 bzw. 4 mg/L) – nicht beeinträchtigt. Die einzige Ausnahme bildeten hier die Spezies *S. hongkongensis* und *S. ratti*, welche auch

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

nach Bestätigung mittels Epsilometertest das Wachstum hemmten (s. **6.2** u. **6.3**). Da diese Ergebnisse (auch Ciprofloxacin) teilweise im Widerspruch zu Woo *et al.* (2014) stehen und nur für einen Stamm erhoben werden konnten, müssen zukünftige Nachweise zeigen, ob hier wirklich eine Ausnahme vorliegt. Dahingegen hemmten die eingesetzten Tetrazykline, Fluorchinolone, Fenicole, Ketolide, Lincosamide und Makrolide schon in niedrigsten Konzentrationen mehrheitlich das Wachstum der meisten Vertreter der *Streptobacillus*-Spezies. Deutlich diskrepante Ergebnisse konnten für die Wirkstoffe Nalidixinsäure und Streptomycin festgestellt werden. Dies sollte berücksichtigt werden, wenn – wie bisweilen empfohlen [Wullenweber 1995, Kimura *et al.* 2008] – ein Selektivnährmedium auf Basis von Colistin, Nalidixinsäure und/oder Sulfamethoxazol/Trimethoprim zur Erstisolation eingesetzt wird. Die neuen Gattungsvertreter *C. abscessans* und *O. salmonicida* standen nur anhand von zwei bzw. einem Stamm zur Verfügung. Die gezeigten Abweichungen vom Muster der Streptobazillen sollten – wie oben beschrieben – daher generell vorsichtig interpretiert werden (s. Tabelle 4b). Generell zeigte der Typstamm von *Se. termitidis* für die überwiegende Mehrzahl der getesteten Wirkstoffe hohe MHK-Werte. Interessanterweise wurde der Typstamm von *Sn. sanguinegens* von Colistin gehemmt.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4a: Erhebung von Daten zur minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) der in dieser Arbeit untersuchten Isolate und Stämme aus der Familie *Leptotrichiaceae*. Teil 1: Panel 1

Nr. Stamm	Spezies	T/S	TET	GEN	ERY	CIP	CMP	TEL	AZM	CLI	MER	NAL	STR
1	DSM 12112 ^T	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	≤0,125	≤0,125	≤0,5	=1	≤0,125	0,0625	≤0,25	≤0,25	=2	≤1
2	CIP 55-48	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=16	=0,25	=4	=4	=0,25	≤0,125	≤0,0625	=128	=8
3	ATCC 27747	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=1	=8	=1	=4	=2	=0,25	≤0,125	=1	=64	=16
4	NCTC 10773	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	≤0,125	=1	=0,5	=2	=1	=0,25	≤0,125	≤0,0625	=64	=2
5	NCTC 11194	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=4	=2	=4	=4	=1	≤0,125	≤0,0625	=128	=8
6	IPDH 144/80	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	≤0,125	=1	=1	=1	=0,5	=0,125	≤0,125	≤0,0625	=64	=8
7	CIP 81-99	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=4	=1	=4	=2	=0,5	≤0,125	≤0,25	=32	=8
8	AHL 370-4	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,25	=2	≤0,5	≤0,5	=1	=1	≤0,125	≤0,0625	=16	=8
9	NCTC 11941	<i>S. moniliformis</i>	=8/152	≤0,125	=0,5	=1	=2	=0,25	≤0,0625	≤0,125	≤0,0625	=16	=2
10	IPDH 109/83	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,25	=2	=1	=2	=2	=0,5	≤0,125	≤0,0625	=128	=2
11	ATCC 49567	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=4	=1	=4	=2	=0,5	≤0,125	≤0,0625	=128	=8
12	Kun 3 (RIVM)	<i>S. moniliformis</i>	=8/152	=0,25	=2	=0,5	=4	=0,5	=0,125	≤0,125	=0,5	=32	=8
13	ATCC 49940	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=4	=2	=4	=4	=0,5	≤0,125	=0,5	=64	=8
14	B10/15	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,25	=2	=0,5	=4	=0,5	=0,5	≤0,125	=0,5	=32	=8
15	A378/1	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	≤0,125	=1	=0,5	≤0,5	=0,5	=0,25	≤0,125	≤0,0625	=32	=2

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fortsetzung Tabelle 4a

16	VA11257/2007	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,25	=2	=1	=2	=0,25	=2	=0,25	≤0,125	≤0,0625	=32	=16
17	VK105/14	<i>S. moniliformis</i>	=8/152	=0,25	=1	≤0,5	≤0,5	≤0,0625	≤0,125	≤0,0625	≤0,125	≤0,0625	=64	=32
18	B5/1	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,5	=2	=8	=4	=1	=2	=1	≤0,125	≤0,0625	=64	=8
19	Marseille	<i>S. moniliformis</i>	>8/152	=0,25	=2	=4	=4	=2	=2	=2	≤0,125	≤0,0625	=64	=8
24	131000547 ^T	<i>S. felis</i>	>8/152	=0,25	=2	=4	=4	=0,125	=2	=0,125	≤0,125	=0,25	=32	=4
25	DSM 26322 ^T	<i>S. hongkongensis</i>	≤0,0625/ 1,1875	≤0,125	≤0,125	≤0,5	≤0,5	≤0,0625	≤0,125	≤0,0625	≤0,125	≤0,0625	≤1	≤1
26	AHL 370-1 ^T	<i>S. notomytis</i>	=8/152	≤0,125	≤0,125	≤0,5	=1	=0,25	=2	=0,25	≤0,125	≤0,0625	=16	=4
32	NCTC 11300 ^T	<i>Se. termittidis</i>	>8/152	=8	=0,5	>64	>8	>8	>16	>8	=8	=8	>128	>64

Die Untersuchungen wurden mittels Mikrobouillondilutionsmethode (Merlin Micronaut System, Panel 1) durchgeführt. Angaben in mg/L; rot, gelb bzw. grün unterlegte Werte weisen hohe, intermediäre bzw. niedrige minimale MHK auf. T/S: Trimethoprim/Sulfamethoxazol, TET: Tetrazyklin, GEN: Gentamicin, ERY: Erythromycin, CIP: Ciprofloxacin, CMP: Chloramphenicol, TEL: Telithromycin, AZM: Azithromycin, CLI: Clindamycin, MER: Meropenem, NAL: Nalidixinsäure, STR: Streptomycin.

Tabelle 4b: Erhebung von Daten zur minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) der in dieser Arbeit untersuchten Isolate und Stämme aus der Familie *Leptotrichiaceae*. Teil 2: Panel 2

Nr.	Stamm	Spezies	T/S	TET	GEN	ERY	ENR	FLL	PEN	AMC	AMP	CET	CTN	COL	SPT	TIA	TILM	TUL
28	KW/G24	<i>S. notomytis</i>	≥4/76 ≤0,125	≤1	≤1	≤0,25	<1	<0,0625	<2/1	<0,125	<0,125	<0,125	<1	>4	≤4	<8	<1	<2
29	OGS16 ^T	<i>S. ratti</i>	<0,25/ 4,75	≤0,125	≤0,5	≤1	>2	<1	<0,0625	<2/1	<0,25	<0,25	<1	>4	≤4	<8	<1	<2
30	CCUG 41628 ^T	<i>Sn.</i> <i>sanguinegens</i>	<0,25/ 4,75	≤0,125	<0,25	<0,125	<0,03125	<1	<0,0625	<2/1	<0,125	<0,125	<1	≤0,5	≤4	<8	<1	<2
44	CCUG 39713 ^T	<i>C. abscessus</i>	≥2/38	<0,125	>2	>2	=1	=1	=2	<2/1	<0,125	<0,125	<1	>4	>64	<8	<1	=16
45	1510011837	<i>C. abscessus</i>	≥4/76	=0,25	≤0,25	>4	≤0,25	<1	<0,0625	<2/1	<0,25	<0,125	<1	>4	=16	<8	<1	<2
46	NCIMB 703044 ^T	<i>O. salmonicida</i>	≥4/76	<0,062	>8	=1	≥2	>8	<0,0625	≤0,125/ 0,0625	<0,125	<0,125	<1	>4	>64	<8	<1	<2

Die Untersuchungen wurden mittels Mikrobouillondilutionsmethode (Merlin Micronaut System, Panel 2) durchgeführt. Angaben in mg/L; rot, gelb bzw. grün unterlegte Werte weisen hohe, intermediäre bzw. niedrige minimale MHK auf. T/S: Trimethoprim/Sulfamethoxazol, TET: Tetrazyklin, GEN: Gentamicin, ERY: Erythromycin, ENR: Enrofloxacin, FLL: Florfenicol, PEN: Penicillin G, AMC: Amoxicillin/Clavulansäure, AMP: Ampicillin, CET: Cefitiofur, CTN: Cephalothin, COL: Colistin, SPT: Spectinomycin, TIA: Tiamulin, TILM: Tilmicosin, TUL: Tulathromycin.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.3 Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Die Flugzeit-Massenspektrometrie erwies sich schon für die Differenzierung zwischen *S. moniliformis* und *S. felis* als hilfreiches Instrument (s. **6.1.-6.3**). Sämtliche Spezies der Familie *Leptotrichiaceae* ließen sich bislang eindeutig anhand ihrer speziesspezifischen ribosomalen Proteinsignatur differenzieren, nachdem die entsprechenden Referenzspektren der Datenbank hinzugefügt worden waren (s. Abb. 17). Lediglich einige *Leptotrichia*-Spezies und „*Sn. amni*“ konnten noch nicht untersucht werden. Innerhalb der betrachteten Gruppe bestätigt das dargestellte Kladogramm (Klusteranalyse) auf Basis der zugrundeliegenden Proteinsignaturen sehr eindeutig die Topologie der phylogenetischen Daten, was durch die räumlich nahe Darstellung besonders ähnlicher (homologer) Spektren unterschiedlicher nahe verwandter Spezies in separaten Ästen zum Ausdruck kommt. Theoretisch sollte die Topologie der Klusteranalyse derjenigen der 16S rRNS-Gen-basierten Phylogenie (s. Abb. 12 entsprechen, weil die den erzeugten Massenspektren schwerpunktmäßig zugrundeliegenden Proteine jene ribosomalen Ursprungs sind [Pineda *et al.* 2003]. Dies ist zumeist auch der Fall, wenngleich sich Unterschiede aus nicht massenspektrometrisch erfassbaren Proteinanteilen sowie der nicht-synonymen Umsetzung zwischen Nukleotid- und Aminosäureebene ergeben können. Meist bedarf es für die Probenvorbereitung der MALDI-TOF MS nicht einmal einer vorherigen Proteinextraktion, sondern die im direkten Transfer gemessenen Spektren sind hinlänglich geeignet für die Differenzierung auf Speziesebene. Allerdings bedarf diese Technik in der Regel auch weiterhin der vorherigen Anzucht des Erregers. Damit erweist sich die Flugzeit-Massenspektrometrie aufgrund ihrer diagnostischen Diskriminierungsfähigkeit, Anwenderfreundlichkeit und Verfügbarkeit in vielen Laboratorien als exzellentes Diagnostikum für die Bestimmung von Vertretern der *Leptotrichiaceae*. Jedoch sind die Herstellerdatenbanken bislang nur mit sehr wenigen Spektren aus dieser systematischen Gruppe ausgestattet, sodass es zunächst der Messung unter definierten Standardbedingungen, Generierung und Nachpflege von Referenzspektren in die Datenbank durch den Anwender bedarf. Eine jüngst geschaffene Alternative stellt die so genannte ‚MALDI user platform‘ (MALDI-UP) dar (s. **6.11**). Dabei handelt es sich um einen stetig aktualisierten offenen Katalog, welcher non-kommerziell und webbasiert geführt wird und in welchem MALDI-Nutzer ihre gemäß einem vorgegebenen Qualitätsstandard generierten Spektren für andere Nutzer offerieren können. Über MALDI-UP, in

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

welche auch sämtliche Spektren dieser Arbeit eingestellt wurden, kann der Kontakt zum Ersteller der Spektren und somit ein Austausch organisiert werden (s. [6.11](#)).

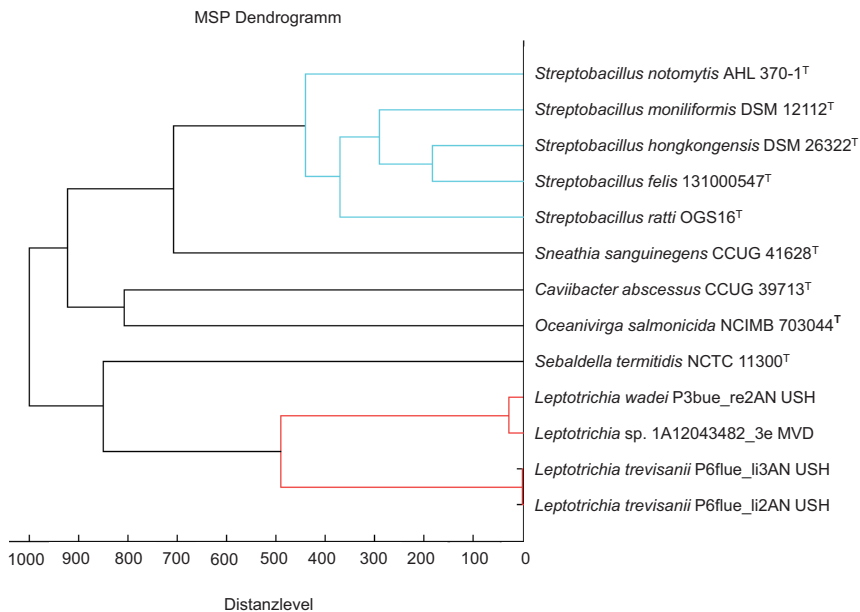


Abbildung 17: Dendrogramm auf Basis der Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) unter Verwendung der Spektren (main spectra peak lists [MSP]) der Familie Leptotrichiaceae aus der Datenbank (Bruker Taxonomy Database). MSP von Referenzstämmen von *Streptobacillus* (*S.*) *ratti* OGS16^T, *S. notomytis* AHL 370-1^T, *S. hongkongensis* DSM 26322^T, *S. felis* 131000547^T, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T, *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T, *Oceanivirga salmonicida* NCIMB 703044^T und *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T wurden mittels Direkttransfer-Protokoll vermessen und das Dendrogramm mittels Gerätesoftware erzeugt (BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard Method [v1.4] der MALDI BioTyper OC Software [v3.1, build 66]). Die Datenbank (DB 5627, BrukerDaltonics) enthielt 24 Spektren von *S. moniliformis* (DSM 12112^T); ^T: Typstamm, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France, NCIMB: National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.4 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Im Gegensatz zur MALDI-TOF MS beinhalten Infrarotspektren eine breitere Vielfalt an Biomolekülhauptkomponenten, zu welchen auch andere Proteine, Fettsäuren und Kohlehydrate gehören [Naumann 2000]. So entsteht nach der von der Geräte-Software gesteuerten Fourier-Transformation des initial gemessenen Absorptionsspektrums ein Infrarotspektrum, welches wesentlich umfangreichere Informationen über einen Organismus enthält und gelegentlich als dessen phänotypischer Fingerabdruck bezeichnet wird. Als Nachteil dieser Methodik gilt, dass sowohl die Test- als auch sämtliche Vergleichsorganismen sehr stringent nach exakt denselben Inkubationsbedingungen und -zeiten vermessen werden müssen und meist noch spektrale Anteile, welche die aussagekräftigen Unterschiede aufweisen, herausgefiltert werden müssen. Somit ist die Methodik der FT-IR erheblich störungsanfälliger als die der MALDI-TOF MS. Im Hinblick auf die untersuchten *Streptobacillus*-Spezies erwies sich diese Technik jedoch als vielversprechend und grundsätzlich geeignet, denn man konnte *S. hongkongensis*, *S. felis* und *S. moniliformis* eindeutig voneinander abgrenzen und auf diese Weise identifizieren. Allerdings war es bei dieser Technik trotz aufwändiger mathematischer Vorbehandlung der Daten nicht möglich, zusätzlich in derselben Abbildung auch eine eindeutige Abgrenzung von *S. notomytis* und *S. ratti* visuell darzustellen, welche eng mit der Punktwolke der *S. moniliformis*-Stämme zusammenfielen. Dies liegt zum einen daran, dass die Varianz der Spektren derselben Spezies auf Basis lediglich eines Stammes nicht repräsentativ die Realsituation widerspiegelt, wie die wesentlich umfangreichere Punktwolke der *S. moniliformis*-Stämme vermuten lässt (s. Abb. 18). Andererseits zeigen aber auch die Ergebnisse der Fettsäureanalyse, dass mit dieser keine eindeutige Abgrenzung zwischen den Spezies möglich ist, wodurch auch die Eindeutigkeit der FT-IR-Analytik maskiert sein könnte. Das Auffinden weiterer Isolate der neu beschriebenen Spezies kann hierzu zukünftig mehr Klarheit bringen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

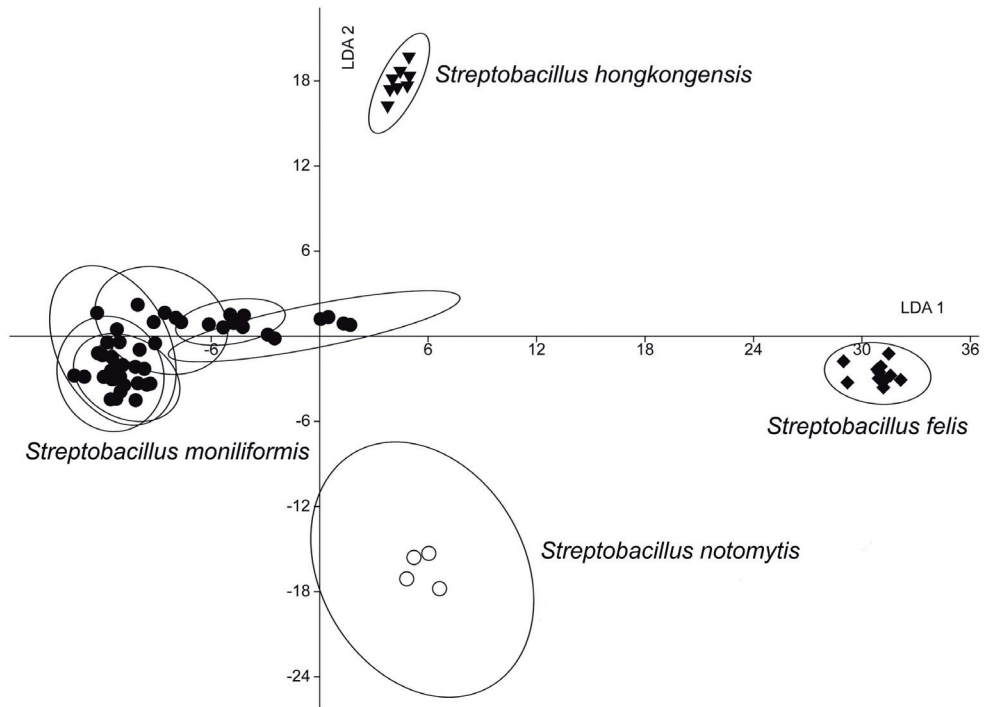


Abbildung 18: Lineare Diskriminantenanalyse (LDA) von 69 Infrarotspektren von 10 Isolaten unterschiedlicher *Streptobacillus*-Spezies, welche mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und der Gerätesoftware OPUS (vers. 4.2, BrukerOptics, Ettlingen) erzeugt wurden. Die Wellenzahlbereiche 550-1800 und 2800-3200 cm^{-1} von IR-Spektren nach 2. Ableitung wurden ausgewählt und vektornormiert. Nach Hauptkomponentenanalyse wurden die ersten 30 Komponenten für die LDA benutzt, in welcher jedes Isolat als eine Gruppe definiert wurde. IR-Spektren von *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T sind durch Kreise, *Streptobacillus moniliformis* durch Punkte, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T durch Dreiecke und *Streptobacillus felis* 131000547^T durch Karos dargestellt.

Tabelle 5: Fettsäuremuster der in dieser Arbeit untersuchten Stämme.

Fettsäure	1	2	3	4	5	6	7	8*	9*
C _{14:0}	1,5	-	1,5	1,6	1,5	1,0	-	0,5	0,6
C _{15:0/ISO}	3,9	3,0	2,1	-	-	-	-	-	-
C _{16:0}	27,8	26,5	28,2	29,4	28,7	28,6	25,8	18,5	19,1
C _{17:0}	1,5	-	1,5	-	1,5	1,2	-	0,6	0,6
Summenmerkmal 5 C _{18:0} ANTE/C _{18:2} ω6,9c	13,3	5,6	12,1	13,0	8,5	14,1	11,6	41,7	41,8
C _{18:1} ω6c	2,2	-	2,0	-	5,9	-	-	-	-
C _{18:1} ω9c	25,1	30,2	24,1	26,6	23,6	13,3	38,2	21,0	17,2
C _{18:0}	23,5	34,7	21,6	29,4	26,3	36,9	13,7	14,2	16,3
C _{20:4} ω6,9,12,15c	1,2	-	1,1	-	-	-	-	0,6	-

Taxa: 1, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 2, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 3, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 4, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T; 5, *Streptobacillus ratti* OGS16^T; 6, *Cavibacter abscessus* CCUG 39713^T; 7, *Oceanivirga salmonicida* NCIMB 703044^T; 8, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T; 9, „*Sneathia amnii*“ CCUG 52888. Die Biomasse für die Fettsäureanalyse wurde nach 3-tägiger kaprophiler Inkubation (10% CO₂) der Stämme auf Columbia-Schafblutagar bei 36°C geerntet (Ausnahme *); * Daten entstammen der Culture Collection, University of Gothenburg (CCUG)-Webseite (<http://www.ccug.se>).

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.5 Fettsäuremuster

Wie bereits in den Kapiteln zu den Speziesbeschreibungen ausgeführt, lassen sich die Vertreter der Gattung *Streptobacillus* nicht – wie verschiedentlich für *S. moniliformis* angenommen [Rowbotham 1983, Rygg & Bruun 1992, Pins *et al.* 1996] – auf Basis der Fettsäurekomponenten der Bakterien unterscheiden. Eine Übersicht über sämtliche Vertreter aus dieser Arbeit zeigt Tabelle 5. Demnach zeigen sowohl *Streptobacillus*-Spezies als auch *C. abscessus* und *O. salmonicida* ein vornehmlich aus Tetradekansäure (C_{14:0}), Palmitinsäure (C_{16:0}), Oktadekansäure mit Linolsäure (C_{18:2}), Ölsäure (C_{18:1}) und Stearinsäure (C_{18:0}) aufgebautes Haupt-Fettsäuremuster.

5.3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Eine erstmals an einer Auswahl sämtlicher, heute bekannter *Streptobacillus*-Spezies durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung konnte keine Unterschiede, wohl aber den grundsätzlichen mikromorphologischen Aufbau der Bakterienzellen entschlüsseln. Demnach zeigte *S. moniliformis* DSM 12112^T ovale bis langgestreckte Zellen mit einem Durchmesser von 0,3-0,7 µm und Längen von 0,9 bis 5,2 µm und einer deutlich abgegrenzten Zellmembran (s. **6.9**). Die Bakterienzellen wiesen keine Geißeln auf und waren teilweise – wie auch aus lichtmikroskopischen Studien bekannt ist – in längeren Ketten angeordnet (Fig. 19a). Ähnliche Ergebnisse bestätigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Nolan *et al.* (2009). Eigene Vergleiche mit ähnlichen Aufnahmen von unter denselben Bedingungen kultivierten Typstämmen der übrigen *Streptobacillus*-Spezies ergaben keine erkennbaren morphologischen Unterschiede (Fig. 19b-e; s. **6.9**). Von Woo *et al.* (2014) angefertigte Aufnahmen von *S. hongkongensis* beschreiben diese Spezies als flagellenlose, pleomorphe Stäbchen mit sehr rauer Oberfläche. Wenngleich einige Angaben zu den 'S. *moniliformis*-ähnlichen Organismen', welche aus einem Kalb mit einer interstitiellen Pneumonie isoliert worden waren, Zweifel an der richtigen Zugehörigkeit zur Gattung *Streptobacillus* aufkommen lassen (s. Kap. 2.3.4), weisen doch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wiederum gewisse Parallelen auf [Gourlay *et al.* 1982]. So zeigten die flockigen, Brotkrumen-ähnlichen Formen aus Flüssigkulturen stark angefärbte Filamente und geschwollene Bakterienzellen ("densely staining filaments and swollen bodies"), die ebenfalls lichtmikroskopisch zu

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

erkennen waren. Bedauerlicherweise blieb das Isolat nicht erhalten, sodass die verwandtschaftliche Nähe derzeit nicht näher geklärt ist. Dass die o.a. Zweifel in einem auch aeroben Wachstum und einer nicht nachweisbaren Pathogenität für Mäuse bestanden, muss aus heutiger Sicht nicht den Ausschluss bedeuten, denn die jüngst beschriebenen Vertreter *C. abscessus* und *O. salmonicida* zeigen ebenfalls Abweichungen vom für *S. moniliformis* klassischen Wirtsspektrum bzw. Wachstumsverhalten. Auch für *O. salmonicida* wurden bereits elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 11) [Palmer *et al.* 1994]. Diese an Dünnschnitten von Nierengeweben erhobenen Erkenntnisse zeigen die von einer dreischichtigen Zellwand umgebenen Erreger dicht gepackt in zytoplasmatischen Vakuolen von Nierenendothelzellen [Palmer *et al.* 1994]. Weitere elektronenmikroskopische Aufnahmen mit prinzipiell identischem Aufbau der Bakterien finden sich auch für *Se. termitidis*, „*Sn. amni*“ und verschiedene *Leptotrichia* spp. [Eribe *et al.* 2004, Harmon-Smith *et al.* 2010, Harwich *et al.* 2012].

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

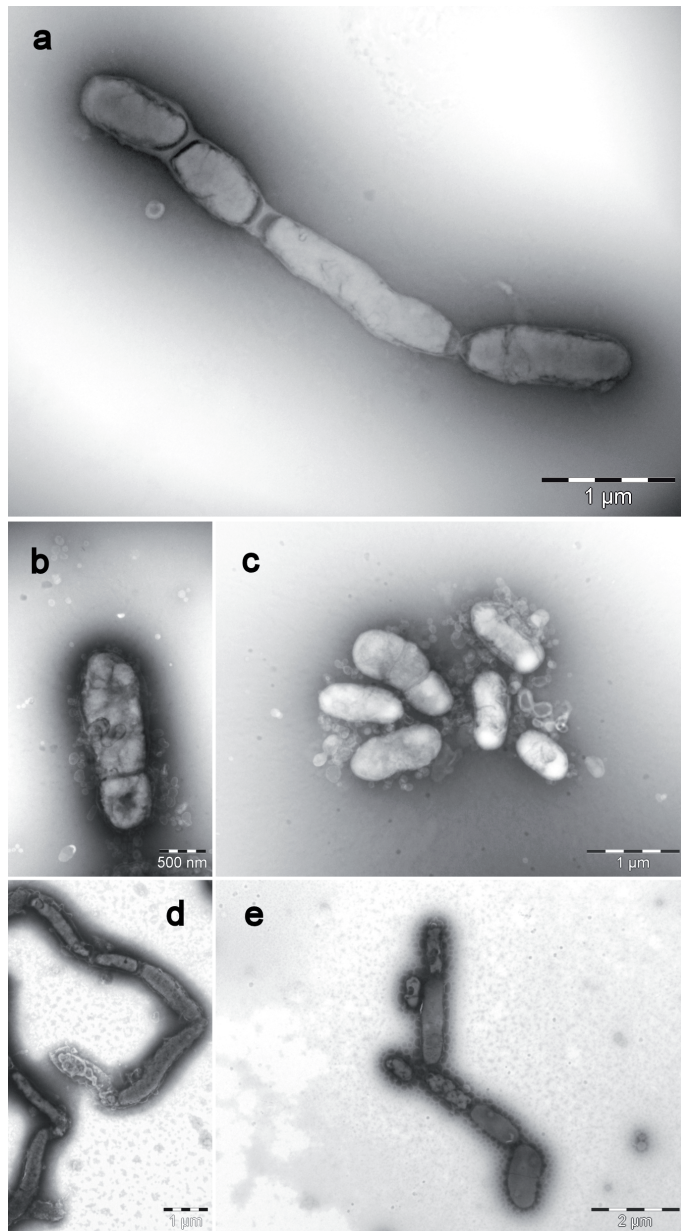


Abbildung 19: Transmissionselektronenmikroskopischer Vergleich der *Streptobacillus*-Spezies, jeweils nach siebentägiger Kultur auf Schafblutagar bei 37°C. a: *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, b: *Streptobacillus felis* 131000547^T, c: *Streptobacillus ratti* OGS16^T, d: *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T, e: *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T. Negativkontrastierung (PTA-Methode) bei 3000-10000facher Vergrößerung (JEM-1011; JEOL, Freising; Aufnahme: VALERIJ AKIMKIN, CVUA Stuttgart).

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.3.7 Virulenz

Die in der Arbeit von Hofmann (1994) erstellten Rohdaten zur Hämagglutination von Streptobazillen (s. Kap 2.7.1) wurden durch die vergleichenden phänotypischen Untersuchungen erstmals international publiziert (s. **6.3**). Zwar erweisen sich nach heutiger Auffassung Meerschweinchen nicht mehr als Hauptwirte von *S. moniliformis* [Hofmann 1994], sondern sind mit einer eigenen Spezies kolonisiert beziehungsweise infiziert. Das von Nolan *et al.* [2009] analysierte Genom des Typstamms von *S. moniliformis* lieferte auf Basis der Zuordnungen von Proteinen zu orthologen Gruppen (COG) zunächst keine expliziten Hinweise auf Virulenzfaktoren oder Virulenz-assoziierte Gene. Die vergleichenden genomischen Untersuchungen dieser Arbeit ergaben neben allgemeinen Analysen zur Proteinfunktion (s. Kap. 5.4.1 u. **6.10**) allerdings erste Hinweise auf das Vorhandensein von Virulenzgenen bei *S. moniliformis*, welche einen Ausgangspunkt für zukünftige Studien darstellen (s. Kap. 5.4.1.1).

5.4 Untersuchungen zu den Gesamtgenomen

5.4.1 Genomanalyse und Analyse der putativen Proteinfunktionen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits Auszüge von phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen in Form isoliert betrachteter molekularer Daten bei den einzelnen neu beschriebenen Spezies der Familie *Leptotrichiaceae* gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner sämtliche Genome der Stämme aus Tabelle 2 mittels WGS (*next generation sequencing*) sequenziert. Die eigenen Daten wurden mit weiteren, bereits veröffentlichten Genomen aus dieser Gruppe verglichen.

Auf diese Weise wurden 23 Stämme von *S. moniliformis* sowie zehn weitere Stämme anderer *Leptotrichiaceae*-Taxa für diese Arbeiten sequenziert. Fünfzehn weitere Genome dieser Verwandtschaftsgruppe wurden aus anderen hinterlegten Projekten (National Center for Biotechnology Information (NCBI) database [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) mit in die Betrachtungen einbezogen (s. Tab. 2 u. **6.10**).

Es zeigt sich, dass *Se. termitidis* mit rund 4,2 Mbp das größte Genom der Familie besitzt, gefolgt von Spezies aus der Gattung *Leptotrichia* mit 2,1-2,5 Mbp.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Durchschnittlich kleinere Genome besitzen die schwerpunktmäßig in dieser Arbeit untersuchten Taxa. Innerhalb der Gattung *Streptobacillus* liegt die durchschnittliche Genomgröße der 23 untersuchten Stämme bei 1,7 Mbp. Nur geringfügig kleinere Genome weisen mit 1,5-1,6 Mbp auch die übrigen Spezies der Gattung auf. Die beiden Vertreter *Sn. sanguinegens* und „*Sn. amni*“ haben mit 1,3 Mbp relativ ähnliche, jedoch kleinere Genome. Die beiden neu beschriebenen Gattungen fügen sich in die bestehende Ordnung. Das Typstamm-Genom von *O. salmonicida* ist 1,8 Mbp groß, dasjenige von *C. abscessus* ist mit 1,2 Mbp das bislang kleinste Genom eines Vertreters der Familie *Leptotrichiaceae*. Als Außengruppe wurde ein Genom von *Fusobacterium nucleatum* mit 2,2 Mbp betrachtet.

Eine ähnliche Ordnung ergibt sich bei der Analyse der kodierenden DNS-Sequenzen (CDS): die geringste Zahl an Genen besitzen die Gattungen *Caviibacter* und *Sneathia* mit 1212-1282 CDS, gefolgt von *Streptobacillus* und *Oceanivirga* (1293-1679), *Leptotrichia* (1930-2365) und *Sebaldella* (4083). Der durchschnittliche Prozentsatz der CDS am Gesamtgenom zeigt eine dreistufige Verteilung: eine am höchsten kodierende Gruppe, bestehend aus den Gattungen *Caviibacter*, *Oceanivirga* und *Sneathia* (89-93%), eine intermediäre Gruppe wird von *Streptobacillus* gebildet (87%) und eine Gruppe mit *Leptotrichia* und *Sebaldella* (84%) mit der niedrigsten Kodierungsdichte. Obwohl die Variabilität dieser Werte innerhalb derselben Gattung vergleichsweise hoch ausfallen kann, wirken sich die gezeigten Verteilungen unvermeidlich auch auf durchschnittliche Gendichte und durchschnittliche Zwischengenregionen aus (in Klammern durchschnittliche Gene/Mbp; durchschnittliche Anzahl an nt zwischen zwei Genen): *Oceanivirga salmonicida* (1056; 79), *Caviibacter abscessus* (996; 76), *Sneathia* spp. (989; 84), *Streptobacillus* spp. (987; 115), *Leptotrichia* spp. (967; 144) und *Sebaldella* (936; 149). Durchweg fällt die gesamte Familie durch sehr niedrige G/C-Gehalte auf, welche wiederum von *Se. termitidis* angeführt werden (33,5%). Es folgen die Vertreter der Gattungen *Leptotrichia* (29,3-31,6%), *Sneathia* (26,7-28,4%) und *Streptobacillus* (25,9-26,9%). Mit 26,8% liegen die Genome von *C. abscessus* in einem ähnlichen oberen Bereich. Den niedrigsten G/C-Gehalt der Familie nimmt das Typstamm-Genom von *O. salmonicida* mit 25,4% ein. Eine umfassende Darstellung ausgewählter Genomkenngrößen findet sich in Tabelle 6.

Als Grundlage für die Phylogenien (s. Kap. 5.3.2) sowie zur Analyse der Proteinfunktionen wurden die *de novo* assemblierten Genome analysiert und die

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

offenen Leserahmen (*open reading frames* [ORF]) mittels automatischer Annotation (RAST-Server; [Aziz *et al.* 2008]) sowie vorhandener Referenzgenome zugeordnet. Nachfolgend fand eine Vorhersage der Gene (Prodigal; [Hyatt *et al.* 2010]) sowie die Zuordnung der putativen Proteinfunktionen zu so genannten COGs (s. Kap. 2.1.5) mittels der NCBI Conserved Domain Database [Marchler-Bauer *et al.* 2015] statt. Eine Auswertung der analysierten Genome zu COGs findet sich in Abbildung 20. Man erkennt für die COG-Klassen für DNS-Replikation, Zellzyklusregulation und Proteintranslation (J, L, D und F) mit zunehmender Genomgröße eine inverse Beziehung, während die COG-Klassen für Transkription, Signaltransduktion, Zellmotilität und den Stoffwechsel sekundärer Metabolite (K, N, T und Q) positiv korreliert sind: Die für DNS-Replikation, Zellzyklusregulation und Proteintranslation kodierenden Proteine nehmen bei größeren Genomen ab, während diejenigen Proteine für Transkription, Signaltransduktion, Zellmotilität und den Stoffwechsel sekundärer Metabolite zunehmen. Dieser Sachverhalt ist unter biologischen Aspekten gut erklärbar, denn essentielle Funktionen sind somit in kleineren Genomen sichergestellt, während weniger wichtige Funktionen verzichtbar sind oder an den Wirt ausgelagert werden können [Harwich *et al.* 2012]. Die Verteilung der COGs innerhalb der Spezies *S. moniliformis* (s. Abb. 20 u. **6.10 Supplement-Tabelle S1**) erscheint sehr einheitlich und trägt zu dem Bild einer vermeintlichen Homologie [Costas & Owen 1987] unter den untersuchten Stämmen bei. Dies kann auch zunächst aus der hohen intraspezifischen Übereinstimmung der ANI von 98,5-99,3% geschlossen werden (s. **6.3 Supplement-Tabelle S2**). Allerdings weisen die Unterschiede innerhalb der Spezies *S. moniliformis* mit Kodierungsdichten von bis zu 16% wiederum auch auf große Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 6: Analyse von prinzipiellen Genomdaten und kodierenden DNS-Regionen (CDS) der in dieser Arbeit verglichenen Genome aus der Familie *Leptotrichiaceae*

Stamm-Nr.	Spezies	ungefähre Genomgröße (nt)	CDS ¹	rRNA	tRNA ²	%G/C ³	Summe CDS (nt)	Summe non-CDS (nt)	Kodierungsdichte (%)	durchschnittliche Gendichte (Gene/Mbp)	durchschnittliche Zwischengenregion (nt)
1	<i>S. moniliformis</i>	1673280	1568	16	39	26,3	1556870	116410	93	937	74
2	<i>S. moniliformis</i>	1678906	1658	12	37	26,1	1508835	170071	89	988	103
3	<i>S. moniliformis</i>	1684459	1591	14	35	26,1	1486041	198418	87	945	125
4	<i>S. moniliformis</i>	1897024	2244	9	43	28,9	1651665	245359	85	1183	109
5	<i>S. moniliformis</i>	1712153	1764	3	38	26,1	1542831	169322	89	1030	96
6	<i>S. moniliformis</i>	1668382	1615	13	36	26,1	1484745	183637	88	968	114
7	<i>S. moniliformis</i>	1686977	1543	12	35	26,4	1449924	237053	84	915	154
8	<i>S. moniliformis</i>	1598404	1608	14	38	25,9	1470174	128230	91	1006	80
9	<i>S. moniliformis</i>	1689124	1675	4	36	26,1	1399686	289438	79	992	173
10	<i>S. moniliformis</i>	1756513	1765	14	37	26,1	1559103	197410	87	1005	112
11	<i>S. moniliformis</i>	1763717	1621	9	35	26,1	1488168	275549	81	919	170
12	<i>S. moniliformis</i>	1518628	1540	12	33	25,9	1442043	76585	95	1014	50
13	<i>S. moniliformis</i>	1689360	1765	5	36	26,1	1526748	162612	89	1045	92
14	<i>S. moniliformis</i>	1674237	1597	13	37	26,2	1477515	196722	87	954	123
15	<i>S. moniliformis</i>	1667701	1692	14	36	26,0	1518810	148891	90	1015	88
16	<i>S. moniliformis</i>	1690579	1538	16	37	26,1	1468143	222436	85	910	145
17	<i>S. moniliformis</i>	1608659	1507	22	34	26,2	1433763	174896	88	937	116
18	<i>S. moniliformis</i>	1497161	1644	8	36	25,8	1322022	175139	87	1098	107
19	<i>S. moniliformis</i>	1696954	1774	5	38	26,1	1521612	175342	88	1045	99
20	<i>S. moniliformis</i>	1696554	1688	17	37	26,0	1509528	187026	88	995	111

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fortsetzung Tabelle 6

21	<i>S. moniliformis</i>	1792325	1664	16	42	26,2	150631	241694	84	928	145
22	<i>S. moniliformis</i>	1759287	1737	13	43	25,9	1566621	192666	88	987	111
23	<i>S. moniliformis</i>	1608076	1559	10	35	26,0	1445580	162496	89	969	104
24	<i>S. felis</i>	1610666	1754	3	37	26,4	1450014	160652	89	1089	92
25	<i>S. hongkongensis</i>	1543001	1485	14	35	26,1	1324059	218942	83	962	147
26	<i>S. notomytis</i>	1762984	1773	9	43	28,1	1511157	251827	83	1006	142
27	<i>S. notomytis</i>	1426245	1349	8	40	26,4	1257996	168249	87	946	125
28	<i>S. notomytis</i>	1384502	1341	19	39	26,3	1256817	127685	90	969	95
29	<i>S. ratti</i>	1499353	1411	11	39	25,9	1318767	180586	86	941	128
30	<i>Sn. sanguinegens</i>	1300753	1329	2	34	26,7	1214541	86212	93	1022	65
31	" <i>Sn. annii</i> "	1339284	1282	10	34	28,3	1207722	131562	89	957	103
32	<i>Se. termitidis</i>	4418842	4135	13	40	33,5	3802074	616768	84	936	149
33	<i>L. buccalis</i>	2465610	2299	15	46	29,6	2062809	402801	80	932	175
34	<i>L. goodfellowii</i>	2281162	2241	7	39	31,6	2045213	235949	88	982	105
35	<i>L. goodfellowii</i>	2287284	2373	3	39	31,5	2055020	232264	89	1037	98
36	<i>L. hotstadii</i>	2453253	2720	13	47	30,8	2059248	394005	81	1109	145
37	<i>L. shahii</i>	2144606	1969	10	41	29,5	1812950	331656	82	918	168
38	<i>L. wadei</i>	2316529	2139	11	42	29,3	1973929	342600	83	923	160
39	<i>L. wadei</i>	2353455	2212	3	27	29,2	2008568	344887	83	940	156
40	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 212	2444904	2231	14	43	31,4	2146482	298422	86	936	130

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fortsetzung Tabelle 6

41	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 215	2308492	2195	3	34	31,4	2039067	269425	87	951	123
42	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 225	2400083	2306	3	24	29,6	2061283	338800	84	961	147
43	<i>Leptotrichia</i> sp. orales Taxon 879	2415750	2361	4	25	29,6	2026284	389466	81	977	165
44	<i>C. abscessus</i>	1219935	1198	5	28	26,5	1131456	88479	92	982	74
45	<i>C. abscessus</i>	1304155	1316	4	35	26,4	1201320	102835	91	1009	78
46	<i>O. salmonicida</i>	1769081	1869	2	38	25,4	1621182	147899	91	1056	79
47	<i>F. nucleatum</i> (Außengruppe)	2174500	2022	15	47	27,2	1937724	236776	88	930	117

¹ CDS: kodierende DNS-Regionen; ² tRNA: Transfer-Ribonukleinsäure; ³ G/C: Guanin-Cytosin-Gehalt; F.: *Fusobacterium*

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

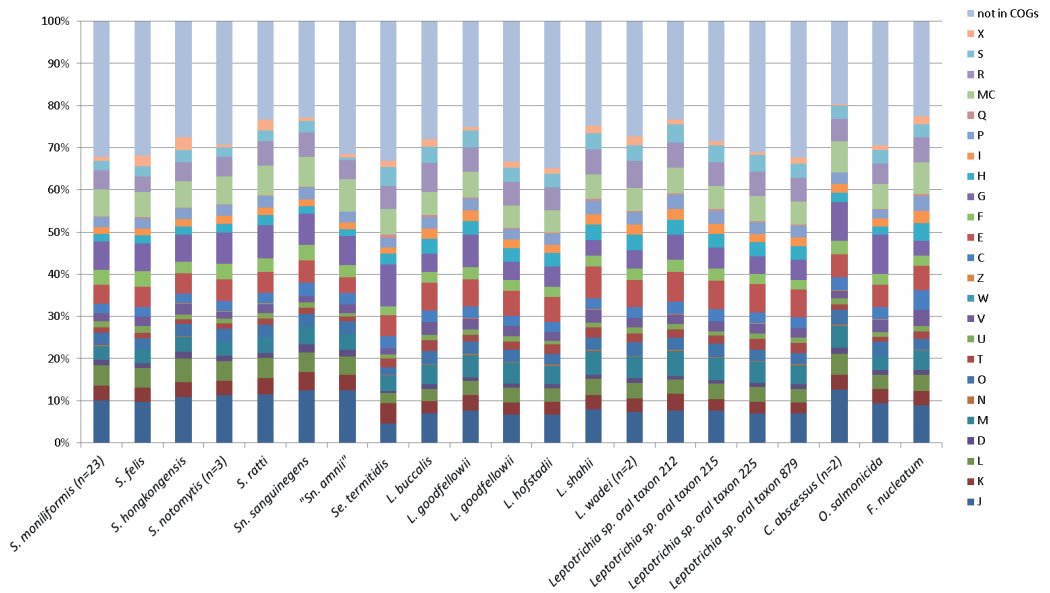


Abbildung 20: Übersicht über die unterschiedliche Verteilung der Proteinfunktionen (Clusters of Orthologous Groups [COGs]) innerhalb der in dieser Arbeit verwendeten *Leptotrichiaceae*-Genome. Zur Ableitung der COGs s. [6.10](#).

5.4.1.1 Analyse von Virulenzgenen und Pathogenitätsfaktoren

In den Genomen der in dieser Arbeit verwendeten Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae* wurde wiederholt und zusätzlich zu der in Kapitel 5.4.1 dargestellten Methodik gezielt nach Virulenz-assoziierten Genen und möglichen Pathogenitätsfaktoren gesucht, weil diese insbesondere für die pathogenen Mikroorganismen dieser Gruppe und besonders im Hinblick auf die molekulare Pathogenese von Interesse sind. Zu diesem Zweck wurden die mittels RAST-Server annotierten Genome [Aziz *et al.* 2008] mit dem implementierten SEED-Viewer [Overbeek *et al.* 2005] analysiert. Dazu wurden die Subsystem-Kategorie "Membrane Transport" auf das Vorhandensein von Sekretionssystemen hin überprüft und die Subsystem-Kategorie "Virulence, Disease and Defense" ausgewertet (s. Abb. 21).

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Subsystem Information Organism Overview for *Streptobacillus moniliformis* CP001779 CP (34104.74)

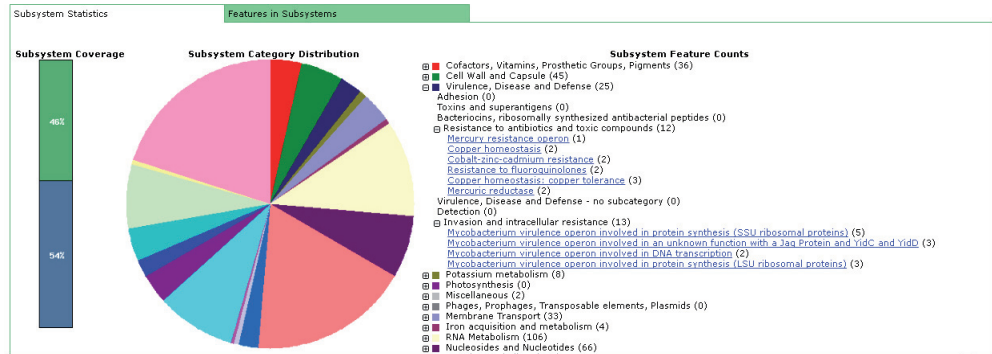


Abbildung 21: Überblick der Analyse zur Auswertung eines *Streptobacillus moniliformis*-Genoms im Hinblick auf putative Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene mittels SEED-Viewer (integriert in RAST (Rapid Annotation Server; <http://rast.nmpdr.org/>))

Sekretionssysteme wurden innerhalb der Genome in den Gattungen *Caviibacter* und *Sneathia* nicht gefunden, bei einzelnen Vertretern der Gattung *Leptotrichia* sowie bei *Sebaldella termitidis*, *O. salmonicida*, *S. hongkongensis* und den beiden Stämmen IKC1 und AHL 370-4 von *S. moniliformis* waren Typ 5-Sekretionssysteme (T5SS) vorhanden, wohingegen diese bei allen übrigen Vertretern der Gattung *Streptobacillus* fehlten. T5SS agieren in die Zellmembran integriert als so genannte Autotransporter pathogener Gram-negativer Bakterien, welche Sec-System-abhängig der Ausschleusung und Sekretion von Proteinen (im Sinne von Virulenzfaktoren) aus der Bakterienzelle dienen und auch bereits aus Vertretern der nahe verwandten Gattung *Fusobacterium* beschrieben sind (Desvaux 2005).

Die Verteilung putativer Virulenzgene und Pathogenitätsfaktoren erwies sich sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen Gattungen als unterschiedlich (s. Tabellen 7a-c). Die höchste Anzahl besaß *Se. termitidis* (41), gefolgt von den Gattungen *Leptotrichia* (22-27 [\bar{x} 25,3]), *Streptobacillus* (18-25 [\bar{x} 21,1]), *Oceanivirga* (20), *Sneathia* (19-20 [\bar{x} 19,5]) und *Caviibacter* (18). Sämtliche 23 *S. moniliformis*, die drei *S. notomytis*-Stämme sowie das Typstammgenom von *S. hongkongensis* besaßen einen einheitlichen Satz von 21 putativen Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierten Genen aus den Subkategorien "Resistance to antibiotics and

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

toxic compounds“ (Proteine/Enzyme zur Detoxifizierung von Quecksilber-, Kupfer-, Kobalt-, Zink-, Kadmium- und Magnesiumionen, putative Fluorchinolonresistenz) und *“Invasion and intracellular resistance”* (Gene eines putativen Virulenz-Operons aus der Gattung *Mycobacterium*; s. graue Markierung in Tabelle 7a). Den übrigen Vertretern fehlten zumindest einzelne dieser Gene. Drei Stämme von *S. moniliformis* (TSD4, IPDH 144-80, IKC1) sowie die Typstämme von *S. hongkongensis*, *S. felis*, *Sn. sanguinegens*, *“Sn. amni”*, *C. abscessus* und *O. salmonicida* sowie sämtliche *Leptotrichia* spp. und *Se. termitidis* besaßen zudem ein von *Streptococcus pyogenes* abgeleitetes Adhäsion (“*heat shock protein 33*”), wohingegen *S. moniliformis* NCTC 10773 auch Gene besaß, welche im Sinne einer Arsenresistenz zu interpretieren sind. Sechs der elf untersuchten *Leptotrichia*-Genome kodierten für ein putatives Internalin, welches homolog zu *Listeria monocytogenes* ist und bei dieser Spezies als essentieller Virulenzfaktor für die Aufnahme der Bakterien in die Epithelzellen gewertet wird [Bierne & Cossart 2007].

Erstmals fanden sich bei *S. hongkongensis*, *S. rattii*, *S. felis*, *Sn. sanguinegens*, *“Sn. amni”*, *Leptotrichia* spp. (DSM 19756^T, F0264, Str. W10393) und *Se. termitidis* molekulare Hinweise auf Resistenzgene gegenüber β -Laktam-Antibiotika (“ *β -lactamase class C and other penicillin binding proteins*”) und bei den beiden *C. abscessus*-Stämmen gegenüber Makroliden (“*macrolide export ATP-binding/permease protein MacB*”; s. Tabellen 7a-c). Während die Stämme *L. buccalis* DSM 1135^T und *Se. termitidis* NCTC 11300^T jeweils ein Gen für das *Vancomycin B-type resistance protein* VanW aufwiesen, fanden sich im *Se. termitidis*-Genom weitere Gene für Resistenzeigenschaften bzw. die Bildung von Bakteriozinen (“*Dihydrofolate synthase*”, “*Colicin V production protein*”, “*Fosfomycin resistance protein FosB*”, “*DNA gyrase subunit A + B*”, “*Acriflavin resistance protein*”; s. Tabellen 7b-c). Hinweise auf “*Multidrug Resistance Efflux Pumps*” fanden sich ferner in Stämmen von *S. hongkongensis*, *Sn. sanguinegens*, *“Sn. amni”*, *C. abscessus*, *O. salmonicida* und *Se. termitidis*.

Die dargestellten Einblicke sind in Ermangelung einer umfangreicheren Datenbank mit Virulenzgenen nahe verwandter Taxa als vorläufig zu betrachten. Auch impliziert die Auswertung mit vorerst nur einer Analysesoftware (SEED Viewer) vermutlich ebenfalls einen vorläufigen Charakter. Die aufgezeigten Gene sind – gerade im Hinblick auf die Resistenzeigenschaften – meist nicht mit einem entsprechenden Phänotyp *in vivo* korreliert (s. Kap. 5.3.2), weshalb diese Gene vermutlich nicht

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

funktional sind (in diesen Spezies *per se* nicht oder aufgrund entsprechender Sequenzabweichungen) oder weil komplexere ("additive" Resistenz)-Mechanismen die genetische Grundlage bilden. Dies trifft sicher auch auf einige der übrigen in den Tabellen 7a-c gelisteten Virulenzgene zu, denn beispielsweise wird bereits das Vorhandensein einer bakteriellen Gyrase mit dem Potential einer Fluorchinolonresistenz assoziiert, obwohl dies in keinem der dargestellten Fälle durch spontan auftretende oder mittels Gen-Knockout beschriebene Phänotypen verifiziert worden ist. In anderer Hinsicht erstaunt, dass ausgerechnet die bislang nicht regelmäßig als Krankheitserreger identifizierten Taxa über Pathogenitätsmechanismen zu verfügen scheinen, welche *in vivo* jedoch unbekannt sind (bspw. Internalin-Homologe bei *Leptotrichia* spp.). Die wenigen verfügbaren Arbeiten zur Genomanalyse bei *Leptotrichiaceae* streifen das Thema Virulenzgene entweder überhaupt nicht oder sind in dieser Hinsicht wenig konkret [Nolan *et al.* 2009, Harmon-Smith *et al.* 2010, Harwich *et al.* 2012]. Zwar sehen Harwich *et al.* *in vitro* gewisse Effekte im Hinblick auf Hämolyse und Adhäsion, aber sie können dazu keine exakten Proteinhomologe determinieren [Harwich *et al.* 2012]. Die Autoren hypothesieren, dass zwei (28 und 161 kDa große) putative Homologe von Hämolysinen für eine *in vitro* messbare Hämoglobinfreisetzung sowie den α -hämolysierenden Phänotyp verantwortlich sein könnten. Die Ko-Kultur von „*Sn. amnii*“ mit humanen Zervixkarzinomzellen verursachte *in vitro* eine Adhäsion der Bakterien an die Karzinomzellen mit nachfolgender möglicher Perforation und zytotoxischer Degeneration derselben. Auch dieses putative Zytotoxin, welches möglicherweise sogar identisch mit den zuvor genannten putativen Hämolysinen sei, wurde auf Proteinebene nicht näher lokalisiert [Harwich *et al.* 2012] und konnte in eigenen Untersuchungen des „*Sn. amnii*“-Genoms auch mittels SEED-Viewer bislang nicht bestätigt werden. Auch konnte die bisherige Virulenzgen-Analyse insbesondere innerhalb der Gattung *Streptobacillus* bislang noch keine eindeutigen Homologe für solche Häm- oder Zytotoxine oder weitere immunmodulatorische Proteine aufzeigen, welche im Hinblick auf die Pathogenese zu erwarten wären. Ein erster direkter Vergleich mit dem näheren verwandtschaftlichen Umfeld (der Gattung *Fusobacterium*) ergibt innerhalb desselben Suchwerkzeugs (SEED-Viewer) bislang ebenfalls keine Hinweise auf übersehene Gene (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Gattung *Fusobacterium* sind ein Hämagglutinin, Leukotoxin (LktA), Hämolysin (Hly) und Lipopolysaccharid sowie Homologe für das von *Salmonella* beschriebene

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

putative Transportprotein YebN (FebN) und das bei *E. coli* vorkommende Transmembranprotein TonB im Genom von *F. nucleatum* als Virulenzgene beschrieben worden [Nagaraja *et al.* 2005, Kumar *et al.* 2013, Antiabong *et al.* 2015]. Fap2, ein Autotransporter der Außenmembran, wurde unlängst in dieser Spezies als Galaktose-sensitives Adhäsion erkannt, welches durch Ko-Aggregation von Bakterien bei der Biofilmbildung sowie Zell-Adhäsion ebenfalls im Sinne eines Virulenzfaktors interpretiert wird [Copenhagen-Glazer *et al.* 2015]. Weiterhin weisen *Fusobacterium* spp., welche aktiv in die Zellen ihrer Wirte invadieren, größere Genome und FadA-verwandte Adhäsine und Zelloberflächen-assoziierte Proteine, welche die MORN2-Domäne mit unbekannter Funktion enthalten, auf [Ikegami *et al.* 2009, Liu *et al.* 2014, Manson McGuire *et al.* 2014]. *Fusobacterium necrophorum* verfügt darüber hinaus über ein 42,4 kDa großes, an bovine Endothelzellen bindendes äußeres Membranprotein, welches eine 96%ige Homologie zu FomA von *F. nucleatum* aufweist [Kumar *et al.* 2015]. Letzteres wirkt zusätzlich immunogen, bindet bekanntermaßen an das im Speichel enthaltene Protein Statherin und unterstützt so die Akkumulation dieser Bakterien in der Mundhöhle [Nakagaki *et al.* 2010]. Ferner wurden putative Resistenzgene für die antimikrobiellen Wirkstoffe Akriflavin, Bazitracin, Bleomycin, Daunorubicin und Florfenicol gefunden [Kapatral *et al.* 2003]. Sämtliche der vorgenannten Homologe sind selbst innerhalb der Gattung *Fusobacterium* teilweise nur bei einzelnen Spezies beschrieben und wurden bislang weder mittels SEED-Viewer noch durch gezielte BLAST-Abfragen innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* nachgewiesen.

Zukünftige Studien sollen den Aufbau einer profunderen „Virulenzgen-Datenbank“ für den Stamm (Phylum) Fusobacteria ermöglichen, mit deren Hilfe die Genomanalysen wiederholt werden können, um aussagekräftigere Resultate – auch in Bezug auf die mit diesen Genen assoziierten Phänotypen – zu erzielen.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 7a: Virulenz- bzw. Abwehr-assoziierte Gene gemäß SEED-Viewer [Overbeek et al. 2005] (RAST-Server [Aziz et al. 2008]) für die Gattungen *Streptobacillus*, *Sneathia*, *Cavibacter* und *Oceanivirga*.

Genfunktion	Stammnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	44	45	46			
Gesamtanzahl Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene		21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	22	20	20	25	22	21	21	18	20	19	18	18	20			
Chaperonin (Hitzeshockprotein 33)																							X															
Quecksilberionen-Reduktase (EC 1.16.1.1)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Kupfer-translozierende P-Typ ATPase (EC 3.6.3.4)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Kupfer-Zink-Kadmium Abwehrprotein		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
DNS-Gyrase B-Untereinheit (EC 5.99.1.3)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DNS-Gyrase A-Untereinheit (EC 5.99.1.3)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Zytoplasmatisches Kupfer-Homöostase-Protein CutC		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Magnesium- und Kobalt-Efflux-Protein CorC		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PF00070 Familie, FAD-abhängige NAD(P)-Disulphid-Oxidoreduktase		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Quecksilberionen-Reduktase (EC 1.16.1.1)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
"kleine Untereinheiten" (<i>small subunit</i> [SSU]) ribosomales Protein S7p (S5e)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Translations-Elongationsfaktor G		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Translations-Elongationsfaktor Tu		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SSU ribosomales Protein S 12p (S23e)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RNS-bindendes Protein Jag		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Protein YidD		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Innenmembran-Protein Translokase-Komponent YidC, Kurzform Oxal-ähnlich		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Fortsetzung Tabelle 7a

DNS-abhängige RNS-Polymerase β'-Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-abhängige RNS-Polymerase β-Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
"große Untereinheiten" (<i>large subunit</i> [<i>LSU</i>]) ribosomales Protein L35p	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Translations-Initiationsfaktor 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
LSU ribosomales Protein L20p	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arsen-Efflux-Pumpen-Protein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arsenat-Reduktase (EC 1.20.4.1)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Innenmembran-Protein Translokase-Komponent YidC, Langform																								
Quecksilber-Abwehrprotein-Operon, Regulationsprotein																								
Transkriptionsregulator, MerR-Familie																								
β-Laktamase Klasse C und andere Penicillin-bindende Proteine																								
Multi-antimikrobielles Extrusionsprotein (Na ⁺ /Medikamenten-Aniporter), Multimedikament- und Toxin-Extrusions (MATE)-Familie von <i>multidrug resistance</i> (MDR)-Efflux-Pumpen																								
MATE-Familien-Efflux-Pumpen, YdhE/NorM-Homolog Operon																								
Negativ-transkriptionales Regulator-Kupfer-Transport-Operon																								
Kadmium-transportierende ATPase (EC 3.6.3.3)																								
Kadmium-Efflux-System, Hilfsprotein																								
Kadmium-transportierende ATPase (EC 3.6.3.3)																								
Makrolid-Export ATP-Bindung/Pemtease-Protein MacB (EC 3.6.3.-)																								

Grüne Markierung: Genfunktionen finden sich auch bei Vertretern der Gattungen *Leptotrichia* und/oder *Sebadella*; graue Markierung: einheitlichen Satz von 21 putativen Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Genen

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 7b: Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene gemäß SEED-Viewer [Overbeek et al. 2005] (RAST-Server [Aziz et al. 2008]) für die Gattung *Leptotrichia*.

Genfunktion	DSM 1135	DSM 19756	F0264	F0254	DSM 19757	DSM 19758	F0279	W10393	W9775	F0581	F0557
Stammnummer	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Gesamtanzahl Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene	27	26	26	22	25	29	24	26	25	24	24
Chaperonin (Hitzeschockprotein 33)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Quecksilberionen-Reduktase (EC 1.16.1.1)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Negativ-transkriptionales Regulator-Kupfer-Transport-Operon	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kupfer-translozierende P-Typ ATPase (EC 3.6.3.4)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-bindender Schwermetall-Resonanz-Regulator	x										
Kobalt-Zink-Kadmium Abwehrprotein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-Gyrase B-Untereinheit (EC 5.99.1.3)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-Gyrase A-Untereinheit (EC 5.99.1.3)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vancomycin Typ B Resistenz-Protein VanW	x										
Kadmium-Efflux-System, Hilfsprotein	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Multi-antimikrobielles Extrusionsprotein (Na ⁺ /Medikamenten-Antiporter), Multimedikament- und Toxin-Extrusions (MATE)-Familie von <i>multidrug resistance</i> (MDR)-Efflux-Pumpen	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MATE-Familien-Efflux-Pumpen, YdhE/NorM-Homolog	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PF00070 Familie, FAD-abhängige NAD(P)-Disulphid-Oxidoreduktase	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Quecksilberionen-Reduktase (EC 1.16.1.1)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
"kleine Untereinheiten" (<i>small subunit</i> [SSU]) ribosomales Protein S7p (S5e)	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Translations-Elongationsfaktor G	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Translations-Elongationsfaktor Tu	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
SSU ribosomales Protein S12p (S23e)	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
RNS-bindendes Protein Jag	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Protein YidD	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Innenmembran-Protein Translokase-Komponent YidC, Kurzform Oxal-ähnlich	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-abhängige RNS-Polymerase β'-Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DNS-abhängige RNS-Polymerase β-Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
putatives Internalin	x			x	x	x	x		x		
"große Untereinheiten" (<i>large subunit</i> [LSU]) ribosomales Protein L35p	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
Translations-Initiationsfaktor 3	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
LSU ribosomales Protein L20p	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
Quinolinat-Synthase (EC 2.5.1.72)							x	x			
Quinolinat-Phosphoribosyltransferase (dekarboxylierend; EC 2.4.2.19)							x	x			
L-Aspartat-Oxidase (EC 1.4.3.16)							x	x			
Internalin A (LPXTG Motiv)							x				
Kupfer-Chaperon									x		
β-Laktamase Klasse C und andere Penicillin-bindende Proteine			x	x					x		
Transkriptionsregulator, MerR-Familie			x	x							

Grüne Markierung: Genfunktionen finden sich auch bei Vertretern der Gattungen *Streptobacillus*, *Sneathia*, *Caviibacter*, *Oceanivirga* und/oder *Sebaldella*

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 7c: Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene gemäß SEED-Viewer [Overbeek et al. 2005] (RAST-Server [Aziz et al. 2008]) für die Gattung *Sebaldella*.

Genfunktion	NCTC 11300
Stammnummer	32
Gesamtanzahl Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierte Gene	41
Chaperonin (Hitzeschockprotein 33)	x
Dihydrofolat-Synthase (EC 6.3.2.12)	x
Folypolyglutamat-Synthase (EC 6.3.2.17)	x
Amidophosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.14)	x
Azetyl-Koenzym A-Karboxyltransferase β -Kette (EC 6.4.1.2)	x
Kolizin V Produktionsprotein	x
tRNS Pseudouridin-Synthase A (EC 4.2.1.70)	x
Kupfer-translozierende P-Typ ATPase (EC 3.6.3.4)	x
Kobalt-Zink-Kadmium-Abwehrprotein	x
Kobalt-Zink-Kadmium Abwehrprotein CzcD	x
Putatives Kobalt-Zink-Kadmium Effluxsystem Membranfusionsprotein	x
Transkriptionaler Regulator, MerR-Familie	x
Kadmium-transportierende ATPase (EC 3.6.3.3)	x
Vancomycin Typ B Resistenz-Protein VanW	x
Arsen-Abwehrprotein ACR3	x
Arsen-Abwehr-Operon-Repressor	x
Arsen-Efflux-Pumpen-Protein	x
Arsenat-Reduktase (EC 1.20.4.1)	x
Zytoplasmatisches Kupfer-Homöostase-Protein CutC	x
Magnesium- und Kobalt-Efflux-Protein CorC	x
Fosfomycin-Abwehrprotein FosB	x
DNS-Gyrase B-Untereinheit (EC 5.99.1.3)	x
DNS-Gyrase A-Untereinheit (EC 5.99.1.3)	x
β -Laktamase (EC 3.5.2.6)	x
Kadmium-Efflux-System Hilfsprotein	x
Kadmium-transportierende ATPase (EC 3.6.3.3)	x
RND Efflux-System, äußeres Membran-Lipoprotein CmeC	x
Multi-antimikrobielles Extrusionsprotein (Na ⁺)/Medikamenten-Antiporter, Multimedikament- und Toxin-Extrusions (MATE)-Familie von <i>multidrug resistance</i> (MDR)-Efflux-Pumpen	x
Akriflavin-Abwehrprotein	x
"kleine Untereinheiten" (<i>small subunit</i> [SSU]) ribosomales Protein S7p (S5e)	x
Translations-Elongationsfaktor G	x
Translations-Elongationsfaktor Tu	x
SSU ribosomales Protein S12p (S23e)	x
RNS-bindendes Protein Jag	x
Protein YidD	x
Innenmembran-Protein Translokase-Komponent YidC, Kurzform Oxal-ähnlich	x
DNS-abhängige RNS-Polymerase β '-Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x
DNS-abhängige RNS-Polymerase β -Untereinheit (EC 2.7.7.6)	x
"große Untereinheiten" (<i>large subunit</i> [LSU]) ribosomales Protein L35p	x
Translations-Initiationsfaktor 3	x
LSU ribosomales Protein L20p	x

Grüne Markierung: Genfunktionen finden sich auch bei Vertretern der Gattungen *Streptobacillus*, *Sneathia*, *Caviibacter*, *Oceanivirga* und/oder *Leptotrichia*

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.4.2 Phylogenetische Analyse der orthologen Gene der untersuchten *Streptobacillus*-Isolate

Die phylogenetischen Betrachtungen beschränken sich für die vorliegende Arbeit auf die medizinisch bedeutsamen Vertreter der Gattung *Streptobacillus* und hier insbesondere auf *S. moniliformis*. Anhand der Genome dieser Arbeit wurde jeweils das MCG (s. Kap. 2.1.5) für die Gattung *Streptobacillus* und die Spezies *S. moniliformis* bestehend aus solchen Genen, welche in allen verfügbaren Genomen dieser gemeinsamen Gruppen zu finden sind, bestimmt und für einen Vergleich herangezogen [von Mentzer *et al.* 2014]. Für die untersuchten Isolate der Gattung *Streptobacillus* resultierten 281 orthologe Gene für einen Vergleich der Stämme 1-29 von *S. moniliformis*, *S. rattii*, *S. notomytis*, *S. felis* und *S. hongkongensis* (s. Tab. 2). Daraufhin wurden die Allelvarianten (unterschiedliche Sequenzvarianten eines jeden Gens der beiden jeweiligen MCG-Gruppen) mittels BLAST-basierter Methodik extrahiert und individuell zunächst für jedes Gen aligniert und nachfolgend zu einer Langsequenz aneinandergereiht (konkateniert; s. Kap. 2.1.5; [Eisenberg *et al.* 2016b]). So entstanden zwei Alignments mit 219961 bp für die 29 *Streptobacillus*-Stämme und mit 546508 bp für die 23 *S. moniliformis*-Stämme, welche nachfolgend für die phylogenetische Analyse herangezogen wurden. Für die Phylogenie der Gattung *Streptobacillus* wurden 57841 einzelne Basenaustausche (SNPs) identifiziert und eine auf dem *randomized accelerated maximum likelihood* (RAxML, Version 8.1; *General Time Reversible* Modell) Algorithmus basierende Phylogenie abgeleitet ([Stamatakis 2006]; s. Abb. 22). Es fällt auf, dass die in den Kapiteln der Speziesneubeschreibungen (s. a. **6.2**, **6.3**, **6.5** u. **6.6**.) getroffenen Aussagen zur Phylogenie von Streptobazillen auch sehr gut von einer erheblich tiefergehenden Genomanalytik gestützt werden.

Zur Entschlüsselung der innerartlichen Verwandtschaftsbeziehungen ausschließlich innerhalb der zahlenmäßig am stärksten vertretenen Spezies *S. moniliformis* wurde die Genomanalyse wiederholt und nun eine Anzahl von 775 orthologen Genen innerhalb der Stämme 1-23 (s. Tabelle 2) betrachtet. Dies führte zu einem korrespondierenden Alignment aus insgesamt 5211 SNPs. Die grafische Darstellung dieser Berechnung ist als phylogenetischer Baum in Abbildung 23 dargestellt (s. a. **6.10**). Man erkennt, dass die in dieser Arbeit betrachteten *S. moniliformis* eine heterogene Population weitgehend ohne Klusterbildung darstellen. Dies ist zunächst auch nicht verwunderlich, denn die untersuchten Stämme repräsentieren doch eine

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

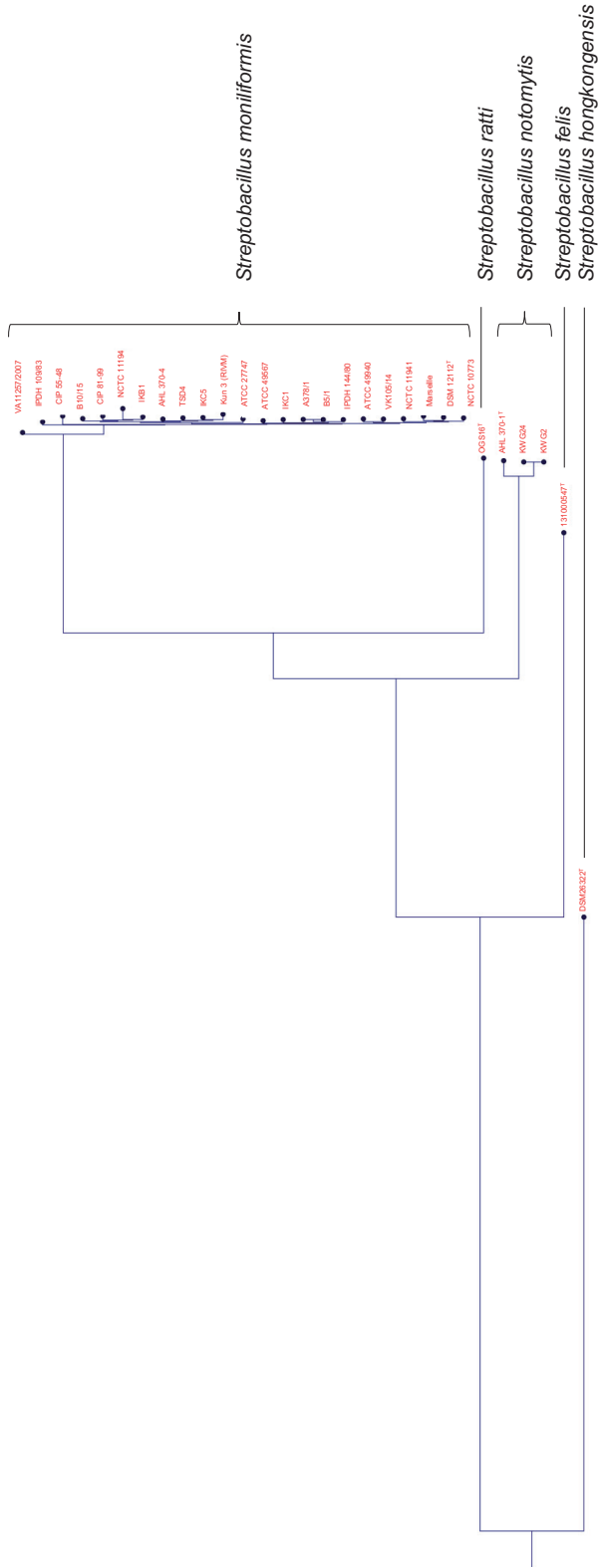


Abbildung 22: Phylogenetisches Modell der Gattung *Streptobacillus* nach dem *Randomized Axelerated Maximum Likelihood-Algorithmus* (RAXML) 8.1 [Stamatakis 2014] unter Verwendung des *General Time Reversible Model*. Der Baum basiert auf 281 orthologen Genen (57841 SNPs) und stellt die Stämme 1-29 der Tabelle 6 dar.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

große Bandbreite in Bezug auf Zeit und Raum, indem sie eine Epoche von nahezu 90 Jahren und ein fast weltweites Einzugsgebiet abdecken. Die Ergebnisse korrigieren aber auch die nur auf Basis der ANI-Werte oder der Phylogenien funktioneller Gene getroffenen Einschätzungen, dass es sich innerhalb der Spezies *S. moniliformis* um eine ausgesprochen homologe Population handelt ([Costas & Owen 1987]; s. **6.3**). Lediglich die Stämme A378/1 und B5/1 (Stammnummern 15 u. 18; s. Tab. 2 u. Abb. 23) bilden eine gemeinsame Gruppe scheinbar identischer Organismen. Dies wird sowohl durch die identischen SNPs als auch durch eine identische CRISPR-Region sowie einen identischen MLVA-Genotyp (s. Kap. 5.4.3 u. **6.10**) unterstrichen. Sie entstammen beide derselben Quelle (s. Tabelle 2), wurden jedoch von unterschiedlichen Tierspezies 1995 und 2009 ohne einen gemeinsamen epidemiologischen Hintergrund isoliert. Es ist daher nicht völlig auszuschließen, dass die vermeintlich hohe Verwandtschaft bei diesen beiden Isolaten auch auf einer Verwechslung oder Kontamination beider Stämme beruht (s. a. Kap. 5.4.3). Die oben beschriebene Heterogenität innerhalb der Spezies *S. moniliformis* kann mangels geeigneter Studien mit nahe verwandten Mikroorganismen derzeit nicht abschließend bewertet werden. Hierzu wären auch weitere SNP-Analysen mit mehr kleinräumig gesammelten *S. moniliformis*-Isolaten zielführend. Zur besseren Einstufung der dargestellten Heterogenität sei jedoch – trotz oft fehlender SNP-Definitionen – auf die Anzahl der SNPs pro untersuchte Stämme (und ungefähre Genomgröße) in Genomstudien mit anderen Erregern verwiesen. Diese betragen bei *Y. pestis* 2326/133 (ca. 4,7 Mbp; [Cui *et al.* 2013]), bei *B. anthracis* 3500/5 (ca. 5,2 Mbp; [Pearson *et al.* 2004]), bei *M. avium paratuberculosis* 28402/133 (ca. 4,8 Mbp; [Leao *et al.* 2016]), bei *M. leprae* 146/2 (ca. 3,3 Mbp; [Monot *et al.* 2009]) und bei *Staphylococcus aureus* 4310 (nur im Kerngenom)/62 (ca. 2,8 Mbp; [Harris *et al.* 2010]). Neben zum Teil beträchtlichen Genomgrößenunterschieden (s. Tabelle 6) übertrifft *S. moniliformis* somit auch hinsichtlich der Anzahl von SNPs die „genetisch-monomorphen“ Pathogene wie *Y. pestis*, *B. anthracis* und *M. leprae*.

In einer Arbeit, in welcher es vornehmlich um die Identifikation molekularer Markersequenzen (conserved signature indels [CSIs]) innerhalb des übergeordneten Stamms (Phylum) Fusobacteria geht, beschreiben die Autoren, dass sie 44 solcher CSIs in einer Analyse von 45 Fusobacteria-Genomen identifizieren konnten [Gupta and Sethi 2014]. Die daraus abgeleiteten drei CSIs für die Familie *Leptotrichiaceae*

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

konnten in der vorliegenden Arbeit auch für die neu beschriebenen Spezies und Gattungen bestätigt werden (s. [6.10](#)).

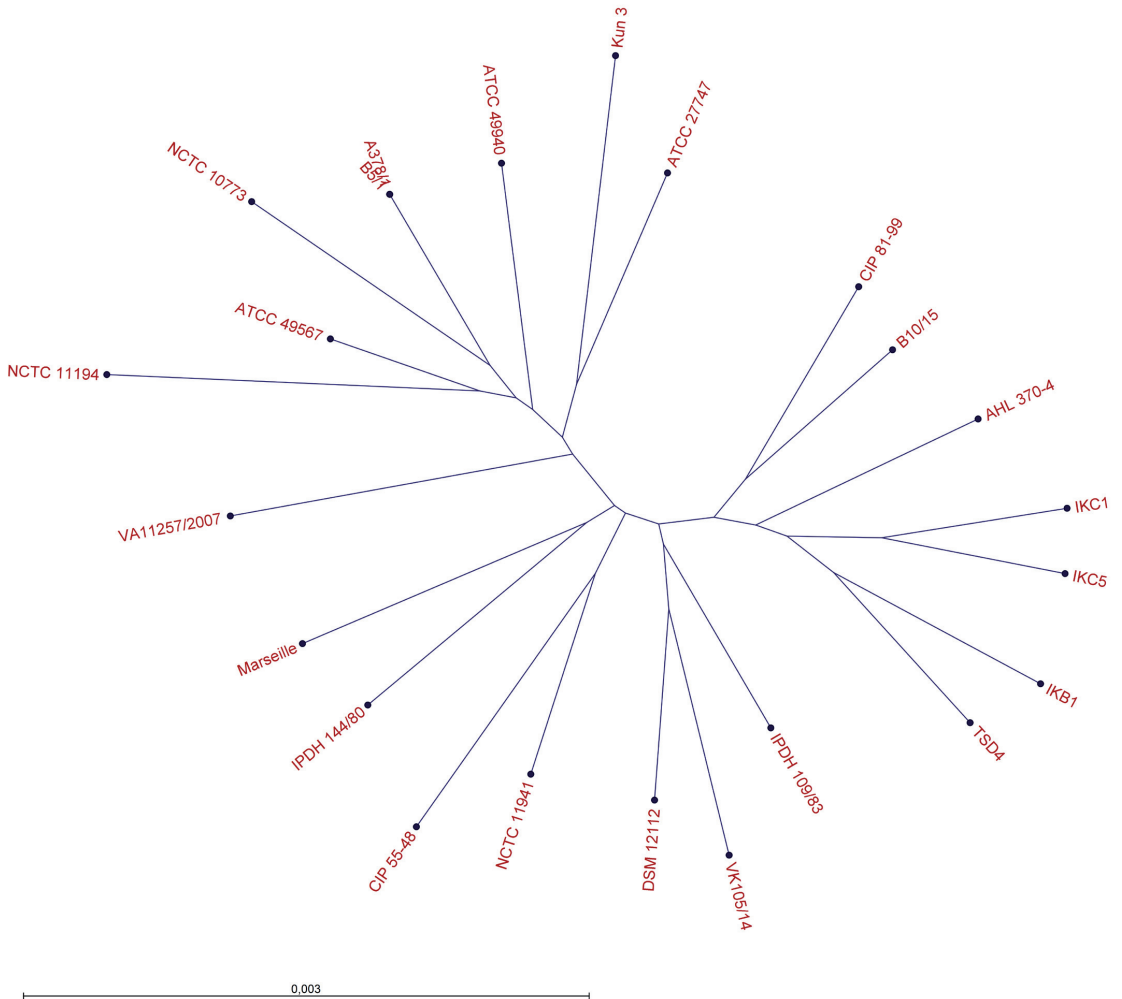


Abbildung 23: Phylogenetisches Modell der Spezies *Streptobacillus moniliformis* nach dem *Randomized Axelerated Maximum Likelihood-Algorithmus (RAxML) 8.1* [Stamatakis 2014] unter Verwendung des *General Time Reversible Model*. Der Baum basiert auf 775 orthologen Genen (5211 SNPs) und stellt die Stämme 1-23 der Tabelle 6 dar.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.4.3 Typisierungsverfahren zur innerartlichen Verwandtschaft von *S. moniliformis*

Zwar sind vollständige Genomsequenzierungen für zukünftige Betrachtungen der Verwandtschaftsbeziehungen weiterhin essentiell, jedoch erfordern sie unweigerlich das Vorliegen eines Isolates, und deren Auswertungen sind – wie die Untersuchungen im Kapitel 5.4 gezeigt haben (s. a. **6.10**) – mit einem erheblichen biomathematischen Aufwand verbunden. Aus diesem Grund wurde auf Basis der vorliegenden Genomdaten nach einer einfacher durchzuführenden Methodik zur Stammtypisierung gesucht, welches sich optimaler Weise sogar ohne vorherige Isolierung des Erregers anwenden lässt, einfach und ohne hohe Kosten durchführbar ist, den Vergleich zwischen in unterschiedlichen Laboren erhobenen Daten zulässt und möglichst einen Mehrwert in Bezug auf die mangelnde Speziespezifität der existierenden molekularen Nachweissysteme bietet. Aufgrund der zuletzt genannten Aspekte und der Tatsache, dass die Genome von Streptobazillen eine günstige Ausgangslage in Bezug auf repetitive genetische Elemente (so genannte *Tandem Repeats* [TR]) bieten, wurde vorzugsweise nach einer *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)-basierten Lösung gesucht. Diese Typisierungstechnik wird bereits für eine Vielzahl von Mikroorganismen, darunter *B. anthracis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Coxiella burnetii* und *Y. pestis* eingesetzt (Übersicht in Vergnaud & Pourcel [2009]). Im Gegensatz zu anderen molekularen Typisierungen wie dem MLST-basierten Verfahren lässt sich bei Auswahl entsprechend großer und robuster VNTR-Loki manchmal ein zusätzlicher Aufwand in Form von Sequenzierungen vermeiden, weil eine rein Elektrophorese-gestützte Auswertung ausreicht. Dies wurde für das hier dargestellte Schema zumindest für den dritten Locus (VNTR_Sm3) erfüllt, wohingegen VNTR_Sm1 und VNTR_Sm2 mit TR-Längen von 3 und 6 nt sequenziert werden müssen. Der Zusammenschluss dieser drei VNTR-Loki zu einem effizienten *Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis* (MLVA)-Schema sollte den oben skizzierten Anforderungen gerecht werden [Pourcel & Vergnaud 2011].

5.4.3.1 VNTR-Analyse

Zunächst wurden unter Nutzung der Standardeinstellungen mittels des web-basierten Programms „*tandem repeat finder*“ (TRF; <http://tandem.bu.edu/trf/trf.basic.submit.html>) 127 TR im Typstammgenom von

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

S. moniliformis identifiziert. Die Suche nach geeigneten TR beinhaltete eine hohe Reinheit, eine möglichst große Länge und/ oder eine möglichst hohe Anzahl an Kopien des jeweiligen TR [Legendre *et al.* 2007]. Während die Gesamtzahl der TR bei *S. moniliformis* keine Probleme darstellte – bei *Chlamydia psittaci* eignen sich beispielsweise lediglich fünf Loki insgesamt [Pourcel & Vergnaud 2011] – zielen Länge und Anzahl vordergründig darauf ab, robuste Marker im Hinblick auf aussagekräftige Ergebnisse mittels Gelelektrophorese zu erzielen [Pourcel & Vergnaud 2011]. Darüber hinaus können kurze Loki den Nachteil haben, nur sehr geringen phylogenetischen Inhalt zu besitzen und zudem instabil zu sein [Bricker *et al.* 2003]. Bei der Reinheit spielt die Homogenität der Sequenz eine Rolle, denn einzelne Basenunterschiede können den TR „degenerieren“ und so den Einsatz erschweren oder unmöglich gestalten [Pourcel & Vergnaud 2011]. Nach diesen Kriterien ausgewählte, interessante TR für *S. moniliformis* wurden zunächst gegen sämtliche Genome (s. Tabelle 2) aligniert, um deren prinzipielle Eignung zu belegen und verschiedene Alleltypen anhand der unterschiedlichen Kopienzahlen erkennen zu können. Die weitere Analyse beschränkte sich auf die drei mittels Alignment überprüften, variabelsten VNTR-Loki. Diese drei Loki waren ausschließlich in Genomen von *S. moniliformis* nachzuweisen und deren Abwesenheit bei allen übrigen untersuchten Vertretern der *Leptotrichiaceae* suggerierte Speziespezifität als eine der eingangs definierten Anforderungen. Für die vorliegende Stammsammlung wurde die Diskriminierungsfähigkeit für die Kombination dieser letztlich ausgewählten drei variabelsten VNTR-Loki mittels einer web-basierten Anwendung (*discriminatory power calculator*; http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/) berechnet. Es ergab sich mit 0,94 (94%) eine sehr hohe Diskriminierungsfähigkeit *in silico*.

5.4.3.2 PCR-basierte Validierung der *in silico* erhobenen Ergebnisse

Zehn Stämme von *S. moniliformis* (Stammnummern 1, 2, 3, 12, 14, 15, 21, 22, 23 und 49 gemäß Tabelle 2) sowie alle zugänglichen übrigen Spezies („non-*S. moniliformis*“) der Familie *Leptotrichiaceae*, für welche DNS gewonnen werden konnte, wurden in die Validierung einbezogen. Die gemäß Tabelle 8 erzeugten PCR-Produkte wurden aufgereinigt, sequenziert und die Sequenzen mittels TRF und/ oder BLASTN 2.3.1+ (NCBI) [Zhang *et al.* 2000] analysiert und mit den *in silico* Ergebnissen verglichen. Erwartungsgemäß konnte ausschließlich für die

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

S. moniliformis-Stämme eine Amplifikation der VNTR-Loki erzielt werden. Dabei zeigte jeder der zehn Stämme mittels Sequenzierung dasselbe spezifische Muster an TR, welches durch die vorherige Analyse der Genome vorhergesagt worden war (s. Tabelle 8). VNTR_Sm1-Allele von zwei Stämmen, welche zuvor *in silico* nicht zugeordnet werden konnten, ließen sich *in vitro* erfolgreich amplifizieren und nachvollziehen (s. unterstrichene Allele in Tabelle 8). Nach der erneuten Berechnung der Diskriminierungsfähigkeit stieg der DI infolge der verbesserten Ausgangslage zweier VNTR_Sm1-Allele sowie des Stammes A40/13 auf 0,95.

Um den Austausch und Zuwachs an Erkenntnissen zukünftig zu fördern, wurde eine Nomenklatur für das bestehende MLVA-Schema und die erzielten Genotypen (jeweils bestehend aus den Alleltypen der drei VNTR-Loki) vorgeschlagen, welche durch einen in Anlehnung an den Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) mit LHL abgekürzten Allelkode zum Ausdruck kommt (s. Tabelle 9). So sind dem Alleltypen VNTR_Sm2 reale Zahlenwerte für die tatsächlich vorhandene TR-Kopienanzahl am Locus zugrunde gelegt. Bei VNTR_Sm1 und VNTR_Sm3 handelt es sich jeweils um einen nach Auf- bzw. Abrundungen gemäß der Vorgabe ganzer Zahlen [Pourcel & Vergnaud 2011] erzeugten Zahlenwert. VNTR_Sm1-Zahlenwerte wurden aufgerundet (bspw. von 8,7 auf 9). VNTR_Sm3-Zahlenwerte wurden aus Gründen der Eindeutigkeit gemäß den Vorgaben [Pourcel & Vergnaud 2011] auf den nächsten Halbwert aufgerundet und nach dem Runden verdoppelt, um immer ganzzahlige Zahlenwerte zu erhalten (bspw. von 7,2 auf 15 und von 8,7 auf 18). Folglich müssen bei der Rückrechnung die Zahlenwerte halbiert werden, um auf die tatsächliche ganze TR-Kopienanzahl zu schließen (s. Tabelle 9 u. **6.10**). Eine Online-Datenbank für aktuelle und zukünftige MLVA-Ergebnisse von *S. moniliformis* war eine naheliegende Folge, welche auf dem Webserver der Université Paris-Sud, Orsay, Frankreich, eingerichtet wurde (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public>; Abb. 24).

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

MLVAbank for Microbes Genotyping

Public Databases

Home Users Databases

Streptobacillus moniliformis

Owned by StreptobacillusmoniliformisUK

Columns (click to hide): key - strain_id - species - year of isolation/detection - host_species - isolated_from - clinical_findings - geolocalisation - lon - lat - strain_reference - genome_reference - accession_no. - contact - MLVA_Giessen - VNIIR_Sml1 - VNIIR_Sml2 - VNIIR_Sml3

Views Options Panel selection

Key	strain_id	species	year of isolation/detection	host_species	isolated_from	clinical findings	geolocalisation	lon	lat	strain_reference	genome_reference	accession_no.	contact	MLVA_Giessen	VNIIR_Sml1	VNIIR_Sml2	VNIIR_Sml3
SB001	DSM 121121 (4ATCC 14647T)	Streptobacillus moniliformis	1925	human	blood	rat bite fever	France	2.213749	46.227638	Levadi et al. 1925	Nolan et al. 2009	CP001779.1 CP001780.1	Tobias Eisenberg	LHL1	9	0	16
SB002	CP 55-48	Streptobacillus moniliformis	1947	mouse	pus	lymph adenitis	UK	-3.435973	55.378051	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWGV000000000	Tobias Eisenberg	LHL10	7	0	16
SB003	ATCC 27447	Streptobacillus moniliformis	1964	turkey	synovia	septic arthritis	USA	-85.212891	3.709024	Yamamoto & Clark 1966	Eisenberg et al. 2016	LWGV000000000	Tobias Eisenberg	LHL4	10	0	16
SB004	NCTC 10773	Streptobacillus moniliformis	1971	human	blood	rat bite fever	UK	-3.435973	55.378051	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWRU000000000	Tobias Eisenberg	LHL15	8	4	17
SB005	NCTC 11194	Streptobacillus moniliformis	1977	human	knee aspirate	rat bite fever	UK	-3.435973	55.378051	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWGD000000000	Tobias Eisenberg	LHL16	6	0	17
SB006	IPDH 144/80	Streptobacillus moniliformis	1980	turkey	synovia	septic arthritis	Germany	10.451526	51.165691	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWGV000000000	Tobias Eisenberg	LHL5	6	0	16
SB007	CP 91-99	Streptobacillus moniliformis	1981	human	blood	rat bite fever (wild rat bite)	France	2.213749	46.227638	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LW6Z000000000	Tobias Eisenberg	LHL10	7	0	16
SB008	AHL 370-4	Streptobacillus moniliformis	1982	mouse	pus	ear infection	Australia	133.775196	-25.274398	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWTA000000000	Tobias Eisenberg	LHL3	7	2	15
SB009	NCTC 11941	Streptobacillus moniliformis	1983	human	blood	Haverhill fever	UK	-3.435973	55.378051	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWGD000000000	Tobias Eisenberg	LHL11	6	0	16
SB010	IPDH 109/83	Streptobacillus moniliformis	1983	turkey	synovia	septic arthritis	Germany	10.451526	51.165691	Eisenberg et al. 2015	Eisenberg et al. 2016	LWFB000000000	Tobias Eisenberg	LHL5	6	0	16
SB011	ATCC 43567	Streptobacillus moniliformis	1989	mouse	pus	lymph adenitis	Germany	10.451526	51.165691	Wulterweber et al. 1990	Eisenberg et al. 2016	LWTC000000000	Tobias Eisenberg	LHL5	6	0	16
SB012	Vun 3 (86/96)	Streptobacillus moniliformis	1991	rat	ear	unknown	The Netherlands	6.291266	52.132630	Boot et al. 2002	Eisenberg et al. 2016	LWFD000000000	Tobias Eisenberg	LHL11	6	0	16
SB013	ATCC 49340	Streptobacillus	1992	rat	pus	otitis media	Germany	10.451526	51.165691	Wulterweber et al.	Eisenberg et al. 2016	LWTE000000000	Tobias Eisenberg	LHL6	6	0	14

Abbildung 24: Neu etabliertes Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA)-Schema zur Typisierung von *Streptobacillus moniliformis*. Bildschirmansicht des Webservers der Universität Paris-Sud, Orsay, Frankreich (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public>).

Auch für die übrigen *S. moniliformis*-Stämme dieser Studie ließen sich eindeutige Typisierungsergebnisse erzielen. Vier Allelkodes wurden mehr als einmal nachgewiesen, nämlich je zweimal LHL2, LHL10 und LHL11 und fünfmal LHL5 (s. Tabelle 8). Die zwei Stämme des Allelkodes LHL2 sind erneut die Stämme A378/1 und B5/1 (Stammnummern 15 und 18; s. Tab. 2), welche auch schon in der phylogenetischen Analyse aufgefallen waren (s. Kap. 5.3.2). Zur Überprüfung der Stämme mit identischen Allelkodes auf Klonalität wurde ein zusätzlicher Locus mit hohem diskriminatorischen Potential, namentlich die so genannte CRISPR-Region (s. Kap. 2.1.5), welche bereits für *S. moniliformis* beschrieben ist (http://crispr.u-psud.fr/cgi-bin/crispr/SpecieProperties.cgi?Taxon_id=519441), untersucht. Im Gegensatz zu den übrigen Allelkodes LHL5, LHL10 und LHL11 zeigen die beiden LHL2-Stämme (Nrn. 15 und 18) eine identische CRISPR-Region, wodurch die phylogenetische Hypothese der Klonalität dieser beiden Stämme gestützt wird.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

(Daten nicht gezeigt). Die CRISPR-Region stellt in erster Linie einen Mechanismus der bakteriellen Immunabwehr dar, bei welchem Viren und andere invasive DNS-Moleküle unschädlich gemacht werden (s. Kap. 2.1.5). Durch die Länge von bis über 3000 nt und den hohen Grad an Heterogenität ist die CRISPR-Region auch grundsätzlich – wie bei der oben ausgeführten Fragestellung – geeignet, die Klonalität von Stämmen zu be- bzw. zu widerlegen. Allerdings wird diese Analytik derzeit noch durch kurze Sequenzfragmentlängen erschwert, welche nicht den kompletten CRISPR-Lokus überspannen.

Der zweite große Vorteil des dargestellten MLVA-Schemas zielt auf die kulturunabhängigen Bedingungen des Verfahrens ab, sodass die Analyse von Transmissionsketten damit direkt aus der Ausgangsmatrix wie bspw. einer oralen Tupfer- oder einer klinischen Probe möglich ist. Dies erscheint vor dem Hintergrund besonders relevant zu sein, als dass die etablierten PCR-Teste nicht einmal zuverlässig gattungs-, keinesfalls jedoch speziesspezifisch sind. Gerade in Bezug auf die meistens zur Erregerbestimmung eingesetzten partiellen 16S rRNS-Gensequenzierungen ist jedoch festzustellen, dass diese einige der unlängst beschriebenen neuen Taxa, welche gleichfalls bekanntermaßen Ratten kolonisieren, nicht zweifelsfrei von *S. moniliformis* unterscheiden können und somit zu unsicher für eine solide Pathogenbestimmung sind (s. Kap. 5.2 u. **6.9**).

Tabelle 8: *Streptobacillus moniliformis*-spezifische Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)-Loki sowie PCR-Bedingungen zu deren Nachweis[†]

Oligonukleotid- primer	VNTR-Position*	Repeat-Größe in Sequenz (5' – 3')	Repeat-Größe in Sequenz (5' – 3')	Repeat-Größe in Sequenz (5' – 3')	Größe des PCR-Produkts (nt)
VNTR_Sm1	1576120 - 1576145	3 (100)	TCA TTT ACT CAC CCT AGT AGT GGT	210	
VNTR_Sm2	1182890 - 1182907	6 (100)	CCA GTT GAA TAT AAG CTT GCT ATG G TGG AAC TGT TTG TTG AGT ATT TCC A	298	
VNTR_Sm3	284997 - 285268	36 (91)	AGG GAC AGA TGT TCA ATT TGT GTA TAC GCT GTA GGG TTG AAC GG ACA GTT TGA GCA CGT CTT AAT CC	830	

Die Primer wurden mittels Geneious (v. 8.1.3; Biomatters Ltd., Auckland, NZ) [Kearse et al. 2012] im flankierenden Bereich der VNTR-Loki generiert; * Position in Bezug auf das Typstammgenom *S. moniliformis* DSM 12112^T (CP001779.1); †: 20 µL PCR-Reaktionsmix enthält 10 µL Hotstar Taq MasterMix (Qiagen, Hilden), 1 µL jedes Vorwärts- und Rückwärts-Primers (10 pmol/µL) (TIB MOLBIOL, Berlin), 6 µL DNase freies Wasser (Qiagen, PCR-Qualität) und 2 µL extrahierte DNS; PCR-Programm: 1x (95°C, 15 Minuten [min.]), 40x (94°C, 30 sec.; 58°C, 30 sec.; 72°C, 30 sec.), 1x (72°C, 10 min.). Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid in einem 2%igen Agarosegel (100 V for 1.5 h) gefärbt und aufgetrennt und mittels Gel-Dokumentationssystem (BioDoc-It, UVP, GB) analysiert.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 9: *Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)-Alleltypen für die in dieser Arbeit verwendeten Streptobacillus moniliformis-Isolate und -Stämme*

Stammbezeichnung	VNTR_Sm1	VNTR_Sm2	VNTR_Sm3	Allelcode
DSM 12112 ^T	9	3	16	LHL1
CIP 55-48	7	3	16	LHL10
ATCC 27747	<u>10</u>	3	16	LHL4
NCTC 10773	8	4	17	LHL15
NCTC 11194	6	3	17	LHL16
IPDH 144/80	6	3	16	LHL5
CIP 81-99	7	3	16	LHL10
AHL 370-4	7	2	15	LHL3
NCTC 11941	6	3	18	LHL11
IPDH 109/83	6	3	16	LHL5
ATCC 49567	6	3	16	LHL5
Kun 3 (RIVM)	<u>6</u>	3	18	LHL11
ATCC 49940	6	3	14	LHL6
B10/15	6	4	15	LHL7
A378/1	8	5	16	LHL2
VA11257/2007	6	3	16	LHL5
VK105/14	8	3	16	LHL13
B5/1	8	5	16	LHL2
Marseille	6	4	14	LHL14
IKC1	6	3	15	LHL8
IKC5	5	3	15	LHL9
IKB1	6	3	16	LHL5
TSD4	11	3	18	LHL12
A40-13[#]	11	2	17	LHL17

Fett gedruckte Einträge stellen die für die Validierung verwendeten Stämme dar (s. Kap. 5.3.3.2); unterstrichene Allele wurden *in silico* nicht gefunden, konnten jedoch mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen werden; ^T: Typstamm; [#] Stamm wurde nur zur Validierung verwendet (kein komplettes Genom verfügbar)

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.4.3.3 Überprüfung der Leistungsfähigkeit des beschriebenen MLVA-Schemas
Als eine erfolgreiche Erprobung der im Kapitel 5.4.3 benannten Typisierungstechnik kann die in Kooperation mit der Uniklinik Tours, Frankreich, durchgeführte Diagnostik bei einem französischen Intensivpatienten mit RBF gewertet werden (s. **6.12**; [Eisenberg *et al.* 2017]). Über den bewusstseinsmäßig eingetrübten und wegen eines Epiduralabszesses und daraus folgender Tetraplägie und Instabilitäten in der Halswirbelsäule in ein künstliches Koma versetzten Mann konnten zunächst keinerlei Angaben zu dessen Krankheitsverlauf erhoben werden. Fieber und Gelenkentzündungen, jedoch kein Hautausschlag, waren darüberhinaus die einzigen Symptome. Durch eine aus dem Kniegelenkspunktat eingeleitete explorative 16S rRNS-Gensequenzierung fiel die Verdachtsdiagnose auf streptobazilläres RBF. Der zeitweise wieder ansprechbare Patient konnte schließlich angeben, dass er von einer seiner WürGESchlangen, nicht aber von einer Ratte gebissen worden sei. Die Arbeitshypothese bestand in einer durch Reptilienbiss ausgelösten *S. moniliformis*-Infektion, nachdem das Schlangenmaul unmittelbar zuvor bei der Rattenfütterung mit dem RBF-Erreger kontaminiert worden war. Es gelang, Rachentupferproben und -biopsien der gehaltenen Schlangenarten sowie einer Futterratte aus dem Haushalt des Erkrankten zu sichern. Die an diesen Proben eingeleitete MLVA-Untersuchung konnte eindeutig zeigen, dass ausschließlich die Proben der Futterratte und nicht der Schlangen *S. moniliformis* enthielten. Interessanterweise ließ sich ein identischer MLVA-Genotyp in den Proben von Patient und Ratte nachweisen, wodurch sich erstmals Hinweise auf die Transmissionskette im Rahmen epidemiologischer Abklärungsuntersuchungen ergaben. Zwar erscheint der dargestellte Übertragungsweg über Bisse Ratten-fressender Tiere weiterhin prinzipiell möglich, konnte jedoch im vorliegenden Fall nicht erhärtet werden. Hingegen gelang zum ersten Mal der Nachweis unterschiedlicher MLVA-Genotypen in derselben Ratte, was aufgrund der Kolonisierung mit unterschiedlichen Stämmen wahrscheinlich, jedoch noch nicht bewiesen war. Die speziesspezifische und nicht-invasive Methode hat damit zum ersten Mal ihre Leistungsfähigkeit *in praxi* unter Beweis gestellt (s. **6.12**).

5.5 Erweiterte Wirtsbeziehungen

Im Hinblick auf die im Kapitel 5.1 beschriebenen neuen Spezies sind die jeweiligen Reservoirwirte bestenfalls vorläufig charakterisiert. Es fanden sich aus den bislang dargelegten Untersuchungsergebnissen Hinweise darauf, dass zumindest einige

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vertreter der Familie *Leptotrichiaceae* sowohl in Bezug auf die reine Kolonisation als auch hinsichtlich ihres pathogenen Potentials ausgesprochen gut an bestimmte Reservoirwirtspezies adaptiert sind. So sind *S. moniliformis* besonders an *R. norvegicus* und möglicherweise auch an *R. rattus* angepasst, wohingegen Meerschweinchen sogar resistent für diesen Erreger erscheinen und stattdessen hier *C. abscessus* typische klinische Erscheinungen verursacht (s. 6.7). Wiederum deviante eigenständige Vertreter sind bei Meeressäugern, afrikanischen Hörnchen und Baumwollratten zu erwarten (s. Kap. 2.3.4 u. Abb. 16). Ähnlich enge Beziehungen zwischen einer Erregerspezies und zumindest einer Hauptwirtspezies finden sich beispielsweise auch in den Gattungen *Brucella* und *Leptospira* sowie bei den Vertretern des *M. tuberculosis*-Komplexes, wenngleich gelegentlich auch empfängliche Nebenwirte infizierbar sind [Godfroid *et al.* 2014, Mayer-Scholl *et al.* 2014, Rodriguez-Campos *et al.* 2014]. Weitere neue Spezies-Wirtsbeziehungen sind zu erwarten. Allerdings wird man auch zukünftig vermutlich neue Erreger-Wirtsbeziehungen für existierende Spezies finden. In einer Routineuntersuchung eines Fettschwanzmakis (*Cheirogaleus medius*) gelang dies für *Se. termitidis* (s. 6.4; [Eisenberg *et al.* 2015b]). Eine wegen einer Zahnwurzelvereiterung entnommene Tupferprobe ergab einen starken Keimgehalt dieses Bakteriums, welches bis dato nur aus seinem natürlichen Habitat, dem Darmtrakt der Mittelmeertermiten *Reticulitermes lucifugus* isoliert werden konnte. Dort scheint *Se. termitidis* eine Art symbiotische Beziehung mit seinem Wirt einzugehen, denn durch Harnsäure-Abbauprodukte liefert das Bakterium der Termiten möglicherweise Vorstufen für deren Stickstoff- Stoffwechsel [Potrikus & Breznak 1980a, b]. Dass auch dieser Erreger ein pathogenes Potential in Form eines obligat aneroben Destruenten bei einer frugi- und insektivoren Halbaffenspezies besitzt, könnte darauf hindeuten, dass auch *Se. termitidis* eine breitere ökologische Nische einnimmt als bislang angenommen. Darauf könnten auch Sequenz-Nachweise in Umweltproben hindeuten, denn die nächst verwandten 16S rRNS-Gensequenzen stammen aus Darmtrakten von Käfern (*Poecilus chalcites* [Lehman *et al.* 2009], *Rhynchophorus ferrugineus* [Jia *et al.* 2013]), Eiern so genannter Zuckmücken [Senderovich & Halpern 2012] und aus Faulschlamm in Frankreich und Brasilien [Riviere *et al.* 2009, Cardinali-Rezende *et al.* 2013]. Zwar ließen sich im Falle des Makis bei den in dieser Zoonhaltung verfütterten Insekten keine weiteren Nachweise erbringen. Da der Maki jedoch keinen Zugang zu Termiten hatte, deutet dies indirekt auf einen

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

alternativen Ursprung des Erregers außerhalb seines bekannten Wirtssystems hin, und selbst eine zoonotische Relevanz kann im Hinblick auf das Vorkommen bei einem nicht humanen Primaten nicht ausgeschlossen werden. Das Isolat aus dieser Studie stellt nunmehr vermutlich den zweiten überhaupt konservierten Stamm (DSM 100379) dar, welcher neben dem Typstamm in einer Stammsammlung hinterlegt wurde. Von Letzterem unterschied sich das klinische Isolat nur marginal, welches anhand seines charakteristischen ribosomalen Proteinmusters eindeutig mittels Flugzeit-Massenspektrometrie diagnostiziert werden konnte, nachdem Referenzspektren von *Se. termitidis* in der Datenbank hinterlegt worden waren. Der Nachweis konnte nachfolgend mittels FT-IR und Sequenzierung des 16S rRNS-Gens (99,9% Sequenzhomologie) bestätigt werden (s. 6.4).

5.6 Nachbemerken und Ausblicke

Die in dieser Arbeit beleuchteten Beziehungen innerhalb der Familie *Leptotrichiaceae* haben zur Beschreibung von fünf neuen Taxa geführt, von welchen zwei in neuen Gattungen eingeordnet wurden. Unter den neu beschriebenen Spezies finden sich auch Erreger, welche sehr nah mit dem lange für monotypisch gehaltenen RBF-Erreger *S. moniliformis* verwandt und nicht einfach von diesem zu unterscheiden sind. Für zukünftige Untersuchungen und Nachweise empfiehlt es sich daher, den zugrundeliegenden Erreger zweifelsfrei bis auf Speziesebene zu bestimmen. Nur so lässt sich das mögliche, jedoch bislang unbekannte, zoonotische Potential durch die neuen Spezies besser einschätzen. Ein im Rahmen der dargestellten Ergebnisse etabliertes MLVA-Schema kann bei zukünftigen Nachweisen hilfreich sein, denn es vereint die Fähigkeiten eines nicht-invasiven, speziesspezifischen mit einem Kultur-unabhängigen Typisierungswerkzeug, mit welchem sich Transmissionsketten exakter aufklären lassen können. Dies konnte in der Beleuchtung der beteiligten Wirtsspezies bei einem schwerwiegenden Fall von humanem RBF unlängst unter Beweis gestellt werden. Hinsichtlich der etablierten Diagnostika erwies sich die Flugzeit-Massenspektrometrie aufgrund ihrer diagnostischen Diskriminierungsfähigkeit, Anwenderfreundlichkeit und Verfügbarkeit als aussichtsreichster Kandidat auf einen neuen Goldstandard. Zwar bedarf diese Technik in der Regel auch weiterhin der vorherigen Anzucht des Erregers, jedoch ließen sich sämtliche mit dieser Technik untersuchten Stämme zweifelsfrei bis auf Speziesebene differenzieren. Die übrigen phänotypischen Methoden sind dagegen

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

sämtlich nicht zur Speziesdifferenzierung geeignet, sondern können lediglich Hinweise für die Bestimmung auf Gattungsebene bieten.

Im Hinblick auf die Genomuntersuchungen stellen die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse ein Unikum dar, denn es wurden nie zuvor mehr repräsentative Stämme dieser schwierig zu kultivierenden Mikroorganismen aus diesem Komplex untersucht. Die Ergebnisse haben wichtige Kenngrößen definiert, anhand derer die Unterscheidung von *S. moniliformis*-Stämmen möglich erscheint und phylogenetische Unterschiede zwischen ihnen offengelegt. Durch die in Kapitel 5.4.1.1 dargestellten Einblicke zu putativen Virulenz-, Krankheits- bzw. Abwehr-assoziierten Genen sind erste Identifikationen der zugrundeliegenden Mechanismen im Hinblick auf die molekulare Pathogenese der *S. moniliformis*-Infektion gelungen. In weiteren Studien sollen vertiefende Analysen zu weiteren Virulenz-assoziierten Genen sowie den mit ihnen assoziierten Phänotypen fortgeführt werden, um profundere Einblicke in das Wechselspiel zwischen Wirt und Erreger zu erzielen.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.1 *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia.

Eisenberg, T.*, A. Nessler, W. Nicklas, V. Spamer, H. Seeger & M. Zschöck

Journal of Medical Microbiology Case Reports, 2014: 1-7.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | weitestgehend eigenständig |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is the original version of an article published in Journal of Medical Microbiology Case Reports.
This version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.000562>

Case Report

Streptobacillus sp. isolated from a cat with pneumoniaTobias Eisenberg,¹ Anne Nessler,¹ Werner Nicklas,² Viola Spamer,¹ Helga Seeger¹ and Michael Zschöck¹

Correspondence

T. Eisenberg
tobias.eisenberg@lhl.hessen.de¹Hessian State Laboratory, Schubertstrasse 60/Haus 13, 35392 Gießen, Germany²German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany

Introduction: *Streptobacillus moniliformis* causes rat-bite fever, an underdiagnosed zoonosis occurring worldwide. A variety of animals including livestock and exotic mammals are known to be susceptible hosts for this species, but little information is available regarding infection in companion animals.

Case presentation: Following the necropsy of a domestic cat, bacteria displaying substantial characteristics of *Streptobacillus* sp. were cultured from pneumonic lung tissue. *Streptobacillus*-like morphological features observed included strictly microaerophilic pleomorphic Gram-negative rods with bulbar swellings that grew exclusively in the presence of serum. Significant shared biochemical properties included negative reactions for cytochrome oxidase, catalase, urease, nitrate reduction and indole production, as well as broad antimicrobial susceptibility. These characteristics are all indicative of *Streptobacillus moniliformis*. However, 16S rRNA gene sequencing revealed only 98 % sequence homology to type strain DSM 12112. A mass spectrometry analysis confirmed the affiliation of the domestic cat isolate described in this study with bacteria of the genus *Streptobacillus*, but matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry indicated that it differed from nine reference strains of *Streptobacillus moniliformis* isolated from various sources and host species.

Conclusion: This is the first evidence for clinical disease caused by a streptobacillary infection in a domestic cat.

Keywords: cat; feline; pneumonia; rat-bite fever; *Streptobacillus*.

Received 7 November 2013

Accepted 13 April 2014

Introduction

The genus *Streptobacillus* (Leptotrichiaceae, Fusobacteriales) comprises the monotypic *Streptobacillus moniliformis* (Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009), one of two aetiological organisms causing the bacterial zoonosis rat-bite fever (RBF). RBF is predominantly transmitted through rodent bites and scratches or through direct or indirect contact with rodent faeces and urine (Bleich & Nicklas, 2008; Hayashimoto *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2003). The zoonosis generally referred to as RBF involves two similar yet distinct syndromes caused by two different pathogens: *Spirillum minus* and *Streptobacillus moniliformis*. *Spirillum minus* infection [due to lack of type or reference strains, it

is not listed in the Approved List of Bacterial Names at <http://www.bacterio.net/>; (Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009)], also known as sodoku, is more prevalent in Asia than in Western Europe and is not covered in this study. However, *Streptobacillus moniliformis* is a primary pathogen in humans and may cause RBF or food-borne Haverhill fever. The acute disease symptoms in humans include fever, malaise, muscle pain, articular inflammation, septicaemia, and maculopapular, petechial or pustular rash after exposure to the bacteria through a bite or scratch by rats or through the ingestion of water or food contaminated by rat excrement (Gaastra *et al.*, 2009). Other rodent species like gerbils, squirrels, spinifex hopping mice and guinea pigs are also susceptible to *Streptobacillus moniliformis* infection, and mice may strain-dependently develop clinical disease. Rats are usually asymptomatic (Wullenweber *et al.*, 1990), but abscess formation caused by *Streptobacillus moniliformis* infection has been described (Rohde *et al.*, 2008). Approximately 50–100 % of wild rats carry *Streptobacillus moniliformis* in their oro- or nasopharynx and shed the pathogen with saliva and urine (Ditchfield *et al.*, 1961; Elliott, 2007;

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the partial 16S rRNA gene of isolate 131000547 is HG421076.

This article is dedicated to Professor Dr. Dieter Manz in honour of his 80th birthday. The Hessian Ministry for the Environment, Climate Change, Agriculture and Consumer Protection (HMUKLV).

Abbreviations: MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; RBF, rat-bite fever

Washburn, 1995). Nevertheless, isolation of *Streptobacillus moniliformis* from rat urine and faeces is not always successful (Freundt, 1956; Wullenweber *et al.*, 1990). *Streptobacillus* infection has also been reported on a few occasions from livestock (calves, a pig and domestic turkey), as well as from zoo animals (non-human primates and a koala) (Boyer *et al.*, 1958; Gaastra *et al.*, 2009; Glünder *et al.*, 1982; Gourlay *et al.*, 1982; Mohamed *et al.*, 1969; Russell & Straube, 1979; Smallwood, 1929; Valverde *et al.*, 2002; Yamamoto & Clark, 1966). Most reports on isolates derived from livestock lack genetic data and are focused mainly on pathogen morphology or zoonotic symptoms alone. Pathological findings in infected ruminants include pneumonia in calves and isolations from seminal vesicles of bulls, whilst domestic turkeys also display polyarthritis, synovitis, tendon sheath swellings and joint lesions. Notably, a bite by an asymptomatic pig led to RBF-like disease in a woman (the epidemiological data is summarized by Gaastra *et al.*, 2009). Carnivorous animals regularly feeding on rats and mice, such as dogs, weasels and ferrets, are known reservoirs of *Streptobacillus moniliformis* and are therefore possible vectors for human infection (Gaastra *et al.*, 2009; Gordon & Jones, 1999; Peel, 1993; Wouters *et al.*, 2008). The role of cats as carriers and transmitters of *Streptobacillus moniliformis* to humans remains speculative, despite their frequent exposure to rats. The only known case study lacks culture-based or serological confirmation (Gascard *et al.*, 1967). Detection of *Streptobacillus moniliformis* often seems to be attributed to colonization rather than infection, thus stressing the role of resident or latent oral flora in wild or pet rodents or in dogs and cats. Recently, a closely related *Streptobacillus* sequence, COT-370, was detected in a canine oral microbiome project (Dewhirst *et al.*, 2012). Currently, only two reports of clinical infection by *Streptobacillus moniliformis* in dogs exist (Das, 1986; Ditchfield *et al.*, 1961). One dog was reported as displaying acute gastroenteritis, arthritis, skin rash, pneumonia and endocarditis, symptoms similar to those of Haverhill fever (Ditchfield *et al.*, 1961). The other case described *Streptobacillus moniliformis* from an abscess aspirate (Das, 1986).

We report here for the first time, to our knowledge, an infection in a cat displaying clinical symptoms of fatal pneumonia which could be attributed to a streptobacillary infection.

Case report

In January 2013, a cat that had been found dead on a dairy farm was submitted for necropsy. Post-mortem examination revealed an acute bronchopneumonia with pronounced acute oedema and congestion of the lungs and a marbled and beige-coloured myocardium with multifocal haemorrhages on the endo- and epicardium. Liver, spleen and kidneys showed acute congestion. No abnormalities such as wounds, scratches, ulcers or rashes were noted on the skin, which are common sequelae of RBF in humans. Histopathological examination of the lungs revealed an acute suppurative to fibrinous, focally

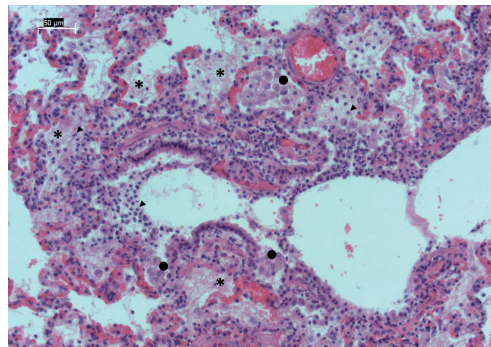


Fig. 1. Lung showing acute suppurative and fibrinous pneumonia with pronounced acute congestion and multifocal desquamation of type II pneumocytes and alveolar macrophages in alveolar lumina. Fibrin exudate (*), neutrophils (arrowhead) and type II pneumocyte desquamation (●) are indicated. Haematoxylin and eosin stain; magnification 20 ×.

necrotizing pneumonia with multifocal desquamation of type II pneumocytes and alveolar macrophages (Fig. 1). In the heart, an acutely suppurative and fibrinous endocarditis and myocarditis with acute congestion, oedema and single necrotizing foci were noticed (Fig. 2).

Diagnosis

Upon necropsy, viral and molecular examinations were carried out for the presence of feline calicivirus (cell culture), feline herpesvirus 1, *Mycoplasma* spp. and

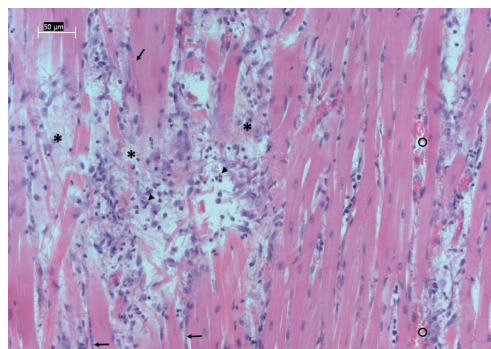


Fig. 2. Heart (left ventricular wall) showing acute suppurative and fibrinous myocarditis with acute interstitial congestion (←), oedema and haemorrhage (○). Fibrin exudate (*) and neutrophils (arrowhead) are indicated. Haematoxylin and eosin stain; magnification 20 ×.

Chlamydia spp. using PCR, all with negative results. A low-grade mixed concomitant flora that included *Streptococcus canis*, *Pseudomonas* sp. and α -haemolytic streptococci was isolated from liver, spleen, lung, heart, kidney and intestines. No growth of mycoplasmas could be observed in samples from lung tissue, but cultures for haemophilic bacteria showed high growth of strictly microaerophilic organisms on Columbia blood agar with 5 % sheep blood (CSBA; Oxoid) after 3 days of incubation at 37 °C in the presence of 10 % CO₂. Colonies were tiny, drop like, shiny and slightly convex, measuring 0.1–0.4 mm in diameter. Colonies appeared slightly α -haemolytic on CSBA (after 3 days of incubation) but developed a faint β -haemolysis after 5 days. Some colonies showed the typical ‘fried-egg’ appearance seen in L-forms. Microscopic morphological features were indicative of Gram-negative, pleomorphic, fusiform to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods that were arranged in chains and clumps, also sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Conventional biochemical testing of isolate 131000547 from this study (all substrates Becton Dickinson) revealed broad accordance with the known

pattern (Edwards & Finch, 1986; Wullenweber, 1995) (Table 1). Key reactions were negative for cytochrome oxidase, catalase, urease, nitrate reduction and indole production. In liquid medium (e.g. trypticase soy broth), with the addition of 20 % cattle serum (Oxoid), streptobacillary growth could be detected after 2–4 days as typical ‘puff-ball’ or ‘bread crumb-like’ appearance (Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009).

Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion on CSBA and respective discs (Oxoid) following DIN 58940 (German standard) criteria after 72 h of incubation at 37 °C in a microaerophilic atmosphere. Isolate 131000547 turned out to be inhibited *in vitro* by penicillin, ampicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanate, cephalotin, cephalixin, cefazoline, erythromycin, lincomycin, streptomycin, gentamicin, neomycin, tetracycline, enrofloxacin, florfenicol and chloramphenicol. Intermediate resistance to ciprofloxacin and resistance to polymyxin B and sulfamethoxazole-trimethoprim was also revealed.

For PCR analysis, thermolysates of freshly subcultured isolate 131000547 as well as strain NCTC 11941 (positive

Table 1. Biochemical and phenotypical characteristics of *Streptobacillus moniliformis* as determined from the literature (Edwards and Finch, 1986; Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2008; Wullenweber, 1995), as well as of field isolate 131000547 from this study +, positive; –, negative; D, variable; [+/-], weak reaction.

Test	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	<i>Streptobacillus</i> sp. isolate 131000547
Oxidase	–	–
Katalase	–	–
Indol	–	–
Nitrate	–	–
Arabinose	–	–
Cellobiose	+	–
Dulcitol	–	–
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Inosit	–	–
Lactose	–	–
Maltose	+	+
Mannitol	–	–
Mannose	+	+
Melibiose	–	–
Raffinose	–	–
Sucrose	–	–
Salicin	[+]	–
Sorbit	–	–
Trehalose	–	–
Xylose	–	–
Urease	–	–
Alkaline phosphatase	+	+
Esculin	[–]	–
Haemolysis of sheep erythrocytes	D	+
Motility	–	–
Arginine-dihydrolase	+	–
Ornithine-decarboxylase	–	–
Lysine-decarboxylase	–	–

control) were centrifuged (12 000 g, 10 min) and 1 µl of the supernatants was used for subsequent PCR with S5 (5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3') and AS2 (5'-GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3') primers (Kimura *et al.*, 2008). Species-specific PCR resulted in a distinct 269 bp band for isolate 131000547 (Fig. 3).

Amplification of the 16S rRNA gene yielded a sequence length of 1425 bp using primers rRNA A (5'-AGAGTT-TGATCATGGCTCAG-3') and rRNA H [5'-AAGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3' (Edwards *et al.*, 1989)]. Briefly, DNA was extracted from a bacterial pure culture (Maxwell 16 FFPE Plus LEV Purification kit; Promega). The PCR product was purified with a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany). Sequence analysis carried out by BLAST N revealed 98 % sequence similarity to *Streptobacillus* sp. canine oral taxon 370 clone 2B078 partial 16S rRNA gene (GenBank accession no. JN713542.1; Dewhirst *et al.*, 2012) and *Streptobacillus moniliformis* strains KWG2 and KWG24 partial 16S rRNA gene (GenBank accession nos AB330759 and AB330760, respectively; Kimura *et al.*, 2008) from wild rats. Sequence overlap with the type strain of *Streptobacillus moniliformis* was 97 %.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was performed on a MALDI-TOF MS Biotyper v.3.3.1.0 with the respective database (DB 4613; BrukerDaltonics), which comprised 24 spectra from *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112^T).

The comparison of MALDI-TOF MS spectra obtained by the direct smear and the extraction method for sample

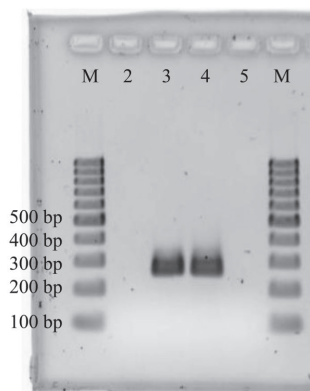


Fig. 3. Species-specific PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis* according to Kimura *et al.* (2008) using primers S5 and AS2. M, 1000 bp marker; lane 2, no-template control; lane 3, isolate 131000547 from this study; lane 4, *Streptobacillus moniliformis* strain NCTC 11941; lane 5, *Seibaldella termitidis* (negative control)

preparation revealed differences between the cat's isolate compared with nine reference strains of *Streptobacillus moniliformis* from various sources and host species (Fig. 4). Nevertheless, mass spectrometry could confirm the affiliation of isolate 131000547 to the genus *Streptobacillus*.

Discussion

Only two case reports involving dogs focus on susceptibility and clinical relevance of *Streptobacillus moniliformis* in companion animals. One of these dogs displayed Haverhill fever-like symptoms including acute gastroenteritis, arthritis, skin rash, pneumonia and endocarditis after feeding on presumably contaminated items from rubbish (Ditchfield *et al.*, 1961). The other case report involved a scapula abscess aspirate (Das, 1986) for which growth characteristics and antibiotic susceptibility testing were not fully in accordance with those of *Streptobacillus moniliformis*. We present here the first evidence for a streptobacillary infection in a domestic cat that succumbed to fatal pneumonia and endocarditis. In light of the extremely high prevalence of *Streptobacillus moniliformis* in rats (close to 100 %; Gaastra *et al.*, 2009) and the regular exposure of domestic cats to wild rodents, it is striking that no other incidences of streptobacillary infections in domestic felines exist. In humans, the risk of acquiring a streptobacillary infection after a rat bite or scratch is indicated as 10 % (Hagelskjaer *et al.*, 1998), whereas the subsequent mortality rate of an untreated bite can be as high as 13 % (Wullenweber, 1995). It is possible that, much like in humans, infections are underdiagnosed in pets due to the oversight of rodent bites, occurrence of non-specific clinical symptoms, fastidious growth, non-notifiable disease and broad chemotherapeutic susceptibility.

A hypothesis presented recently is that dogs may be naturally colonized by other, as-yet-undescribed species of *Streptobacillus* (Dewhirst *et al.*, 2012). The cat described in this study originated from a farm with an abundance of rats and, similarly, could have simply aspirated an uncommon strain of *Streptobacillus moniliformis* through the oral cavity. Comparable case reports exclusively link streptobacillosis to respiratory infection in both a guinea pig and a koala (Kirchner *et al.*, 1992; Russell & Straube, 1979). Although no direct morphological features consistent with pulmonary streptobacillosis were detected during histopathological examination, no infectious agents for pneumonia other than *Streptobacillus moniliformis* could be cultivated or detected by culture, necropsy or histopathology. This suggests a major role for this pathogen as the causative agent. Unfortunately, as only lung tissue was cultivated microaerophilically, we cannot completely rule out a septicemic cause of streptobacillary infection. Although no routine tests for feline leucosis virus and feline immunodeficiency virus were carried out in this case, no characteristic signs of viral infection such as emaciation or tumoral growth were detected.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

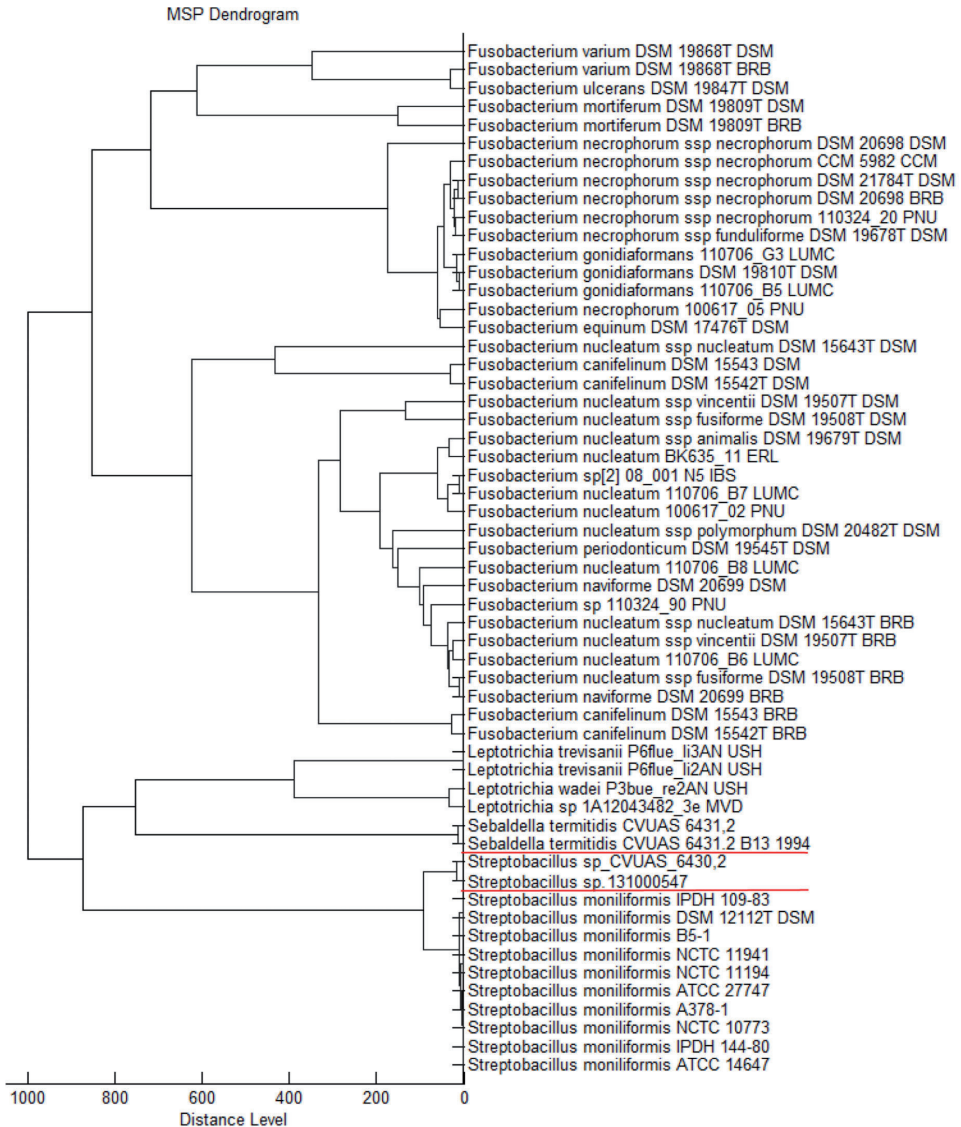


Fig. 4. Dendrogram including all main spectra peak lists of the phylum Fusobacteria available in the Bruker Taxonomy Database. '*Streptobacillus* sp_CVUAS_6430,2' (= *Streptobacillus* sp. 131000547 from a cat from this study) and '*Sealdella termitidis* CVUAS 6431,2' are database entries. Spectra of *Streptobacillus* sp. 131000547 and *Streptobacillus moniliformis* were measured using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard Method (v.1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v.3.1, build 66); ATCC, American Type Culture Collection; NCTC, National Collection of Type Cultures; DSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen; IPDH, Institut für Geflügelkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover; CVUAS, CVUA Stuttgart.

Biochemical properties of the isolate examined in this study were consistent with assigned field and reference strains of *Streptobacillus moniliformis* (Table 1), but phenotypic variations within this species are known to occur (Edwards and Finch, 1986; Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2008; Wullenweber, 1995). Some previous studies have also noticed the occurrence of haemolysis in *Streptobacillus moniliformis* (Ditchfield *et al.*, 1961; Wullenweber *et al.*, 1992). With respect to previous antimicrobial studies, our isolate did not significantly differ from *Streptobacillus moniliformis*. It showed resistance only to polymyxin B and sulfamethoxazole-trimethoprim, and intermediate resistance to ciprofloxacin, suggesting a good starting point for chemotherapeutic treatment. Besides a broad susceptibility of *Streptobacillus moniliformis*, specific strains of this pathogen have been reported to show resistance to nalidixic acid, polymyxin B, cephalosporins, aminoglycosides, sulfamethoxazole-trimethoprim, cotrimoxazole, tobramycin, norfloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin (Cunningham *et al.*, 1998; Frans *et al.*, 2001; Freunek *et al.*, 1997; Rygg & Bruun, 1992; Wullenweber, 1995) or intermediate sensitivity to fluoroquinolones (Rygg & Bruun, 1992; Wullenweber, 1995). In addition to classic diagnostic tools such as biochemistry, morphology and molecular analysis, this is the first instance where MALDI-TOF MS was employed to identify *Streptobacillus moniliformis*. Whereas all field and reference strains could clearly be assigned with high accuracy, isolate 131000547 clustered closely but could not correctly be identified at the species level (Fig. 4). This can be explained by the presence of only a single strain represented by 24 spectra in the manufacturer's database, therefore not providing detailed coverage of the full spectral variance of this pathogen (M. Timke, personal communication). However, the possibility exists that the pathogen represents an undescribed species of *Streptobacillus*, as we found additional circumstantial evidence regarding phenotype (e.g. fermentation of cellobiose and arginine) and genotype (16S rRNA gene). Additional studies to clarify this situation are currently underway.

RBF represents a significant public health threat that might be underdiagnosed in species other than the known host animals, in particular in domestic pets. Despite frequent prey-mediated close contact to *Streptobacillus moniliformis*, cats appear not to be particularly prone to infection. We have shown for the first time here that domestic cats are nevertheless susceptible to streptobacillary infection and clinical disease. Future research should elucidate the role of domestic cats as a reservoir for *Streptobacillus moniliformis* and their immune response towards this pathogen.

Acknowledgements

We thank Anna Mohr for the excellent technical assistance and Barbara Gamb for the unsurpassed literature service. Norman Mauder (CVUA Stuttgart), Markus Timke (Bruker) and Twan Leenders (Jamestown, USA) are acknowledged for creating the cluster

analysis, discussing MALDI-TOF MS data and improving an earlier version of the manuscript, respectively. The authors declare no conflicts of interest.

References

- Bleich, A. & Nicklas, W. (2008). [Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as laboratory or pet animals]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 121, 241–255 (in German).
- Boyer, C. I. J., Bruner, D. W. & Brown, J. A. (1958). A *Streptobacillus*, the cause of tendon-sheath infection in turkeys. *Avian Dis* 2, 418–427.
- Cunningham, B. B., Paller, A. S. & Katz, B. Z. (1998). Rat bite fever in a pet lover. *J Am Acad Dermatol* 38, 330–332.
- Das, A. M. (1986). *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. *Ind J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 7, 115.
- Dewhirst, F. E., Klein, E. A., Thompson, E. C., Blanton, J. M., Chen, T., Milella, L., Buckley, C. M., Davis, I. J., Bennett, M. L. & other authors (2012). The canine oral microbiome. *PLoS One* 7, e36067.
- Ditchfield, J., Lord, L. H. & McKay, K. A. (1961). *Streptobacillus moniliformis* infection in a dog. *Can Vet J* 2, 457–459.
- Edwards, R. & Finch, R. G. (1986). Characterisation and antibiotic susceptibilities of *Streptobacillus moniliformis*. *J Med Microbiol* 21, 39–42.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17, 7843–7853.
- Elliott, S. P. (2007). Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* 20, 13–22.
- Frans, J., Verhaegen, J. & Van Noyen, R. (2001). *Streptobacillus moniliformis*: case report and review of the literature. *Acta Clin Belg* 56, 187–190.
- Freundt, E. A. (1956). *Streptobacillus moniliformis* infection in mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 38, 231–245.
- Freunek, K., Turnwald-Maschler, A. & Pannenbecker, J. (1997). [Caused rat bite fever by *Streptobacillus moniliformis* infection]. *Monatsschr Kinderheilkd* 145, 473–476 (in German).
- Gaastra, W., Boot, R., Ho, H. T. & Lipman, L. J. (2009). Rat bite fever. *Vet Microbiol* 133, 211–228.
- Gascard, E., Vignoli, R., Moulard, J. C. & Salvadori, J. M. (1967). [Case of febrile eruption after a cat bite: *Streptobacillus moniliformis* septicemia?] *Mars Med* 104, 861–864 (in French).
- Glünder, G., Hinz, K. H. & Stiburek, B. (1982). [Joint disease in turkeys caused by *Streptobacillus moniliformis* in Germany]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 89, 367–370 (in German).
- Gordon, I. J. & Jones, E. S. (1999). I smell a rat. *Hosp Med* 60, 682–683.
- Gourlay, R. N., Flanagan, B. F. & Wyld, S. G. (1982). *Streptobacillus actinoides* (Bacillus actinoides): isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in gnotobiotic calves. *Res Vet Sci* 32, 27–34.
- Hagelskjaer, L., Sorensen, I. & Randers, E. (1998). *Streptobacillus moniliformis* infection: 2 cases and a literature review. *Scand J Infect Dis* 30, 309–311.
- Hayashimoto, N., Yoshida, H., Goto, K. & Takakura, A. (2008). Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. *J Vet Med Sci* 70, 493–495.
- Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. & Yamada, A. (2008). Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 52, 9–15.

- Kirchner, B. K., Lake, S. G. & Wightman, S. R. (1992). Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a guinea pig with granulomatous pneumonia. *Lab Anim Sci* **42**, 519–521.
- Mohamed, Y. S., Moorhead, P. D. & Bohl, E. H. (1969). Natural *Streptobacillus moniliformis* infection of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. *Avian Dis* **13**, 379–385.
- Peel, M. M. (1993). Dog-associated bacterial infections in humans: isolates submitted to an Australian reference laboratory, 1981-1992. *Pathol* **25**, 379–384.
- Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008). Case report: Abscess by *Streptobacillus moniliformis* in a rat (English translation). *Prakt Tierarzt* **89**, 466–473 (in German).
- Russell, E. G. & Straube, E. F. (1979). Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos cinereus*). *J Wildl Dis* **15**, 391–394.
- Rygg, M. & Bruun, C. F. (1992). Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a child. *Scand J Infect Dis* **24**, 535–540.
- Smallwood, R. P. (1929). Rat bite fever from the bite of a pig. *Brit Med J* **29**, 1159.
- Torres, L., Lopez, A. I., Escobar, S., Marne, C., Marco, M. L., Perez, M. & Verhaegen, J. (2003). Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 258–260.
- Valverde, C. R., Lowenstine, L. J., Young, C. E., Tarara, R. P. & Roberts, J. A. (2002). Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol* **31**, 345–349.
- Washburn, R. G. (1995). *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever). In *Principles and practice of infectious diseases*, Vol. 2, pp. 2084–2086. Edited by G. L. Mandell, J. E. Bennett & R. G. Dolin, New York: Churchill Livingstone.
- Wouters, E. G., Ho, H. T., Lipman, L. J. & Gaastra, W. (2008). Dogs as vectors of *Streptobacillus moniliformis* infection? *Vet Microbiol* **128**, 419–422.
- Wullenweber, M. (1995). *Streptobacillus moniliformis* – a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. *Lab Animal* **29**, 1–15.
- Wullenweber, M., Kaspereit-Rittinghausen, J. & Farouq, M. (1990). *Streptobacillus moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of different strains of mice. *Lab Anim Sci* **40**, 608–612.
- Wullenweber, M., Jonas, C. & Kunstyr, I. (1992). *Streptobacillus moniliformis* isolated from otitis media of conventionally kept laboratory rats. *J Exp Anim Sci* **35**, 49–57.
- Yamamoto, R. & Clark, G. T. (1966). *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet Rec* **79**, 95–100.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.2 *Streptobacillus felis* sp. nov., isolated from a cat with pneumonia, and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and of *Streptobacillus moniliformis*.

Eisenberg, T.*, S. Glaeser, W. Nicklas, N. Mauder, M. Contzen, K. Aledelbi & P. Kämpfer

Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65(7): 2172-2178.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.000238>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript Including References (Word document)

1 *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

2

3 Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias

4 Contzen⁴, Khayrieh Aledelbi⁵ and Peter Kämpfer²

5

6 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany

7 ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392

8 Giessen, Germany

9 ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany

10 ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany

11 ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

12

13 **Corresponding author:**

14 Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ H13; D-

15 35392 Giessen, Germany, Phone: +49 641 4800 5219; Fax: +49 641 4800 5268. Dr. Tobias

16 Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

17

18 **Running title:** Description of *Streptobacillus felis* sp. nov.

19 **Content category:** New Taxa

20 **Subsection:** Other Bacteria/ Fusobacteria

21 **Keywords:** *Streptobacillus, felis*, Fusobacteriales, novel, pneumonia, cat

22

23 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL*, and *recA*

24 gene sequences of strain 131000547^T are HG421076, KP676101, KP657496, and KP657504,

25 respectively. Other gene sequences generated within this study are summarized in Table S2.

26

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

27 SUMMARY

28 A pleomorphic, Gram-negative, rod-shaped, indole-, oxidase- and catalase-
29 negative, non-spore-forming, non-motile bacterium (131000547^T) was isolated from the
30 lungs of a cat with pneumonia. On the basis of 16S rRNA gene sequence analyses the
31 strain was assigned to the genus *Streptobacillus* with 97.6% sequence similarity to
32 *Streptobacillus moniliformis* and 94.6% sequence similarity to *Streptobacillus*
33 *hongkongensis*, respectively. The clear differentiation of strain 131000547^T from
34 *Streptobacillus moniliformis* and *S. hongkongensis* was also supported by *gyrB*, *groEL*,
35 and *recA* nucleotide and amino acid sequence analysis, respectively. DNA-DNA
36 hybridization demonstrated $\leq 19.9\%$ (reciprocal 28.7%) DNA-DNA relatedness between
37 strain 131000547^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T.

38 Physiological data confirmed the allocation of strain 131000547^T to the family
39 *Leptotrichiaceae*. Strain 131000547^T has a unique profile of enzyme activities allowing a
40 differentiation from the most closely related species. Within the genus *Streptobacillus*,
41 isolate 131000547^T could also unambiguously be separated from *Streptobacillus*
42 *moniliformis* and *Streptobacillus hongkongensis* by both, MALDI-TOF MS and Fourier
43 transform-infrared spectroscopy. On the basis of these data we propose the novel species
44 *Streptobacillus felis* sp. nov. with the type strain 131000547^T (= DSM 29248^T = CCUG
45 66203^T = CCM 8542^T). Emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and the
46 species *Streptobacillus moniliformis* are also given.

47

48

49

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

50 The genus *Streptobacillus* (Levaditi *et al.*, 1925) (*Streptobacillus*; *Leptotrichiaceae*,
51 *Fusobacteriales*) had comprised for almost 90 years a monotypic species, *Streptobacillus*
52 *moniliformis* (Elliott, 2007, Gaastra *et al.*, 2009), one of the two etiological organisms of rat
53 bite fever (RBF); an under-reported, worldwide occurring bacterial zoonosis (Gaastra, *et al.*,
54 2009). The infection is predominantly transmitted through rat bites and scratches. A second
55 food-borne form of *Streptobacillus moniliformis* infection named Haverhill fever is
56 transmitted by direct or indirect contact with rat urine (Bleich & Nicklas, 2008, Hayashimoto
57 *et al.*, 2008, Torres *et al.*, 2003). Acute symptoms of RBF include fever, malaise, muscle
58 pain, arthritis and abscess formation, endocarditis, bacteraemia, and maculopapular, petechial
59 or pustular rash as well as vomiting and pharyngitis (Gaastra, *et al.*, 2009). Approximately
60 50-100% of wild rats usually asymptotically carry *Streptobacillus moniliformis* in their
61 oro- or nasopharynx and shed the organism with saliva and urine (Ditchfield *et al.*, 1961,
62 Elliott, 2007, Washburn, 1995), but abscess formation has been also described in rats and
63 mice (Rohde *et al.*, 2008, Wullenweber *et al.*, 1990). Other rodent species like gerbils,
64 squirrels, spinifex hopping mice or guinea pigs as well as companion and exotic animals and
65 livestock are principally susceptible to infection besides rats and mice, but mice may strain-
66 dependently develop clinical disease (Boyer *et al.*, 1958, Das, 1986, Ditchfield, *et al.*, 1961,
67 Gaastra, *et al.*, 2009, Glünder *et al.*, 1982, Gourlay *et al.*, 1982, Mohamed *et al.*, 1969,
68 Russell & Straube, 1979, Smallwood, 1929, Valverde *et al.*, 2002, Wullenweber, *et al.*, 1990,
69 Yamamoto & Clark, 1966).

70 In the last few years *Streptobacillus*-like organisms have been noticed beside *Streptobacillus*
71 *moniliformis*, from which *Streptobacillus hongkongensis* (Woo *et al.*, 2014) was recently
72 described as a new species causing quinsy and septic arthritis in humans. Furthermore, two
73 *Streptobacillus* spp. were reported, one of which was found in a canine oral microbiome
74 project (sequence COT-370) (Dewhirst *et al.*, 2012). The other is a *Streptobacillus* sp.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

75 isolated from a cat with pneumonia (Eisenberg *et al.*, 2014) and this strain is object of the
76 present description.

77

78 Strain 131000547^T was originally isolated from a cat lung after 2-5 days incubation at
79 37°C under a capnophilic atmosphere of 10% CO₂ on Columbia agar with 5% sheep blood
80 (SBA; Oxoid, Wesel, Germany). On this agar, strain 131000547^T was able to grow also at
81 20-43°C, but not at 10 or 50°C. The strain could also be cultivated on TSA (Tryptone-soy-
82 agar, Oxoid), supplemented with 20% horse serum, Schaedler agar as well as in liquid media
83 (Tryptone-soy-bouillon [TSB], brain-heart infusion and peptone broth, supplemented with
84 20% cattle or horse serum) but not on Gassner and MacConkey agar (all Oxoid). Good
85 growth could be observed after 48 h. Gram-staining was done according to the Hucker
86 method as described previously (Gerhardt *et al.*, 1994). Cell morphological features were
87 observed under a Leitz light microscope at ×1000, with cells grown for 3 days at 37°C on
88 SBA. Gram staining revealed irregular Gram-negative pleomorphic, fusiform to filamentous,
89 non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods which were arranged in chains and
90 clumps, sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Single laying rod-shaped
91 cells were approximately 0.45 +/- 0.1 µm wide and 0.83 +/- 0.8 µm long.

92

93 For phylogenetic analysis genomic DNA was extracted using the Maxwell 16 FFPE Plus LEV
94 Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The
95 16S rRNA gene was PCR-amplified as described elsewhere (Edwards *et al.*, 1989). The PCR
96 product was purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)
97 according to the manufacturer's instructions and sequenced by GATC Biotech (Konstanz,
98 Germany). Phylogenetic analysis was performed in ARB release 5.2 (Ludwig *et al.*, 2004)
99 using the 16S rRNA-based "All-Species Living Tree" Project (LTP) database (Yarza *et al.*,
100 2008) release 108 (July 2012). All sequences not included in the LTP database were aligned

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

101 with the SINA online alignment tool version 1.2.11 (Pruesse *et al.*, 2012) and implemented in
102 the LTP database. The alignment of sequences used for tree construction was controlled
103 manually based on secondary structure information. Pairwise sequence similarities were
104 calculated in ARB using the ARB Neighbor-joining tool without the use of an evolutionary
105 substitution model. Phylogenetic trees were constructed with the maximum-likelihood method
106 using RAxML version 7.04 (Stamatakis, 2006) with GTR-GAMMA and rapid bootstrap
107 analysis and the maximum-parsimony method using DNAPARS v 3.6 (Felsenstein, 2005).
108 Both trees based on 100 replications (bootstrap analysis; Felsenstein 1985) and 16S rRNA
109 gene sequences between sequence termini 103 and 1356 (numbering according to the *E. coli*
110 rRNA sequence published by (Brosius *et al.*, 1978)).

111 The sequenced 16S rRNA gene fragment of strain 131000547^T represents a continuous
112 stretch of 1415 unambiguous nucleotides between sequence positions 9 to 1444 (*E. coli*
113 numbering; (Brosius, *et al.*, 1978)).

114 Strain 131000547^T shares highest 16S rRNA gene sequence identity with type strains of the
115 species *Streptobacillus moniliformis* (97.6%) and *Streptobacillus hongkongensis* (94.5%),
116 followed by *Sneathia sanguinegens* (91.8%). Sequence similarities to all other taxa were
117 below 90%. Independent of the treeing method, strain 131000547^T formed a distinct cluster
118 (>80% bootstrap support) with the type strain of *Streptobacillus moniliformis* and
119 *Streptobacillus hongkongensis* (Fig. 1) clearly separated from the genera *Sneathia*, *Sebaldella*
120 and *Leptotrichia*. Strain 131000547^T clustered closest with the type strain of *Streptobacillus*
121 *moniliformis*, which is supported by a high bootstrap value (100%). Beside the *S.*
122 *moniliformis* type strain six further *S. moniliformis* strains isolated from different isolation
123 sources origin (Table S2) were analysed in parallel. All shared identical 16S rRNA gene
124 sequences and did not affect the distinct clustering of strain 131000547^T in the phylogenetic
125 tree.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

126 Amplification of the specific 16S rRNA gene sequences for strain 131000547^T resulted in
127 characteristic amplicon sizes of approximately 269 and 1222 bp employing the published
128 protocols for *Streptobacillus moniliformis*-specific PCR assays according to Kimura *et al.*
129 (Kimura *et al.*, 2008) and Nicklas (cited in (Rohde, *et al.*, 2008)), respectively (Table S1).

130 For further clarification of the phylogenetic relationship of strain 131000547^T to other
131 *Streptobacillus* species phylogenetic analyses based on partial nucleotide and amino acid
132 sequences of *gyrB*, *groEL*, and *recA* genes were performed according to the analysis
133 performed by Woo *et al.* (2014). Respective nucleotide sequences were aligned according to
134 amino acid sequences using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implemented in MEGA 5
135 (Tamura *et al.*, 2011). The correct open reading frame (ORF) was obtained by using the full-
136 length gene sequence of *S. moniliformis* DSM 12112^T as a reference. Pairwise sequence
137 similarities were calculated based on *p*-distances (calculated without an evolutionary model).
138 Phylogenetic trees were generated using the maximum-likelihood method with a discrete
139 Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of
140 sides are evolutionary invariable (+I) (for nucleotide sequences) and the Jones-Thornton-
141 Taylor model (JTT; (Jones *et al.*, 1992)) +G +I (for amino acid sequences). Both trees based
142 on 100 replications.

143 Phylogenetic trees based on partial nucleotide and more conserved amino acid
144 sequences of *gyrB*, *groEL* and *recA* showed in all trees the formation of monophyletic clusters
145 including all *Streptobacillus* species. Strain 131000547^T clustered (with high bootstrap
146 support) closest but in a distinct branch to *Streptobacillus moniliformis* strains (Fig. S1-S3).
147 In addition nucleotide and amino acid sequence similarities were always considerably lower
148 between strain 131000547^T and strains of the species *S. moniliformis* and *S. hongkongensis*
149 (Table S3), indicating clearly the genetic distinction of strain 131000547^T.

150 For DNA-DNA hybridization, the method described by (Ziemke *et al.*, 1998) was used except
151 that for nick-translation 2 µg DNA were labeled during 3 h incubation at 15°C. The overall

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

152 DNA-DNA relatedness between strain 131000547^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM
153 12112^T was \leq 19.9% (reciprocal 28.7%) as determined by hybridization, and therefore it is
154 evident that they are separate species.

155 From the results of the sequence analysis of the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL* and *recA* genes and
156 the DNA-DNA hybridization it is evident, that strain 131000547^T is different to the genera
157 *Sneathia*, *Sebaldella*, *Leptotrichia* and to the species *Streptobacillus moniliformis* and
158 *Streptobacillus hongkongensis*.

159

160 Results from the physiological characterization are given in the species description and in
161 Table 1. Extended biochemical profiling was carried out according to the manufacturer's
162 instructions using commercial test systems, i.e. Micronaut Strep2 (fermentation) (Merlin
163 Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany; (Manafi *et al.*, 1991)), that was especially adapted
164 to the growth characteristics of *Streptobacillus moniliformis*, VITEK2-compact with the NHI
165 card and API-ZymTM (both bioMérieux, Nürtingen, Germany). Vitek NHI identified strain
166 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and *Streptobacillus hongkongensis*
167 DSM 26322^T as *Neisseria cinerea* with 99, 98 and 93% confidence. Strain 131000547^T could
168 be clearly differentiated from type strains of *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and
169 *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, although there remain some minor discrepancies
170 to Woo *et al.* (Woo *et al.*, 2014) (e.g. leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-
171 phosphohydrolase). Nevertheless, API-ZYM profiles were run with two different batches, we
172 therefore believe that observed differences are related to natural variability within
173 *Streptobacillus moniliformis*, different batches of API-ZYM tests or caused by enzymatic
174 differences between HKU33^T and DSM 29248^T and DSM12112^T and CCUG13453^T,
175 respectively. The antimicrobial susceptibility pattern was determined using minimal inhibitory
176 concentrations (MIC) obtained by broth microdilution test (Merlin Diagnostika). Results were
177 interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2012) MIC

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

178 criteria based on CLSI MIC interpretive standards for other non-*Enterobacteriaceae* and
179 anaerobes (2013) according to Table S4. Strain 131000547^T turned out to be sensitive towards
180 azithromycin, ciprofloxacin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin,
181 meropenem, telithromycin and tetracycline, but resistant to nalidixic acid and
182 trimethoprim/sulfamethoxazole and intermediate resistant to streptomycin. Again, in contrast
183 to Woo *et al.* (Woo *et al.*, 2014), *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T turned out to be
184 α -haemolytic and the only trimethoprim/sulfamethoxazole-sensitive strain under study, which
185 could be confirmed also by E-test (data not shown). Besides the above mentioned possibilities
186 one can speculate if this effect could also be attributed to high levels of para-aminobenzoic
187 acid and thymine/thymidine in the plating medium that are known to antagonize
188 sulfamethoxazole and trimethoprim, respectively (Difco manual).

189 For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-
190 TOF MS), strain 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and six
191 *Streptobacillus moniliformis* reference strains, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T
192 and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T were incubated for 24 h and subsequently selected
193 from the SBA plates and then subjected to steel-targets according to manufacturer's
194 instructions (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). Strains were prepared
195 using the direct smear method provided by the manufacturer. Analysis was performed on a
196 MALDI-TOF MS Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 4613, BrukerDaltonics)
197 comprised only one entry from *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T. *Streptobacillus*
198 *moniliformis* DSM 12112^T and all *Streptobacillus moniliformis* reference strains were
199 identified to the species level with score levels above 2.2. Strain 131000547^T could not be
200 identified correctly yielding only score levels between 1.3 and 1.5. Following the manual
201 inclusion of respective spectra of strain 131000547^T to the database these were most closely
202 related to *Streptobacillus moniliformis*. A dendrogram including selected main spectra peak
203 lists (msp) of the family *Leptotrichiaceae* from the Bruker database as well as strain

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

204 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and further reference strains,
205 *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T is
206 depicted in Fig. S4.

207 Furthermore, Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) was carried out with strain
208 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM
209 26322^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T. Bacterial isolates were cultured
210 independently in 5-7 replicates at 37°C for 48 h on SBA. Harvesting of cells, preparation of
211 bacterial films on zinc selenide plates, drying and handling were performed as described
212 previously (Kuhm *et al.*, 2009). The dried bacterial films were used directly for examination
213 by FT-IR. Infrared spectra were recorded for each sample in a transmission mode from 500 to
214 4000 cm⁻¹ with an FT-IR spectrometer (Tensor27 with HTS-XT-module, BrukerOptics,
215 Ettlingen, Germany). Acquisition and first analysis of data were carried out using OPUS
216 Software (vers. 4.2, BrukerOptics). The IR spectra of tested strains were compared by cluster
217 analysis (cf. (Eisenberg *et al.*, 2014, Helm *et al.*, 1991)). For cluster analysis, the second
218 derivation of the vector normalized spectra in the wave number range of 500-1400 cm⁻¹ and
219 2800-3000 cm⁻¹ were used for calculation with Ward's algorithm (OPUS 4.2; (Ward, 1963)).
220 The comparison of the infrared-spectra of strain 131000547^T with spectra from
221 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and
222 *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T showed a clear separation in two main branches for the
223 *Streptobacillus* species and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T. Inside the *Streptobacillus*-
224 branch all spectra from *Streptobacillus moniliformis* clustered compactly together, closely
225 adjacent to *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547^T and *Streptobacillus hongkongensis* DSM
226 26322^T. The dendrogram obtained depicts the arrangement of isolates in groups according to
227 their spectral differences (Fig. S5).

228

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

229 Both, the molecular differences obtained by DNA-DNA-hybridization and phylogenetic
230 analyses (Figs. 1 and S1-S3) and the differences based on MALDI-TOF MS and FT-IR (Figs.
231 S4 and S5) support the separate position of strain 131000547^T as a distinct species of
232 *Streptobacillus*. The dependence of strain 131000547^T to grow well in capnophilic
233 environment with 10% CO₂ in the presence of blood or serum, its negative reactivity for
234 cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole, the production of cotton ball-like appearance
235 in liquid media, its inducible L-forms beside “normal” small butyrous colonies, its Gram-
236 negative filamentous rod-shaped phenotype arranged in chains and clumps with irregular
237 bulbar swellings and its broad antimicrobial susceptibilities (Table 1, S4) also supported the
238 placement of the isolate in the genus *Streptobacillus* and distinguish it from *Sneathia*
239 *sanguinegens* and “*L. amnionii*” (Woo *et al.*, 2014). Moreover, genotypical and phenotypical
240 differences prove strain 131000547^T as a novel species different from *Streptobacillus*
241 *moniformis* and *Streptobacillus hongkongensis*. For this reason we are here proposing the
242 novel species *Streptobacillus felis* sp. nov. with the type strain 131000547^T (=DSM 29248^T =
243 CCUG 66203^T = CCM 8542^T)

244

245 **Emended description of the genus *Streptobacillus* Levaditi *et al.* 1925**

246 The description is emended from that given by Staley & Whitman (Staley & Whitman, 2010)
247 and Woo *et al.* (Woo *et al.*, 2014), but the following features are added. Rods with rounded or
248 pointed ends, or pleomorphic bacilli with coccobacillary, bacillary and filamentous forms.
249 Occur singly or form long, wavy chains. Gram-stain-negative. Non motile. Non-spore-
250 forming. Most strains are dependent on a capnophilic atmosphere containing 5-10 % CO₂ and
251 grow anaerobically only weakly. Contrarily, strains from guinea pigs were reported to depend
252 on anaerobic conditions and one out of two strains of *Streptobacillus hongkongensis* was able
253 to grow even aerobically. Capable to grow on blood agar and weakly on chocolate agar but
254 not on MacConkey agar; requires blood, serum or ascitic fluid for growth. Optimum

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

255 temperature 35-37°C. Most strains are non-haemolytic, but a *Streptobacillus moniliformis*
256 strain from a rat with otitis as well as the type strains of *Streptobacillus felis* sp. nov.
257 131000547^T and *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T are growing with α -haemolysis.
258 Most strains are positive for esterase (C4) and esterase lipase (C8). Negative for catalase and
259 cytochrome oxidase, indole production and nitrate reduction. DNA G+C content is 24-26
260 mol%. The type species is *Streptobacillus moniliformis*.

261

262 **Description of *Streptobacillus felis* sp. nov.**

263 *Streptobacillus felis* (fe' lis. L. gen. n. felis, of a cat)

264

265 Good growth occurs after 2-5 days at 37°C in a capnophilic atmosphere of 10% CO₂ on
266 Columbia agar with 5% sheep blood (SBA), TSA or TS bouillon with 20% cattle or horse
267 serum, but only weak growth on Schaedler and chocolate agar and no growth on Gassner and
268 MacConkey agar (all Oxoid). In an anaerobic environment reduced growth was observed.
269 Colonies were tiny, drop-like, shiny and slightly convex, measuring 0.1-0.4 mm in diameter.
270 Colonies are α -haemolytic on SBA. Conversion to L-phase or transitional phase variant may
271 occur spontaneously during cultivation. In liquid media (e.g. trypticase soy broth), with
272 addition of 20% serum, streptobacillary growth could be detected after 2-4 days as typical
273 "cotton ball" or "bread crumb"-like appearance.

274 Microscopic morphological features were indicative of Gram-negative, pleomorphic, fusiform
275 to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods with a size of 0.45
276 +/- 0.1 μ m (width) and 0.83 +/- 0.8 μ m (length) that were arranged in chains and clumps, also
277 sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Positive for acid phosphatase,
278 alkaline phosphatase, esterase C4, esterase lipase C8. Negative for motility, phenylalanine
279 arylamidase, ala-phe-pro arylamidase, lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase,
280 cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase α -

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

281 galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -
282 glucosaminidase, α -mannosidase, α -fucosidase, cytochrome oxidase, catalase, nitrate and
283 indole.

284 The type strain 131000547^T (=DSM 29248^T = CCUG 66203^T = CCM 8542^T) was isolated
285 from a cat with acute suppurative to fibrinous, focally necrotizing bronchopneumonia with
286 multifocal desquamation of type II pneumocytes and alveolar macrophages in Germany.

287

288 **Emended description of *Streptobacillus moniliformis* Levaditi *et al.* 1925**

289 The description is emended from that given by Staley & Whitman (Staley & Whitman, 2010)
290 and Woo *et al.* (Woo *et al.*, 2014). Rods with rounded or pointed ends. Occur singly or form
291 long, wavy chains. Gram-stain-negative. Non-motile. Non-spore-forming. Conversion to L-
292 phase or transitional phase variant may occur spontaneously during cultivation. Most strains
293 are dependent on a capnophilic atmosphere containing 5-10% CO₂ and grow anaerobically
294 only weakly. Contrarily, strains from guinea pigs were repeatedly reported to grow
295 exclusively anaerobically. Capable to grow on blood agar and weakly on chocolate agar but
296 not on MacConkey agar; requires serum or ascitic fluid for growth. Optimum temperature 35-
297 37°C. Most strains are non-haemolytic, but a strain from a rat with otitis is growing with α -
298 haemolysis. Ferments glucose to produce acid but not gas after 3-5 d. Positive for
299 phenylalanine arylamidase, ala-phe-pro arylamidase, α -chymotrypsin and esterase lipase (C8).
300 Negative for naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, N-acetyl- β -glucosaminidase, cystine
301 arylamidase, α -fucosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -
302 glucuronidase, lipase (C14), α -mannosidase, trypsin, valine arylamidase, catalase, cytochrome
303 oxidase, indole production and nitrate reduction. Variable for alkaline phosphatase, acid
304 phosphatase, esterase (C4) and leucine arylamidase. Resistant to trimethoprim-
305 sulphamethoxazole (>8/152 μ g/ml) but sensitive to azithromycin (=0.0625 μ g/ml),
306 ciprofloxacin (=1 μ g/ml), clindamycin (=0.25 μ g/ml), chloramphenicol (=1 μ g/ml),

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

307 erythromycin (≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$), meropenem ($= 0.25$ $\mu\text{g/ml}$), nalidixic
308 acid ($= 2$ $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (≤ 1 $\mu\text{g/ml}$), telithromycin (≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$) and tetracycline
309 (≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$).

310 DNA G+C content is 26.3 mol% (Nolan *et al.*, 2009). The type strain is CCUG 13453^T (=
311 9901^T = ATCC 14647^T = CCUG 2469^T = DSM 12112^T = NCTC 10651^T).

312

313 Acknowledgement

314 We thank Anna Mohr, Ulrike Kling, Katharina Engel, Andrea Erles-Kemna, Bernhard
315 Berkus, Barbara Depner, Anna-Katharina Schmid, Jana Kistenmacher and Gundula Will for
316 excellent technical assistance and Barbara Gamb for making even the most exotic manuscripts
317 available. Hermann Fehrentz is greatly acknowledged for submitting the cat to necropsy, from
318 which the new species was isolated from and for providing additional rats from his land.

319

320 References

321 **Bleich, A. & Nicklas, W. (2008).** [Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as
322 laboratory or pet animals]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **121**, 241-255.

323 **Boyer, C. I. J., Bruner, D. W. & Brown, J. A. (1958).** A *Streptobacillus*, the cause of
324 tendon-sheath infection in turkeys. *Avian Dis* **2**, 418-427.

325 **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide
326 sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**,
327 4801-4805.

328 **Das, A. M. (1986).** *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. *Ind J Comp*
329 *Microbiol Immunol Infect Dis* **7**, 115.

330 **Dewhirst, F. E., Klein, E. A., Thompson, E. C., Blanton, J. M., Chen, T., Milella, L.,**

331 **Buckley, C. M., Davis, I. J., Bennett, M. L. & other authors (2012).** The canine oral
332 microbiome. *PLoS One* **7**, e36067.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 333 **Ditchfield, J., Lord, L. H. & McKay, K. A. (1961).** *Streptobacillus moniliformis* infection in
334 a dog. *Can Vet J* **2**, 457-459.
- 335 **Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E. C. (1989).** Isolation and
336 direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding
337 for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 7843-7853.
- 338 **Eisenberg, T., Kutzer, P., Peters, M., Sing, A., Contzen, M. & Rau, J. (2014).**
339 Nontoxicogenic tox-bearing *Corynebacterium ulcerans* infection among game animals,
340 Germany. *Emerg Infect Dis* **20**, 448-452.
- 341 **Eisenberg, T., Nesseler, A., Nicklas, W., Spamer, V., Seeger, H. & Zschöck, M. (2014).**
342 *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports* **2014**,
343 1-7.
- 344 **Elliott, S. P. (2007).** Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* **20**,
345 13-22.
- 346 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap.
347 *Evolution* **39**, 783-791.
- 348 **Felsenstein, J. (2005).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by*
349 *the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*
- 350 **Gaastra, W., Boot, R., Ho, H. T. & Lipman, L. J. (2009).** Rat bite fever. *Vet Microbiol* **133**,
351 211-228.
- 352 **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. e. (1994).** *Methods for*
353 *General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 354 **Glünder, G., Hinz, K. H. & Stiburek, B. (1982).** [Joint disease in turkeys caused by
355 *Streptobacillus moniliformis* in Germany]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **89**, 367-370.
- 356 **Gourlay, R. N., Flanagan, B. F. & Wyld, S. G. (1982).** *Streptobacillus actinoides* (*Bacillus*
357 *actinoides*): isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in
358 gnotobiotic calves. *Res Vet Sci* **32**, 27-34.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 359 **Hayashimoto, N., Yoshida, H., Goto, K. & Takakura, A. (2008).** Isolation of
360 *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. *J Vet Med Sci* **70**, 493-495.
- 361 **Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. & Naumann, D. (1991).** Classification and
362 identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* **137**,
363 69-79.
- 364 **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation
365 data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**,
366 275-282.
- 367 **Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. &**
368 **Yamada, A. (2008).** Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase
369 chain reaction. *Microbiol Immunol* **52**, 9-15.
- 370 **Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R. & Rau, J. (2009).** Identification of *Yersinia*
371 *enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy.
372 *Appl Environ Microbiol* **75**, 5809-5813.
- 373 **Levaditi, C., Nicolau, S. & Poincloux, P. (1925).** Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus*
374 *moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. *C R Acad Sci* **180**,
375 1188-1190.
- 376 **Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner,**
377 **A., Lai, T., Steppi, S. & other authors (2004).** ARB: a software environment for sequence
378 data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363-1371.
- 379 **Manafi, M., Kneifel, W. & Bascomb, S. (1991).** Fluorogenic and chromogenic substrates
380 used in bacterial diagnostics. *Microbiological reviews* **55**, 335-348.
- 381 **Mohamed, Y. S., Moorhead, P. D. & Bohl, E. H. (1969).** Natural *Streptobacillus*
382 *moniliformis* infection of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. *Avian Dis*
383 **13**, 379-385.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 384 **Nolan, M., Gronow, S., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A., Lucas, S., Del Rio, T. G.,**
385 **Chen, F., Tice, H. & other authors (2009).** Complete genome sequence of *Streptobacillus*
386 *moniliformis* type strain (9901). *Stand Genomic Sci* **1**, 300-307.
- 387 **Pruesse, E., Peplies, J. & Glockner, F. O. (2012).** SINA: accurate high-throughput multiple
388 sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823-1829.
- 389 **Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008).** Fallbericht: Abszess durch *Streptobacillus*
390 *moniliformis* bei einer Ratte. *Prakt Tierarzt* **89**, 466-473.
- 391 **Russell, E. G. & Straube, E. F. (1979).** Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos*
392 *cinereus*). *J Wildl Dis* **15**, 391-394.
- 393 **Smallwood, R. P. (1929).** Ratbite fever from the bite of a pig. *Brit Med J* **29**, 1159.
- 394 **Staley, J. & Whitman, W. (2010).** Phylum XIX. *Fusobacteria* Garrity and Holt 2001, 140.
395 In, pp. 747-774. Edited by B. s. M. o. S. Bacteriology. New York: Springer.
- 396 **Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses
397 with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
- 398 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).**
399 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary
400 distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- 401 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the
402 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
403 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- 404 **Torres, L., Lopez, A. I., Escobar, S., Marne, C., Marco, M. L., Perez, M. & Verhaegen,**
405 **J. (2003).** Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. *Eur J*
406 *Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 258-260.
- 407 **Valverde, C. R., Lowenstine, L. J., Young, C. E., Tarara, R. P. & Roberts, J. A. (2002).**
408 Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol* **31**,
409 345-349.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 410 **Ward, J. H. (1963).** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Amer Statist*
411 *Assoc* **58**, 236-244.
- 412 **Washburn, R. G. (1995).** *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever). In Principles and
413 practice of infectious diseases Vol 2 pp. 2084–2086. Edited by G. L. Mandell, J. E. Bennett
414 and R. G. Dolin. New York: Churchill Livingstone.
- 415 **Woo, P. C., Wu, A. K., Tsang, C. C., Leung, K. W., Ngan, A. H., Curreem, S. O., Lam,**
416 **K. W., Chen, J. H., Chan, J. F. & other authors (2014).** *Streptobacillus hongkongensis* sp.
417 nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis in Hong Kong, and emended
418 descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. *Int J*
419 *Syst Evol Microbiol* **64**, 3034-3039.
- 420 **Wullenweber, M., Kaspereit-Rittinghausen, J. & Farouq, M. (1990).** *Streptobacillus*
421 *moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of
422 different strains of mice. *Lab Anim Sci* **40**, 608-612.
- 423 **Yamamoto, R. & Clark, G. T. (1966).** *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet*
424 *Rec* **79**, 95-100.
- 425 **Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W.,**
426 **Glockner, F. O. & Rossello-Mora, R. (2008).** The All-Species Living Tree project: a 16S
427 rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**, 241-250.
- 428 **Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J. & Rossello-Mora, R. (1998).** Reclassification of
429 *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst*
430 *Bacteriol* **48 Pt 1**, 179-186.
- 431
- 432

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

433 **Figure and Table Captions**

434 **Table 1.** Physiological characteristics of strain 131000547^T and the type strains
 435 *Streptobacillus moniliformis* and *Streptobacillus hongkongensis* obtained by Micronaut
 436 Strep2 (fermentation) and an individual reaction panel designed for the identification of
 437 *Streptobacillus* spp. (all Merlin Diagnostika GmbH)*, VITEK2-compact with the NHI card[†],
 438 API-Zym^{‡#} (both bioMérieux) and classical reactions[§]; Taxa: 1, *Streptobacillus felis* sp. nov.
 439 strain 131000547^T; 2, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 3, results from six
 440 *Streptobacillus moniliformis* reference strains (ATCC 27747, ATCC 49567, ATCC 49940,
 441 NCTC 11194, CIP 55-48 and CIP 81-99); 4, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; +,
 442 positive; -, negative; +/- variable. Congruent results are solely presented in the species
 443 description.

Compound	1	2	3	4
Haemolysis on SBA [§]	+	-	+/-	+
Neuraminidase [*]	-	+	+/-	-
Tripeptidase [*]	+	+	+	-
Prolin aminopeptidase [*]	+	+	+	-
Hydroxyprolin aminopeptidase [*]	+	+	+	-
Glycyltryptophan aminopeptidase [*]	+	+	+	-
Arginine aminopeptidase [*]	+	+	+	-
Pyrase [*]	+	+	+	+/-
Arginine dihydrolase [*]	+/-	+	+	+
Chitinase [*]	+	-	+/-	+
Phosphatase (unspecified) [†]	-	-	-	+
Phenylalanine arylamidase [†]	-	+	+	-
Ala-phe-pro arylamidase [†]	-	+	+	-

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Alkaline phosphatase [‡]	5	3	2-5	5
Esterase (C4) [‡]	5	3	2-4	3
Esterase lipase (C8) [‡]	4	4	3-5	3
Leucine arylamidase [‡]	0	1	1-4	0
α -Chymotrypsin [‡]	1	4	3-5	0
Acid phosphatase [‡]	4	3	1-3	4
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [‡]	2	1	1	3
α -Glucosidase [‡]	1	0	0	0

444 # score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0: negative, 1-4: intermediate, 5:

445 maximum; 3, 4 or 5 being considered positive)

446

447 **Fig. 1.** Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of strain 131000547^T

448 within the family *Leptotrichiaceae*. The tree was generated in ARB using RAxML (GTR-

449 GAMMA, Rapid Bootstrap analysis, 100 bootstraps) and based on 16S rRNA gene sequences

450 between positions 103 to 1356 (*E. coli* numbering, (Brosius, *et al.*, 1978). GenBank accession

451 numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70%

452 (100 replicates). Nodes marked with asterisks were also present with high bootstrap support

453 (>70%) in the maximum-parsimony tree. Bar, 0.10 nucleotide substitutions per side.

454

455 **Fig. S1.** Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (432 nt) and GyrB (144 aa) sequences

456 including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic

457 relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in

458 MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I

459 model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100

460 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

461 brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup.

462 Bar: 0.01 substitutions per sequence position.

463

464 **Fig. S2.** Phylogenetic trees based on partial *groEL* (556 nt) and GroEL (185 aa) sequences
465 including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic
466 relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in
467 MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I
468 model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100
469 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in
470 brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup.
471 Bar: 0.1 nucleotide and 0.01 amino acid substitutions per nucleotide or amino acid side,
472 respectively.

473

474 **Fig. S3.** Phylogenetic trees based on partial *recA* (744 nt) and RecA (248 aa) sequences
475 including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic
476 relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in
477 MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I
478 model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100
479 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in
480 brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup.
481 Bar: 0.01 substitutions per sequence position.

482

483 **Fig. S4.** Dendrogram including all main spectra peak lists (msp) of the family
484 *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Sebaldella termitidis*
485 NCTC 11300^T, *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis*
486 DSM 26322^T and *Streptobacillus moniliformis* reference strains were measured using the

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

487 direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper msp Dendrogram
488 Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The
489 database used (DB 4613, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra from *Streptobacillus*
490 *moniliformis* (DSM 12112^T); ^T type strain, ATCC: American Type Culture Collection,
491 Rockville, USA, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany,
492 CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France, NCTC: National Collection of Type
493 Cultures, London, UK.

494

495 **Fig. S5.** Cluster analysis of respective spectra obtained by Fourier-transform infrared-
496 spectroscopy (FT-IR) using OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics). In each case at least
497 four IR-spectra of *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T, *Streptobacillus felis* sp. nov.
498 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus moniliformis*
499 DSM 12112^T were used for calculation with Ward's algorithm. The dendrogram obtained
500 depicts the arrangement of isolates in groups according to their spectral differences.

501

502 **Table S1.** Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions of the target genes used in
503 the present study.

504

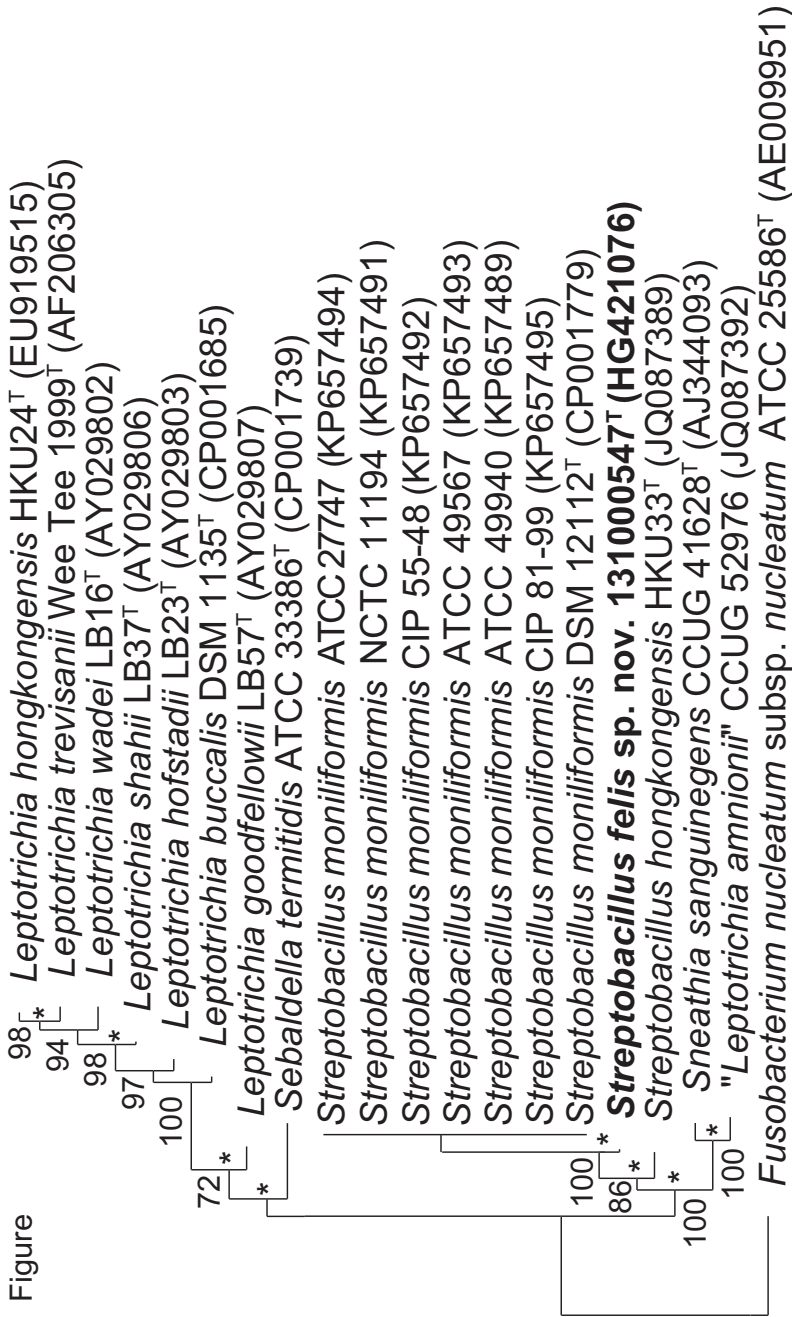
505 **Table S2.** Overview of gene sequences of strain 131000547^T and *Streptobacillus*
506 *moniliformis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-
507 published genomes and from DSM 12112^T (CP001779 (Nolan *et al.*, 2009)).

508

509 **Table S3.** Sequence similarities of *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547^T to two other
510 *Streptobacillus* species, *S. moniliformis* and *S. hongkongensis*. Sequence similarities were
511 calculated based on p-distances determined in MEGA5. 16S rRNA gene sequence

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

512 similarities, *groEL*, *recA* and *rpoB* nucleotide and amino acid sequence similarities. n:
513 number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the
514 phylogenetic trees (Fig. 1, Fig. S1-S3). In the analysis included *Streptobacillus hongkongensis*
515 strains were analysed by Woo *et al.* (2014). Sequences were obtained from GenBank.
516
517 **Table S4.** Antimicrobial drug susceptibility testing of *Streptobacillus felis* sp. nov.
518 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and *Streptobacillus hongkongensis*
519 DSM 26322^T by broth microdilution test with Merlin Micronaut system; AZM: azithromycin,
520 CIP: ciprofloxacin, CLI: clindamycin, CMP: chloramphenicol, ERY: erythromycin, GEN:
521 gentamicin, MER: meropenem, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, T/S:
522 trimethoprim/sulfamethoxazole, TEL: telithromycin, TET: tetracycline, R: resistant, I:
523 intermediate susceptible, S: susceptible phenotype, MIC values in µg/ml



0.10

Table S2. Overview of gene sequences of strain 131000547^T and *Streptobacillus moniliformis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes and from DSM 12112^T (CP001779 (Nolan *et al.*, 2009)).

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA gene	<i>gyrB</i>	<i>groEL</i>	<i>recA</i>
<i>Streptobacillus felis</i> sp. nov.	131000547 ¹	cat with pneumonia, Germany	HG421076	KP676101	KP657496	KP657504
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49940	rat with otitis media, Germany	KP657489	KP676102	KP657497	KP657505
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	NCTC 11194	human case of RBF, UK	KP657491	KP676104	KP657499	KP657507
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 55-48	mouse with lymph adenitis, UK	KP657492	KP676105	KP657500	KP657508
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49567	mouse with lymph adenitis, Germany	KP657493	KP676106	KP657501	KP657509
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 27747	turkey with septic arthritis, USA	KP657494	KP676107	KP657502	KP657510
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSM 12112 ^T	human case of rat bite fever, France		CP001779		
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 81-99	human blood culture, wild rat bite, France	KP657495	KP676108	KP657503	KP657511

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser¹, Werner Nicklas², Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Aledelbi⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungssamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@hhl.hessen.de

Table S2. Overview of gene sequences of strain 131000547^T and *Streptobacillus moniliformis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes and from DSM 12112^T (CP001779 (Nolan *et al.*, 2009)).

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA gene	<i>gyrB</i>	<i>groEL</i>	<i>recA</i>
<i>Streptobacillus felis</i> sp. nov.	131000547 ^T	cat with pneumonia, Germany	HG421076	KP676101	KP657496	KP657504
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49940	rat with otitis media, Germany	KP657489	KP676102	KP657497	KP657505
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	NCTC 11194	human case of RBF, UK	KP657491	KP676104	KP657499	KP657507
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 55-48	mouse with lymph adenitis, UK	KP657492	KP676105	KP657500	KP657508
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49567	mouse with lymph adenitis, Germany	KP657493	KP676106	KP657501	KP657509
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 27747	turkey with septic arthritis, USA	KP657494	KP676107	KP657502	KP657510
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSM 12112 ^T	human case of rat bite fever, France		CP001779		
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 81-99	human blood culture, wild rat bite, France	KP657495	KP676108	KP657503	KP657511

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaser², Werner Nickel³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen¹, Khayrieh Altedelbi¹ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlín Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S3. Sequence similarities of *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547¹ to two other *Streptobacillus* species, *S. moniliformis* and *S. hongkongensis*. Sequence similarities were calculated based on p-distances determined in MEGA5. 16S rRNA gene sequence similarities, *groEL*, *recA* and *rpoB* nucleotide and amino acid sequence similarities. n: number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the phylogenetic trees (Fig. 1, Fig. S1-S3). In the analysis included *Streptobacillus hongkongensis* strains were analysed by Woo *et al.* (2014). Sequences were obtained from GenBank.

	<i>S. felis</i> (n=1) - <i>S. moniliformis</i> (n=7)	<i>S. felis</i> (n=1) - <i>S. hongkongensis</i> (n=2)	<i>S. moniliformis</i> (n=7)	<i>S. hongkongensis</i> (n=2)
<i>groEL</i> (556 nt)	82.4-82.6	75.7-75.9	99.5	99.3
GroEL (185 aa)	91.9	80	100	99.5
<i>recA</i> (744 nt)	86.6	78.8-78.9	100	98.5
RecA (248 aa)	95.6	81.9	100	100
<i>rpoB</i> (529 nt)	87.5-88.3	78.4	98.9-100*	98.7
RpoB (175 aa)	96	80.1	100	97.7
16S rRNA gene (1479 nt)	97.6	94.5-95.6	100	99.8

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen¹, Khayrieh Alcedelbi⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S4. Antimicrobial drug susceptibility testing of *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T by broth microdilution test with Merlin Micronaut system; AZM: azithromycin, CIP: ciprofloxacin, CLI: clindamycin, CMP: chloramphenicol, ERY: erythromycin, GEN: gentamicin, MER: meropenem, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, T/S: trimethoprim/sulfamethoxazole, TEL: telithromycin, TET: tetracycline, R: resistant, I: intermediate susceptible, S: susceptible phenotype, MIC values in µg/ml.

	AZM	CIP	CLI	CMP	ERY	GEN	MER	NAL	STR	T/S	TEL	TET
<i>Streptobacillus felis</i> sp. nov.	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S
131000547 ^T	=0.125	=1	0.125	=4	=4	=2	=0.25	=32	=4	>8/152	=2	=0.25
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
DSM 12112 ^T	0.0625	=1	=0.25	=1	≤0.5	≤0.125	=0.25	=2	≤1	>8/152	0.125	≤0.125
<i>Streptobacillus hongkongensis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DSM 26322 ^T	0.0625	=0.5	0.125	0.5	0.5	≤0.125	≤0.0625	≤1	≤1	≤0.0625/1.1875	≤0.125	0.125

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia
 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
 Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Aldehbi⁵ and Peter Kämpfer⁶
¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany
 Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

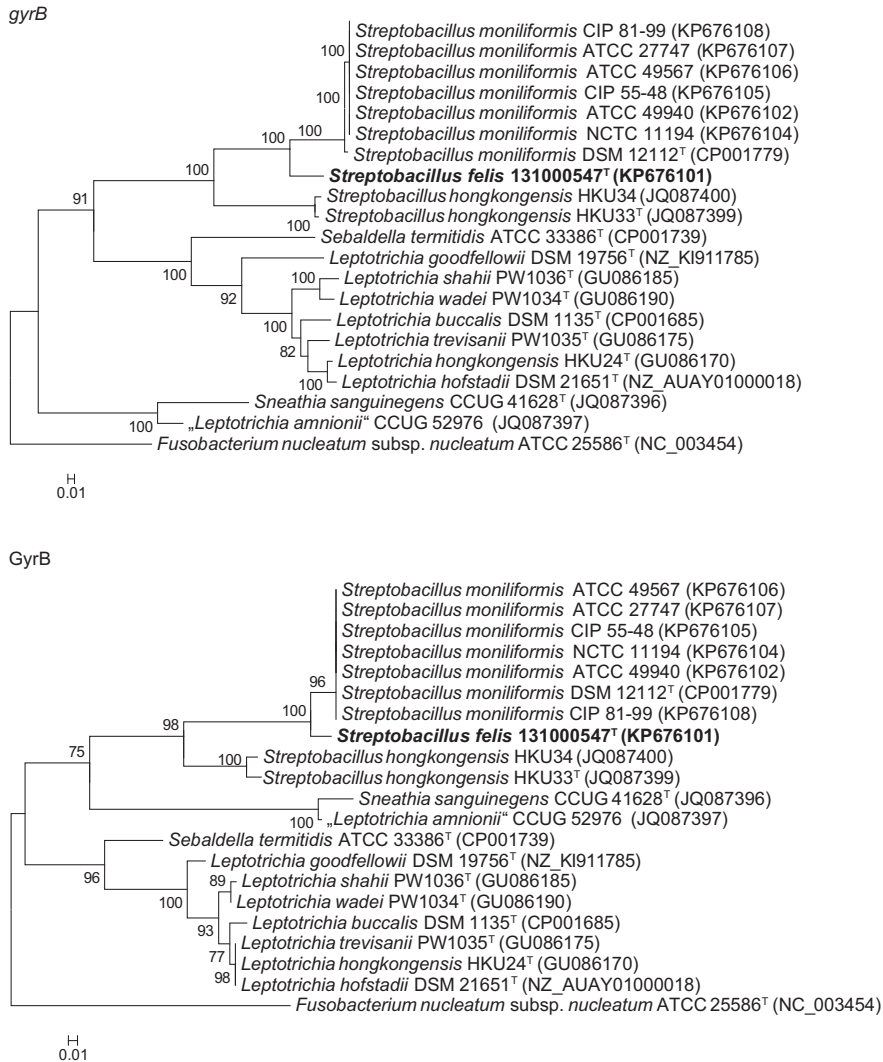


Fig. S1. Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (432 nt) and GyrB (144 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.01 substitutions per sequence position.

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Alledelbi⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

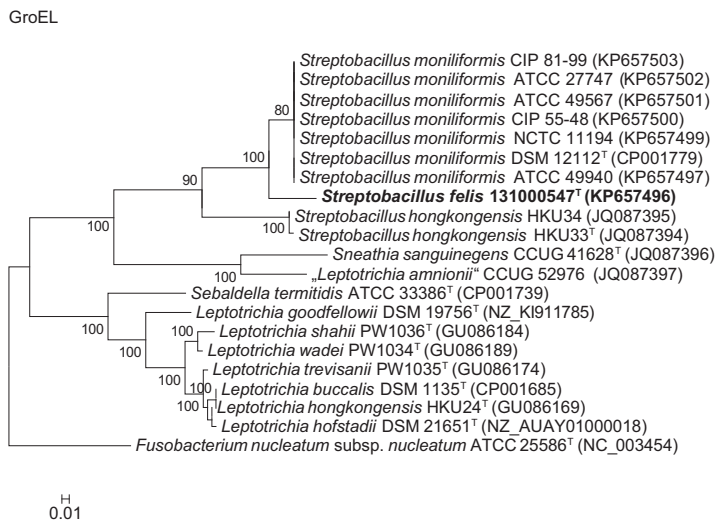
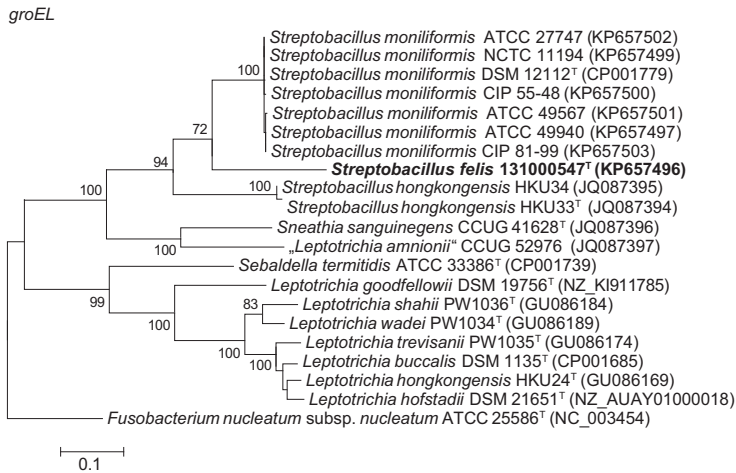


Fig. S2. Phylogenetic trees based on partial *groEL* (556 nt) and GroEL (185 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide and 0.01 amino acid substitutions per nucleotide or amino acid side, respectively.

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Alledlbi⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

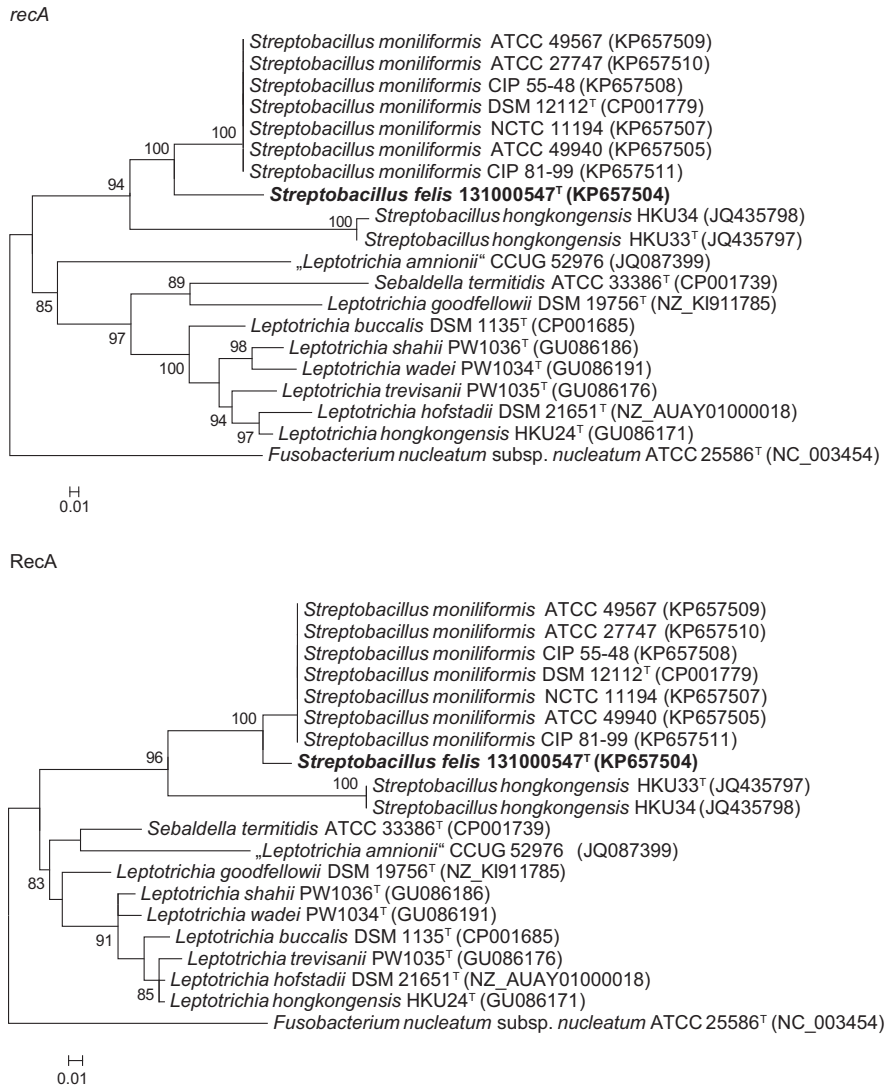


Fig. S3. Phylogenetic trees based on partial *recA* (744 nt) and RecA (248 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain 131000547^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.01 substitutions per sequence position.

Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

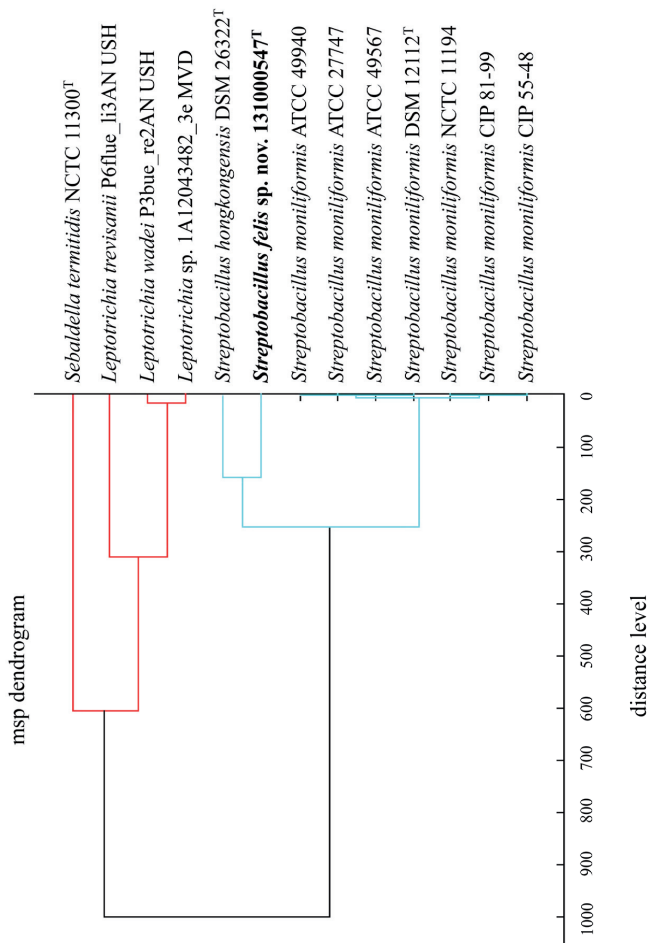
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Aledelbi⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

Fig. S4. Dendrogram including all main spectra peak lists (msp) of the family *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus moniliformis* reference strains were measured using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper msp Dendrogram Creation Standard Method (v3.1, build 66). The database used (DB 4613, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra from *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112^T); ¹ type strain, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK.



Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

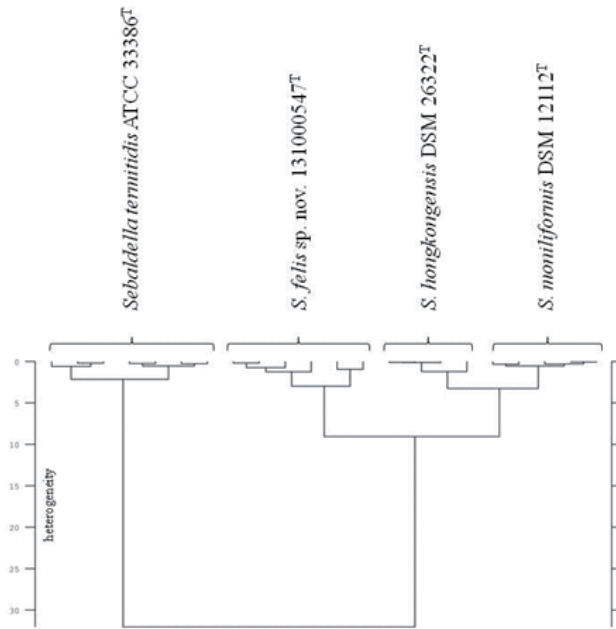
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Werner Nicklas³, Norman Mauder⁴, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Aledeibi⁵ and Peter Kämpfer⁶

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-

69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

Fig. S5. Cluster analysis of respective spectra obtained by Fourier-transform infrared-spectroscopy (FT-IR) using OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics). In each case at least four IR-spectra of *Sebaldeella termitidis* ATCC 33386^T, *Streptobacillus felis* sp. nov. 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T were used for calculation with Ward's algorithm. The dendrogram obtained depicts the arrangement of isolates in groups according to their spectral differences.



Streptobacillus felis sp. nov. isolated from a cat with pneumonia

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser¹, Werner Nicklas¹, Norman Mauder¹, Matthias Contzen⁴, Khayrieh Aledeibi¹ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁴ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁵ Merlin Diagnostika GmbH, D-53332 Bornheim-Hersel, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.3 Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*.

Eisenberg T.*, W. Nicklas, N. Mauder, J. Rau, M. Contzen, T. Semmler, N. Hofmann, K. Aledelbi & C. Ewers

PLoS One, 2015, 10(8): e0134312.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is the original version of an article published in PLoS One.
This version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134312>

RESEARCH ARTICLE

Phenotypic and Genotypic Characteristics of Members of the Genus *Streptobacillus*

Tobias Eisenberg^{1*}, Werner Nicklas², Norman Mauder³, Jörg Rau³, Matthias Contzen³, Torsten Semmler⁴, Nicola Hofmann⁵, Khayrieh Aledebi⁶, Christa Ewers⁷

1 Hessian State Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Giessen, Germany, 2 German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, 3 Chemical and Veterinary Investigation Office (CVUA) Stuttgart, Fellbach, Germany, 4 Robert Koch Institute, Berlin, Germany, 5 Institute for Multiphase Processes, Leibniz University, Hannover, Germany, 6 Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany, 7 Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Giessen, Germany

* tobias.eisenberg@lhl.hessen.de



CrossMark
click for updates

Abstract

The genus *Streptobacillus* (S.) remained monotypic for almost 90 years until two new species were recently described. The type species, *S. moniliformis*, is one of the two etiological agents of rat bite fever, an under-diagnosed, worldwide occurring zoonosis. In a polyphasic approach field isolates and reference strains of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis*, *S. felis* as well as divergent isolates were characterized by comparison of molecular data (n = 29) and from the majority also by their physiological as well as proteomic properties (n = 22). Based on growth-independent physiological profiling using VITEK2-compact, API ZYM and the Micronaut system fastidious growth-related difficulties could be overcome and streptobacilli could definitively be typed despite generally few differences. While differing in their isolation sites and dates, *S. moniliformis* isolates were found to possess almost identical spectra in matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. Spectroscopic methods facilitated differentiation of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis* and *S. felis* as well as one divergent isolate. Sequencing of 16S rRNA gene as well as functional genes *groEL*, *recA* and *gyrB* revealed only little intraspecific variability, but generally proved suitable for interspecies discrimination between all three taxa and two groups of divergent isolates.

OPEN ACCESS

Citation: Eisenberg T, Nicklas W, Mauder N, Rau J, Contzen M, Semmler T, et al. (2015) Phenotypic and Genotypic Characteristics of Members of the Genus *Streptobacillus*. PLoS ONE 10(8): e0134312. doi:10.1371/journal.pone.0134312

Academic Editor: Paul Jaak Janssen, Belgian Nuclear Research Centre SCK-CEN, BELGIUM

Received: April 16, 2015

Accepted: July 7, 2015

Published: August 7, 2015

Copyright: © 2015 Eisenberg et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are available from GenBank: BankIt1841833 NCTC11941_16S KT311784; BankIt1841876 NCTC11941_groEL KT311785; BankIt1841876 NCTC11941_gyrB KT311786; BankIt1841876 NCTC11941_recA KT311787.

Funding: The Hessian State Laboratory (Hessisches Landeslabor) is supported by Hessian Ministry for the Environment, Climate Change, Agriculture and Consumer Protection (HMUKLV). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Merlin Diagnostika provided support in the form of a

Introduction

For almost 90 years, the genus *Streptobacillus* [1] (S.; *Leptotrichiaceae*, *Fusobacteriales*) comprised the monotypic *S. moniliformis*, one of the two etiological organisms of rat bite fever (RBF) [2, 3]. Beside RBF *S. moniliformis* causes also Haverhill fever (HF), which represent two rarely observed syndromes of this worldwide occurring bacterial zoonosis [3]. The infection is predominantly transmitted through rat bites, scratches or by direct or indirect contact with rat urine [4–6]. Approximately 50–100% of wild rats carry *S. moniliformis* in their oro- or nasopharynx and shed the organism with saliva and urine [2, 7, 8]. Despite its wide distribution in

salary for author KA, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Khayrieh Aledelbi is employed by Merlin Diagnostika. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

natural hosts *S. moniliformis* is a rarely detected and most likely under-reported pathogen in humans and animals [3]. In the last few years *Streptobacillus*-like organisms have been observed beside *S. moniliformis*, from which *S. hongkongensis* [9] and *S. felis* [10] were recently described as new species causing quinsy and septic arthritis in humans and pneumonia in a cat, respectively. Furthermore, *Streptobacillus* spp. were reported from a canine oral microbiome project (sequence COT-370; [11]) as well as from Japanese rats [12]. The present study aimed to compare 29 field isolates and reference strains of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis*, *S. felis* as well as two yet undescribed species from various geographic areas, host species and isolation sites with respect to phenotypic and molecular properties. In contrast to earlier investigations [13–15] a spectrum of methods was employed to overcome known diagnostic difficulties due to the fastidious growth of this microorganism.

Materials and Methods

Bacterial strains

The present study included 29 members of the genus *Streptobacillus* from different host species which cover isolations of *S. moniliformis* over the past 90 years from La Réunion near Africa, Asia, Australia, Europe and North America as well as type strains of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis* and *S. felis* (Table 1). Eight field isolates and reference strains ("strains" hereafter) were associated with human infections; 17 were obtained from rodents, i.e. 12 originated from rats, four from mice and one strain was derived from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*); three strains were isolated from turkeys and one strain was isolated from a cat. From seven Japanese rat strains there was only DNA available. The *S. moniliformis* strains associated with human disease were isolated from cases of RBF (n = 5), HF (n = 1) and unknown origin (n = 1) (Table 1).

Phenotypic characterization

Culture requirements. For the growth of *Streptobacillus* spp. Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (Oxoid, Wesel, Germany; SBA) was incubated for 2–5 days at 37°C in a capnophilic atmosphere of 10% CO₂. Liquid media (brain-heart infusion and peptone broth, supplemented with 20% bovine or horse serum [all Oxoid]) were used for streptobacillary growth and incubated for 2–7 days under the same conditions.

Biochemical properties. Extended biochemical profiling was carried out according to the manufacturer's instructions using commercial fermentative test systems, i.e. Micronaut Strep2 and RPO (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany; [23]), VITEK2-compact with the NHI card and API ZYM (both bioMérieux, Nürtingen, Germany; Table 2).

Presumptive physiological characterization further employed standard microbiological procedures: Haemolytic properties of the bacteria were observed on SBA. Tests for catalase activity were carried out with 3% H₂O₂ on microscopic slides and those for cytochrome oxidase with the BBL DrySlide system (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Antimicrobial susceptibility testing. The antimicrobial susceptibility pattern was determined using minimal inhibitory concentrations (MIC) obtained by broth microdilution test (Merlin Diagnostika) as described earlier [24]. Following the adaptation of the read-out system by using SPMS culture medium containing cattle serum and gelatine, the commercially available Micronaut-S *Campylobacter* (all Merlin Diagnostika) was carried out (S1 Table). The test design contained the following 12 antimicrobial substances: azithromycin (AZM), ciprofloxacin (CIP), clindamycin (CLI), chloramphenicol (CMP), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), meropenem (MER), nalidixic acid (NAL), streptomycin (STR), trimethoprim/sulfamethoxazol (T/S), telithromycin (TEL), and tetracycline (TET). Results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute criteria [25].

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 1. Field isolates and reference strains as well as origins, clinical symptoms and host species of *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus* spp. and *Sebaldella termitidis* used in this study.

Strain no.	Strain designation	Species	Year of isolation	Host	Clinic / sample	Country	Strain reference
1	DSM 12112 ^T (= ATCC 14647 ^T)	<i>S. moniliformis</i>	1925	Human	RBF	France	[1]
2	CIP 55–48	<i>S. moniliformis</i>	1947	Mouse	Lymph adenitis	UK	
3	ATCC 27747	<i>S. moniliformis</i>	1964	Turkey	Septic arthritis	USA	[16]
4	NCTC 10773	<i>S. moniliformis</i>	1971	Human	Blood culture	UK	
5	NCTC 11194	<i>S. moniliformis</i>	1977	Human	RBF	UK	
6	AHL 370–1	<i>Streptobacillus</i> sp.	1979	Spinifex hopping mouse	Liver	Australia	[17]
7	IPDH 144/80	<i>S. moniliformis</i>	1980	Turkey	Septic arthritis	Germany	
8	CIP 81–99	<i>S. moniliformis</i>	1981	Human	Blood culture (wild rat bite)	France	
9	AHL 370–4	<i>S. moniliformis</i>	1982	Mouse	Ear infection	Australia	
10	NCTC 11941	<i>S. moniliformis</i>	1983	Human	Haverhill fever	UK	
11	IPDH 109/83	<i>S. moniliformis</i>	1983	Turkey	Septic arthritis	Germany	
12	ATCC 49567	<i>S. moniliformis</i>	1989	Mouse	Lymph adenitis	Germany	[18]
13	Kun 3 (RIVM)	<i>S. moniliformis</i>	1991	Rat	Healthy	The Netherlands	[19]
14	ATCC 49940	<i>S. moniliformis</i>	1992	Rat	Otitis media	Germany	[20]
15	B10/15	<i>S. moniliformis</i>	unknown	Wild rat	Unknown	The Netherlands	
16	A378/1	<i>S. moniliformis</i>	1995	Wild rat	Vaginal swab	Germany	DKFZ strain collection
17	VA11257/2007	<i>S. moniliformis</i>	2007	Human (farmer)	RBF, endocarditis	Germany	[21]
18	VK105/14	<i>S. moniliformis</i>	2008	Domestic rat	Abscess	Germany	TiHo strain collection
19	B5/1	<i>S. moniliformis</i>	2009	Laboratory mouse	After rat bite	Germany	DKFZ strain collection
20	Marseille	<i>S. moniliformis</i>	2009	Rat	RBF	La Réunion	[22]
21	IKC1	<i>S. moniliformis</i>		Rat	Oral swab	Japan	AB330754, inactivated (DNA); [12]
22	IKC5	<i>S. moniliformis</i>		Rat	Oral swab	Japan	AB330755, inactivated (DNA); [12]
23	IKB1	<i>S. moniliformis</i>		Rat	Oral swab	Japan	AB330756, inactivated (DNA); [12]
24	TSD4	<i>S. moniliformis</i>		Rat	Oral swab	Japan	AB330757, inactivated (DNA); [12]
25	OGS16	<i>Streptobacillus</i> sp.		Rat	Oral swab	Japan	AB330758, inactivated (DNA); [12]
26	KWG2	<i>Streptobacillus</i> sp.		Rat	Oral swab	Japan	AB330759, inactivated (DNA); [12]
27	KWG24	<i>Streptobacillus</i> sp.		Rat	Oral swab	Japan	AB330760, inactivated (DNA); [12]
28	131000547 ^T (DSM 29248 ^T)	<i>S. felis</i>	2013	Cat	Pneumonia	Germany	[10]
29	DSM 26322 ^T (HKU33 ^T)	<i>S. hongkongensis</i>	2014	Human	Abscess	Hong Kong	[9]
30	NCTC 11300 ^T (ATCC 33386 ^T)	<i>Sebaldella termitidis</i>	1962	Termite	Intestine		

^T: type strain; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA; NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK; CIP: Collection Institut Pasteur, Paris, France; IPDH: Institut für Geflügelkrankheiten, Hannover, Germany; RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, The Netherlands; AHL: Animal Health Laboratory, South Perth, Australia; ZfV: Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Germany; DKFZ: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany; TiHo: Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany; RBF: rat bite fever

doi:10.1371/journal.pone.0134312.t001

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 2. Physiological characteristics of field isolates and reference strains from *Streptobacillus moniliformis* and of reference strains from *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Seibaldella termitidis* NCTC 11300^T.

Compound	Strain no.																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	28	29	30							
haemolysis on SBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-							
tripeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+							
prolin aminopeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-							
hydroxyprolin aminopeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-							
glycyltryptophan aminopeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- [§]							
arginine aminopeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-							
pyrase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- [§]	-							
neuraminidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	-	-	-	-							
arginine dihydrolase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-							
glycylprolin aminopeptidase* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
asparatyl aminopeptidase* [#]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
growth in SPMS medium* [#]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-							
urease*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-							
p-nitrophenyl-β-D-glucuronide*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
esculine*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+							
phenylalanine arylamidase [†]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- [§]	- [§]							
L-pyrrolidonyl arylamidase [†]	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-							
phosphatase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	- [§]							
tyrosine arylamidase [†]	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	- [§]	- [§]	-							
ala-phe-pro-arylamidase [†]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- [§]	- [§]	+						
phenylphosphonate [†]	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+							
D-mannose [†]	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+							
N-acetyl-D-glucosamine [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	+							
D-glucose [†]	+	W	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+							
alkaline phosphatase [†]	W	-	W	W	-	-	W	-	-	+	-	W	W	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+							
esterase (C4) [†]	W	W	W	W	W	+	W	-	W	+	W	W	+	W	-	W	-	-	-	-	+	W	-							
esterase lipase (C8) [†]	+	+	+	+	+	+	W	W	+	+	+	+	+	+	W	+	W	W	W	W	+	W	-							
lipase (C14) [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
leucine arylamidase [†]	W	-	W	W	-	W	W	W	-	W	W	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
valine arylamidase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
cystine arylamidase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
trypsin [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
α-chymotrypsin [†]	+	W	W	+	+	+	-	W	W	W	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-	-							
acid phosphatase [†]	W	-	-	-	-	+	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+							
naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	W							
β-Glucuronidase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
α-Glucosidase [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							

Physiological characteristics were obtained by an individual panel of eleven[#] discriminatory reactions designed for the identification of *Streptobacillus* spp. (Micronaut Strep2 and RPO; all Merlin Diagnostika GmbH)*, VITEK2-compact with the NHI card[†], API-ZYM[†] (both bioMérieux) and haemolytic properties on Columbia agar with 5% sheep blood; for congruent results see text; +: positive; -: negative; w: weak reaction; [§] potential discriminatory character for species identification

doi:10.1371/journal.pone.0134312.t002

Haemagglutination. Screening for adhesive properties was performed for 15 strains (No. 1–15 according to [Table 1](#)) by previously described haemagglutination experiments using erythrocytes from 11 different host species [26]. In detail, red blood cells from humans (blood type AB, rhesus factor positive), BALB/c and C57B1/6J mice, rats, turkeys, guinea-pigs, hamsters, chickens, sheep, horses, pigs and cattle were included [26]. For slide agglutination experiments defibrinated blood samples were diluted 1:4 in phosphate buffered saline (PBS). Colonies from a 24 h culture of *S. moniliformis* were used in a turbidity of McFarland 6 in 150 μ l PBS. Strong reactions were read as agglutination after gently mixing 15 μ l bacterial suspensions with 10 μ l diluted blood samples after 30 sec. Delayed reactions were read after 2 min incubation on ice. Haemagglutination was also assessed in microtiter plates by adding the bacterial suspension from the slide agglutination experiment to a final volume of 60 μ l per well thereby yielding blood dilutions of 1:7 and 1:10. Sealed plates were incubated for 24 h at 4°C. Haemagglutination was detected by semiquantitative reading as strong (++) or moderate/weak (+) shape of coat-forming layers on the well wall, whereas negative reactions caused sedimentation of erythrocytes on the bottom. *E. coli* KK 158/1 and a setup without bacteria served as positive and negative controls, respectively [26].

Matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS). Bacteria were incubated for 24 h, subsequently selected from the SBA plates and subjected to steel targets according to manufacturer's instructions (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). The viable bacteria were prepared using the direct smear method as well as an extraction protocol provided by the manufacturer. Briefly, freshly grown bacteria were harvested and diluted in ethanol, centrifuged (2.000 x g, 2 min), air dried and resuspended in aqueous volumes of 70% formic acid and acetonitrile followed by a vortex step. One microliter was directly transferred to the steel target. Analysis was performed on a MALDI–TOF MS Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised only one entry for *S. moniliformis* from strain DSM 12112^T (= ATCC 14647^T). A dendrogram including selected main spectra peak lists (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* from the Bruker database and the *S. moniliformis* strains from this study is depicted in [Fig 1](#).

Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR). Bacterial isolates were cultivated independently in 5–7 replicates at 37°C for five days in a capnophilic atmosphere of 10% CO₂ on SBA. Harvesting of cells, preparation of bacterial films on zinc selenide plates, drying and handling was performed as described previously [27]. The dried bacterial films were used directly for examination by FT-IR. Infrared spectra were recorded for each sample in a transmission mode from 500 to 4000 cm⁻¹ with an FT-IR spectrometer (Tensor27 with HTS-XT-module, BrukerOptics, Ettlingen, Germany). Acquisition and first analysis of data was carried out using OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics). To get a first impression the IR spectra of all viable strains listed in [Table 1](#) were compared by hierarchical cluster analysis [28, 29]. Therefore, the second derivation of the vector normalized spectra in the wave number range of 500–1400 cm⁻¹ and 2800–3000 cm⁻¹ were used for calculation with Ward's algorithm (OPUS 4.2; [30]). Spectra identified as outliers were quashed. The wave numbers 550–1800 cm⁻¹ and 2800–3200 cm⁻¹ of second derivative spectra were selected and vector normalized. After a principal component analysis, the first 40 components were used for linear discriminant analysis with spectra grouped by isolate. The diagram obtained depicts the arrangement of isolates according to their spectral differences ([Fig 2](#)).

Molecular characterization

Species specific PCR for *S. moniliformis*. Two PCRs for the detection of *S. moniliformis* based on the 16S rRNA gene were performed with minor modifications [12, 31]. Freshly

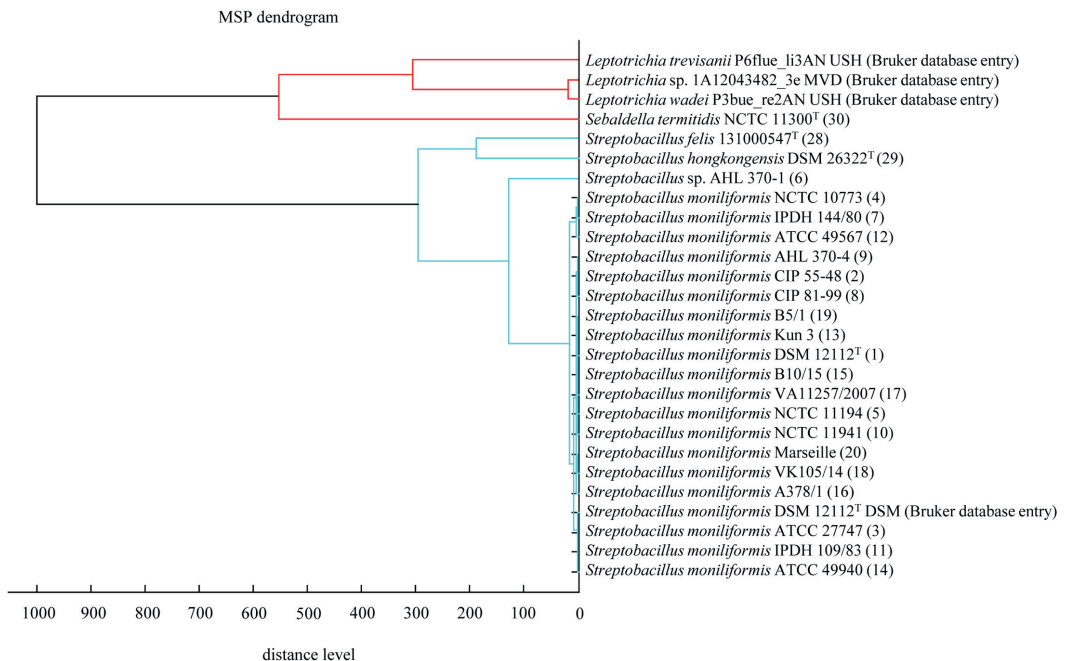


Fig 1. Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family Leptotrichiaceae available in the Bruker Taxonomy Database. Spectra of *Streptobacillus moniliformis* field and reference strains, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T and *Sebaldeella termitidis* ATCC 33386^T were measured using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised a singular entry for *S. moniliformis* (DSM 12112^T = ATCC 14647^T); ^T: type strain, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, IPDH: Institut für Geflügelkrankheiten, Hannover, Germany.

doi:10.1371/journal.pone.0134312.g001

cultured colonies were suspended in 180 µl sterile distilled water. After incubation for 15 min at 100°C the lysates were centrifuged at 12.000 x g for 10 min to remove cell debris. One microliter of the supernatant was used for subsequent PCR analysis according to Kimura *et al.* (primers S5: 5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3' and AS2: 5'-GCTTAGCTCCTCTTGAC-3'; PCR program as follows: x1 (95°C, 180 sec), x35 (95°C, 20 sec, 53°C, 60 sec, 72°C, 60 sec), x1 (72°C, 420 sec) [12] and Nicklas (primers SbmF: 5'-GAGAGAGCTTTGCATCCT-3' and SbmR: 5'-GTAACCTCAGGTGCAACT-3'; x1 (94°C, 240 sec), x35 (94°C, 60 sec; 50°C, 60 sec; 72°C, 60 sec), x1 (72°C, 420 sec)) (cited in [31]), respectively. All PCRs were carried out in a T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). Amplicons of 269 and 1222 bp, respectively, were detected by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (1 mg/ml), visualised in an UV transilluminator and photographed. DNA extracted from *S. moniliformis* strain NCTC 11941 served as positive control in all runs.

DNA sequence analysis and determination of guanine/cytosine (G/C) contents. DNA was extracted from a pure bacterial culture from all viable strains with a commercial kit

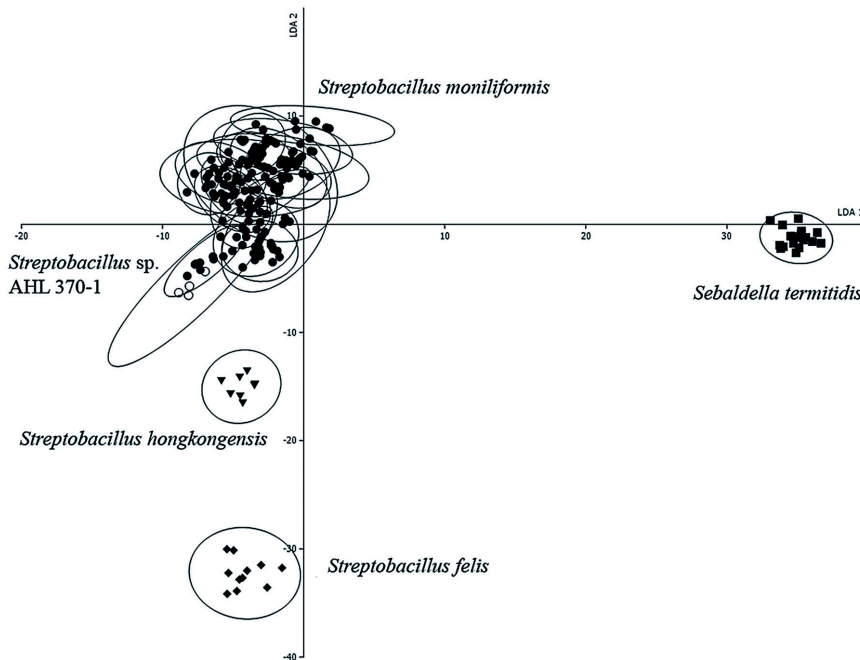


Fig 2. Linear discriminant analysis (LDA) of 201 infrared spectra of one strain each of *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, 19 *Streptobacillus moniliformis* field isolates and reference strains and *Streptobacillus* sp. isolate AHL 370–1 from a spinifex hopping mouse. The wave numbers 550–1800 cm⁻¹ and 2800–3200 cm⁻¹ of second derivative spectra were selected and vector normalized. After a principal component analysis, the first 40 components were used for the LDA. In this LDA every isolate was defined as one group. Spectra of *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T are represented by squares, *Streptobacillus felis* 131000547^T by diamonds, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T by triangles, *Streptobacillus* sp. (AHL 370–1) by circles and *Streptobacillus moniliformis* field isolates and reference strains by dots. Ellipses contain 95% of all group spectra assuming a bivariate normal distribution.

doi:10.1371/journal.pone.0134312.g002

according to the manufacturer's instructions (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit, Epicentre, distributed by Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany) and DNA from all strains was subjected to genome sequencing. De novo assembly was performed with CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). For automatic annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology [32]. Sequence analysis from non-published genomes and calculation of G/C contents were carried out with Geneious (v. 8.1.3; Biomatters, Auckland, NZ) [33]. Nucleotide sequences of partial 16S rRNA genes and of *groEL*, *recA* and *gyrB* genes were aligned by using MAFFT [34] (MAFFT v7.017, implemented in Geneious). Maximum likelihood phylogenies and trees were estimated (100 bootstrap replicates) and visualized with PhyML [35], using the HKY85 model [36].

Instead of weak DNA–DNA hybridization results for members of this genus [26] (data not shown) average nucleotide identity (ANI) was carried out according to the method described by Goris et al. [37] using the ezbiocloud platform (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>). According to Richter & Rosello-Mora [38] the cut-off for species boundary with this method is at 95–96%.

Results

Phenotypic characterization

Presumptive confirmation of bacterial strains. Streptobacilli grew well on SBA after 2–5 days of incubation at 37°C in 10% CO₂. Colonies were tiny, drop-like, shiny, slightly convex, 0.1–0.4 mm in diameter. Some of the colonies showed a “fried-egg” appearance. Strains normally grew without haemolysis, but strains *S. moniliformis* ATCC 49940, *S. felis* 131000547^T and *S. hongkongensis* DSM 26322^T displayed alpha-haemolytic colonies as already described [10, 20, 39]. In liquid media streptobacillary growth could be detected after 2–7 days as “puff-ball” or “bread crumb-like” appearance. Gram staining revealed irregular Gram-negative pleomorphic, fusiform to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods that were arranged in chains and clumps, sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings.

Biochemical studies. Despite its Gram-negative staining characteristics of *S. moniliformis*, a representative species specific panel of biochemical reactions was derived from preliminary testing with the Micronaut Strep2 (for streptococci and enterococci) and RPO (for Gram-positive bacteria) test systems. A panel of eleven relevant chemotaxonomic discriminatory parameters proved sufficient for the identification of *S. moniliformis*, which included besides principle growth characteristics and negative fermentative reactions during overnight incubation (data not shown) the following reactions (positive percentage): tripeptidase (95.2), proline aminopeptidase (95.2), arginine dihydrolase (85.7), arginine aminopeptidase (90.5), glycytryptophan aminopeptidase (100), growth in SPMS medium (100), neuraminidase (90.5), glycyproline aminopeptidase (100), hydroxyproline aminopeptidase (95.2), pyrase (100) and asparatyl aminopeptidase (0) (Table 2). Further physiological tests obtained by Micronaut Strep2 and RPO gave congruent results for all *S. moniliformis* strains for hydrolysis of p-nitrophenyl-β-D-glucosamide, alkaline phosphatase and arginine hydrolysis (positive) as well as for tellurite, fermentation of cellobiose, arbutin, sorbitole, amygdaline and raffinose, chitin, H-asp-β-naphthylamide, p-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside, p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (negative). Neither the single strains of *S. felis* 131000547^T and *S. hongkongensis* DSM 26322^T nor strain AHL 370–1 could unambiguously be separated from *S. moniliformis* by the above mentioned physiological characters, although *S. hongkongensis* was the only glycytryptophan aminopeptidase- and pyrase-negative strain under study. VITEK2-compact identified strains of *S. moniliformis*, *S. felis* 131000547^T and *S. hongkongensis* DSM 26322^T as *Neisseria* (*N.*) *cinerea* (93–99% confidence), *N. elongata* (87% confidence) or inconclusive between *N. cinerea* and *N. elongata* (NHI card profiles 0210000002, 0220000000, 0220000040, 0233000000, 0232000000, 0233000000, 0273000000, 0273200000, 0277220000, 0237100002, 0237220000). From the 30 different reactions all but eleven were congruently negative for arginine-arylamidase, γ-glutamyl-transferase, L-lysine-arylamidase, D-galactose, Ellman’s reagent, L-pyrrolidonyl-arylamidase, tyrosine-arylamidase, glycogen, D-maltose, sucrose, urease, β-galactopyranosidase indoxyl, ornithine-decarboxylase, α-arabinosidase, pyruvate, phosphoryl-choline, D-malate, maltotriose, L-glutamine, D-ribose, phenylphosphonate and D-xylose and positive for leucine-arylamidase and L-proline-arylamidase for all tested 22 strains of the genus *Streptobacillus* (nos. 1–20, 28, 29 according to Table 2). All *S. moniliformis* strains were phenylalanine-arylamidase-, tyrosine-arylamidase- and ala-phe-pro-arylamidase-positive in contrast to *S. felis* 131000547^T and *S. hongkongensis* DSM 26322^T. Furthermore, *S. hongkongensis* DSM 26322^T was the only phosphatase-positive strain under investigation.

The API-ZYM test was carried out with 22 *Streptobacillus* strains and revealed consistent enzymatic pattern for lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α-glucosidase, α-galactosidase, β-galactosidase, β-glucuronidase, β-glucosaminidase, N-acetyl-β-glucosaminidase,

α -mannosidase, α -fucosidase (all negative). All *Streptobacillus* strains from this study were positive for esterase lipase (C8). Contrarily, *S. hongkongensis* DSM 26322^T was the only naphthol-AS-BI-phosphohydrolase-positive strain and strain IPDH 144/80 was solely α -chymotrypsin-negative. All further differing biochemical test results are presented in [Table 2](#). Presumptive physiological characterization revealed corresponding results for all strains for cytochrome oxidase, catalase, urease, nitrate reduction and indole production (all negative).

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility was determined for all 22 viable *Streptobacillus* strains tested in this study and results are presented in [S1 Table](#). Congruent *in vitro* results could be obtained for all strains with respect to azithromycin (≤ 0.0625 –2), clindamycin (≤ 0.125 –0.25), chloramphenicol (≤ 0.5 –4), meropenem (≤ 0.0625 –1), telithromycin (≤ 0.125 –4), tetracycline (≤ 0.125 –1; all susceptible [MICs in mg/L]). A resistant phenotype was recorded for trimethoprim/sulfamethoxazol ($\geq 8/152$) for all strains except *S. hongkongensis* DSM 26322^T. Some strains of *S. moniliformis* displayed at least resistance or intermediate resistance to ciprofloxacin (2), erythromycin (16), gentamicin (4–8), nalidixic acid (32–128) and streptomycin (4–32).

Haemagglutination. Adhesive properties were detected in all 12 *S. moniliformis* strains tested. Erythrocytes of 11 different vertebrate species were agglutinated with varying intensity. The slide agglutination test represented results for spontaneous agglutination and most intense reactions could be observed in erythrocytes from turkeys, humans, guinea-pigs and pigs. Red blood cells from rats and chickens showed a strong reaction (++). C57BL/6J mice, known to represent a highly susceptible mouse strain towards streptobacillosis [18], were less strongly agglutinated compared to erythrocytes from the more resistant BALB/c mice (mostly + in contrast to mostly ++).

Results from the haemagglutination in microtiter plates differed in some way ([Table 3](#)). Again, erythrocytes from turkeys, humans and pigs, but also from rats and C57BL/6J mice proved to show the strongest haemagglutination reactions. Agglutination with erythrocytes from chickens, guinea-pigs and BALB/c mice was weaker compared to the results from slide agglutination tests.

In both experiments erythrocytes from cattle, sheep, hamsters and horses showed the weakest or even no agglutination. By adding mannose, a known agonist of a common adhesin receptor, no significant differences could be observed indicating mannose-resistant agglutination in all cases. No differences were observed between agglutination of erythrocytes from 'original' host species (from which respective strains were originally isolated) and other host red blood cells, but susceptibility was generally highest in species of potential hosts compared to non-host species.

MALDI-TOF MS. For MALDI-TOF MS, all 20 viable strains of *S. moniliformis* were identified to the species level with a score level between 2.0 and 2.4 using the direct smear and the extraction method for sample preparation. This was also true for strain AHL 370–1, which albeit clustered most distantly from all *S. moniliformis* strains. *Streptobacillus felis* 131000547^T as well as *S. hongkongensis* DSM 26322^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T could not be identified yielding only score levels between 1.3 and 1.5 (database DB 5627, BrukerDaltonics). Following the manual inclusion of respective spectra of these strains to the database these were most closely related to *S. moniliformis*. A dendrogram including selected main spectra peaks (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* from the Bruker database as well as from type strains of *S. felis*, *S. hongkongensis* and *Sebaldella termitidis* is depicted in [Fig 1](#).

FT-IR. The comparison of the infrared-spectra of 22 viable strains of *Streptobacillus* spp. as well as the closely related *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T showed a clear separation into the three species *S. moniliformis*, *S. felis* and *S. hongkongensis* ([Fig 2](#)). Based on spectra within the genus *Streptobacillus* the spectral cloud derived from spectra of divergent strain AHL 370–1 could be delineated from all other strains ([S1 Fig](#)).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 3. Adhesive properties of selected *S. moniliformis* strains from this study.

Erythrocytes from	DSM 12112 ^T	NCTC 10773	NCTC 11194	CIP 81–99	NCTC 11941	ATCC 27747	IPDH 144/80	IPDH 109/83	ATCC 49567	CIP 55–48	ATCC 49940	Kun 3 (RIVM)
Turkey	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
turkey*	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
Human	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
human*	++	+	+	++	++	+	++	++	++	++	-	++
guinea pig	+	+	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
guinea pig*	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
mouse (C57BL/6)	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
mouse (C57BL/6)*	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+
Rat	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	++
rat*	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	+	++
Pig	++	++	+	++	++	++	++	-	++	++	++	++
pig*	++	++	+	++	++	++	+	-	++	++	++	++
mouse (BALB/c)	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	-	+
mouse (BALB/c)*	+	+	+	++	+	+	++	++	++	++	+	+
Chicken	+	++	++	+	+	++	+	++	+	+	+	++
chicken*	+	++	++	+	+	++	++	++	+	++	+	++
Cattle	++	+	+	++	++	++	++	+	+	++	+	++
cattle*	++	+	+	++	+	++	+	+	+	++	+	++
Sheep	++	-	+	+	+	+	-	++	+	+	++	++
sheep*	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hamster	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+
hamster*	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	-	+
Horse	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
horse*	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+

Haemagglutination was tested in microtiter plates in the presence* and absence of 1% mannose; strong (++) , moderate/weak (+) or no (-) reaction

doi:10.1371/journal.pone.0134312.t003

Molecular characterization

Species specific PCR for *S. moniliformis*. Amplification of the specific target sequences resulted in characteristic amplicon sizes of approximately 269 and 1222 bp employing the PCR assays according to Kimura et al. [12] and Nicklas (cited in Rohde et al. [31]), respectively. All 23 *S. moniliformis* strains, the four divergent strains AHL 370–1, OGS16, KWG2 and KWG24 and also *S. felis* 131000547^T were found positive in both PCRs, whereas *S. hongkongensis* DSM 26322^T resulted in a specific amplicon in the PCR according to Nicklas but not to Kimura et al. (data not shown).

Phylogenetic analysis and determination of G/C contents. Alignment of sequences of the partial 16S rRNA gene (1482 bp) revealed a sequence homology of 99.8–100% for 23 *S. moniliformis* strains under study (Fig 3). Three (AHL 370–1, KWG2, KWG24) and one (OGS16) divergent strains, respectively, were clustering separately (\geq 90% bootstrap support) and displayed sequence homology of 97.97–98.58% to the type strain DSM 12112^T. The 16S rRNA gene homology between *S. moniliformis* DSM 12112^T compared to *S. felis* 131000547^T was 97.11%, whereas the homology between the *S. moniliformis* type strain and *S.*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

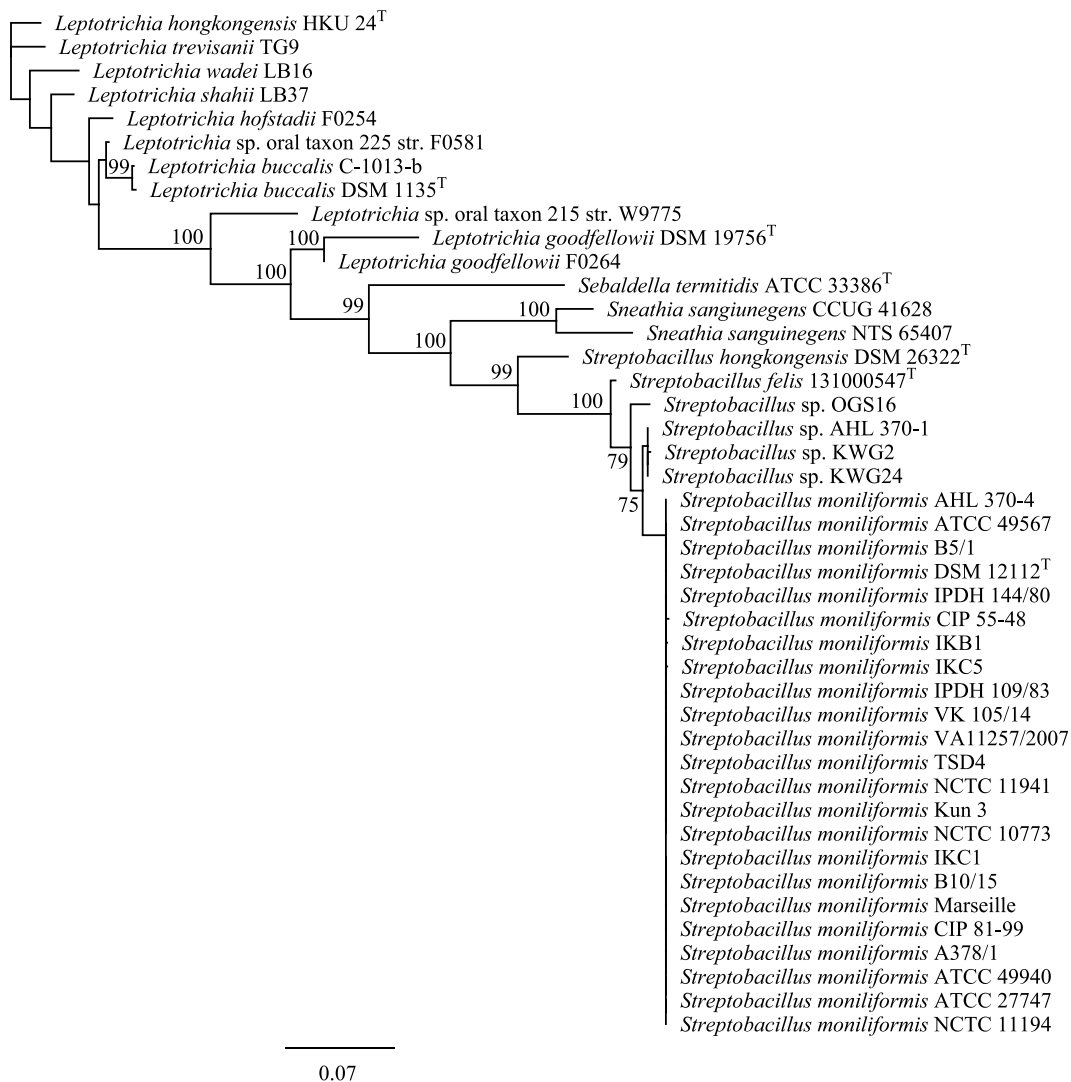


Fig 3. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position within the family Leptotrichiaceae. The tree was generated in Geneious using PhyML [35] and based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers are KR001904-1922, KP657489, KP657490-KP657495, and HG421076. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values (100 replicates). Bar: 0.06 nucleotide substitutions per site.

doi:10.1371/journal.pone.0134312.g003

hongkongensis DSM 26322^T was 92.73%. The type strain of *S. hongkongensis* clustered closer with that of *Sneathia sanguinegens* than with *S. moniliformis* and *S. felis* 131000547^T.

The outstanding position of the aforementioned four *S. moniliformis* strains as separate clusters was also supported by analysis of functional genes *groEL*, *gyrB*, and *recA*. The phylogenetic analysis based on concatenated sequences (4.632 bp) of these genes (*groEL* [1.602 bp], *recA* [1.047 bp], *gyrB* [1.983 bp]) (Fig 4) roughly revealed that strains AHL 370–1, KWG2 and KWG24 and also strain OGS16 clustered at two separate positions apart from the other members of the genus (100% bootstrap support), so that it was possible to clearly delineate *S. moniliformis*, divergent strain clusters 1 and 2, *S. hongkongensis* and *S. felis*.

G/C contents of *Streptobacillus* spp. obtained from non-published genomes from all strains revealed 25.7–28.9% (S2 Table), which is quite in accordance with previously determined values based on melting point analyses [26]. Average nucleotide identity (ANI) analysis revealed an overall DNA-DNA relatedness of 98.51 to 99.3% (recipr. 98.17–99.41%) between the type strain DSM 12112^T and all *S. moniliformis* strains under study, except for isolates AHL 370–1, KWG2, KWG24 and OGS16. ANI values below the cut-off for species boundary were calculated for *Streptobacillus* spp. isolates AHL 370–1, KWG2, KWG24 and OGS16 (88.21 to 89.1%; recipr. 87.89 to 89.87%). The average nucleotide identity between *S. moniliformis* type strain DSM 12112^T and *S. hongkongensis* DSM 26322^T and *S. felis* 131000547^T was 74.04% (recipr. 75.03%) and 82.0% (recipr. 82.02%), respectively (S2 Table).

Nucleotide sequence accession numbers. Partial 16S rRNA sequences of 27 *Streptobacillus* strains have been submitted to the GenBank database under accession nos. KR001904–KR001922, HG421076, KP657489, KP657491–KP657495, KT311784, CP001779. The *groEL*, *gyrB*, and *recA* sequences have been submitted under accession nos. KR001923–KR001941, KP657496–KP657497, KP657499–KP657503, KT311785, CP001779 (*groEL*), KR001942–KR001960, KP676101–KP676102, KP676104–KP676108, KT311786, CP001779 (*gyrB*), and KR001961–KR001979, KP657504–KP657505, KP657507–KP657511, KT311787, CP001779 (*recA*), respectively.

Discussion

The aim of this study was a comparison of different strains of the genus *Streptobacillus* including representatives of *S. moniliformis* and two strains of the novel species *S. hongkongensis* and *S. felis*. Few studies have focused on strain diversity within the species *S. moniliformis*, the etiological agent of the worldwide occurring zoonosis RBF, and compared strains from different origins, also considering the occurrence of L-forms in this species [13–15, 26, 40, 41]. A similar broad spatiotemporal diversity of strains like in the present study never formed the basis for a comparison, also including novel members of the recently extended genus for the first time. Most previous studies revealed only little differences between strains with respect to their pheno- and genotype [15, 26]. Minor biochemical strain differences between studies were merely attributed to different preparations of culture media [12, 14, 15, 41–44] and might also be explained by difficulties due to the fastidious growth or the person reading the tests [26]. Even within the same study single physiological discrepancies were noted in repeated experiments with the same strain, thereby reflecting inconsistency in test results rather than discriminatory traits [26]. Protein profiles as observed by SDS-PAGE were found to be identical between *S. moniliformis* strains in a former study [13] and other chemotaxonomical investigations found a homologous fatty acid profile for all tested *S. moniliformis* strains of tetradecanoic acid (14:0), palmitic acid (16:0), octadecanoic acid with linoleic acid (18:2) and oleic acid (18:1), and stearic acid (18:0) [45–47].

However, comprehensive analyses of differences based on spectroscopic data of biomolecules as well as genotypic properties of strains were not yet published in international literature.

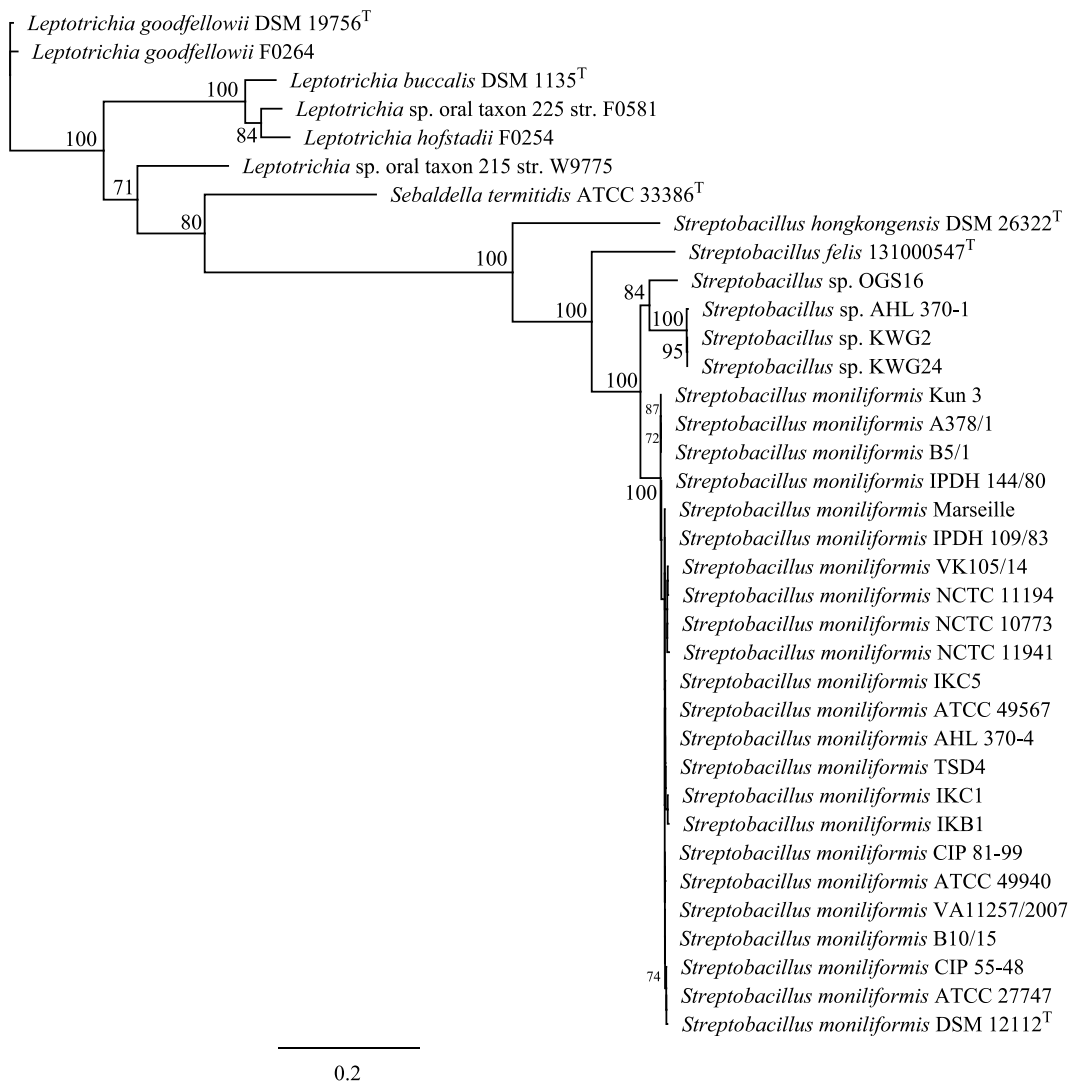


Fig 4. Phylogenetic trees based on concatenated sequences (4632 nt) of *groEL* (1.602 nt), *recA* (1.047 nt) and *gyrB* (1.983 nt), sequences including type strains of all species of the family *Leptotrichiaceae* showing the phylogenetic relationship of *Streptobacillus* species from this study.

GenBank accession nos. are KR001923-1941 and KP657496-503 for *groEL*, KR001942-1960 and KP657504-511 for *recA*, KR001961-1979 and KP676101-108 for *gyrB* sequences. The tree was generated with the maximum-likelihood program PhyML (Substitution Model HKY85; number of bootstraps: 100) [35] after alignment of sequences with MAFFT v7.017, both implemented in Geneious. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Bar: 0.2 substitutions per sequence position.

doi:10.1371/journal.pone.0134312.g004

The present study included 23 *S. moniliformis* strains from at least five different host species that cover isolations over the past 90 years from almost all subcontinents as well as the type strains of *S. hongkongensis* and *S. felis* and four divergent strains that presumably belong to two yet undescribed species. Classical biochemistry of most key reactions was in accordance with published results, although we also observed significant growth differences depending on the kind of carbohydrate preparation (data not shown). Therefore, standardized test systems for physiological typing of *S. moniliformis* were included. Earlier studies involved API 20E for assessing biochemical profiles [12]. As this test requires viable bacteria and as previously chosen culture conditions were not appropriate for the growth of *S. moniliformis*, published results of this method may be interpreted with caution. We have successfully employed commercially available systems API ZYM [6, 12, 14, 20] and VITEK2-compact (NHI profile) [9] and basically validated the Micronaut system for a novel application with *Streptobacillus*. All these systems use biochemical end-point measurements and are thus independent from bacterial growth though standardized and the Micronaut system earlier proved to be suitable for bacterial species and biotype discrimination [48]. The designed identification panel of this system could unequivocally discriminate members of the genus *Streptobacillus* from other bacterial species by considering growth characteristics (fastidious capnophilic growth, occurrence of L-forms, “puff-ball”- or “bread crumb”-like appearance in liquid media [2, 3, 12, 14, 15]) and eleven biochemical reactions (Table 2). Briefly, five of these reactions were identical among all *S. moniliformis* as well as *S. felis* 131000547^T. However, most other physiological tests showed too diverse reactions to discriminate species or biotypes, especially because the variability of *S. hongkongensis*, *S. felis* and the yet undescribed members could not or not sufficiently be evaluated by one or three strains each. Like in other studies, we could confirm major uniformity between strains of *S. moniliformis* for most physiological reactions. Nevertheless, minor discrepancies were observed, some of which were earlier reported [12, 14, 42–44] and can—in the case of API ZYM reactions—be explained by differences in semi quantitative reading of results, too [12, 14, 15, 41–43, 49].

Antimicrobial resistance profiles revealed that *S. moniliformis* is susceptible to all β -lactam antibiotics [14], and no β -lactamase activity could be demonstrated so far [50]. Penicillin G was repeatedly reported as the most active antimicrobial substance in *in vitro* tests, which further supports its use as the drug of choice in the treatment of RBF and HF, followed by tetracycline [2]. The majority of studies have performed antimicrobial susceptibility testing (AST) with rather old-fashioned methods without determining MIC values and not including all relevant actual agents and novel *Streptobacillus* species. In order to provide a more up-to-date picture we included recently isolated strains and carried out AST by broth microdilution with a commercially available test. The strains from this study were very similar in their resistance pattern and largely confirmed a generally good therapeutic basis. However, at least some isolates were resistant or intermediate resistant to ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid and streptomycin. Interestingly and in contrast to Woo et al. [9], *S. hongkongensis* DSM 26322^T turned out to be the only member of the genus under study that was trimethoprim/sulfamethoxazol-sensitive. Based on chemoresistance, biochemical and chemotaxonomic results from this and former studies other traits should be propagated, both for diagnostics as well as for strain comparisons in *Streptobacillus*. One of these applicable methods is the acquisition of MALDI-TOF and FT-IR spectra that were initially included on a large scale basis. By MALDI-TOF MS all tested strains of *S. moniliformis* could be assigned with high accuracy to species level. This was also true for representative spectra of *S. hongkongensis* and *S. felis* [10] and facilitated also discrimination of one of the undescribed *Streptobacillus* sp. (strain AHL 370–1). In contrast to MALDI-TOF MS, where the spectral information mirrors protein components, spectra generated by FT-IR include information from a broad variety of main

component biomolecules [51]. Again, spectra from type strains of *S. hongkongensis* and *S. felis* were shown to be distinct, but closely adjacent to those from all other *S. moniliformis* strains from this study, whereas spectra from strain AHL 370–1 could be noted as a small outgroup nearby the *S. moniliformis* cluster (Fig 2). It remains to be elucidated, whether strains KWG2, KWG24 and OGS16, from which only DNA was available, will confirm spectral traits found here. Interestingly, despite displaying a unique profile in electrophoretic protein patterns [13] no antigenic differences could be observed for strain AHL 370–1 [52].

Based on highly uniform electrophoretic protein patterns it was hypothesized that *S. moniliformis* strains could be grouped with respect to host species, geographic origin, disease pattern and route of infection, i.e. isolates from cases of RBF and HF should be clearly assigned by protein profiling [13]. We and others have not found evidence for these assumptions [15, 26, 52]. On the other hand, especially differences of HF- versus RBF-strains are unlikely because rats represent the source of infection in both cases and disparities could better be explained by different gene expression following oral or parenteral infection [3] or simply by too few HF-strains under study. Additionally, the time between infection and strain isolation from the host following rat exposure is usually too short to facilitate adaptation of strains and expression of a different phenotype. A number of studies have, nevertheless, proven that strains isolated from susceptible host species were able to cause infection in rodents, thereby partially fulfilling Koch's postulates [16, 18]. As hypothesized by Nolan et al. [50], no phylotypes of *S. moniliformis* were yet detected indicating that this species is rarely found in the environment outside of its natural hosts.

A number of studies have used 16S rRNA gene sequencing as a diagnostic tool for species determination of *S. moniliformis* in strains and clinical specimens [53–56]. Both PCR protocols targeting the 16S rRNA gene published as specific for *S. moniliformis* were suitable to detect all strains from humans, rats, mice, a spinifex hopping mouse and turkeys from this study and also *S. felis* [10]. In contrast, *S. hongkongensis* was only detected by the PCR described by Rohde et al. [31] suggesting that both PCR are merely genus rather than species-specific. In order to elucidate the sufficiency, usefulness and discriminatory power of marker genes for inter- as well as intraspecific analysis within the genus *Streptobacillus*, sequence data from all strains were analysed. Within the phylum Fusobacteria sequencing of 16S rDNA, 16S-23S rDNA internal transcribed spacer, *gyrB*, *groEL*, *recA*, *rpoB*, conserved indels and genes for group-specific proteins, 43-kDa outer membrane protein and zinc protease have been proposed for species identification or phylogenetic analysis [57–65] and eleven whole genome sequences were generated to date. We have used functional genes 16S rRNA, *groEL*, *recA* and *gyrB*, which unequivocally could discriminate the strains from this study to species level. Fueled by the work presented here and further studies we have identified two other candidate species of *Streptobacillus*, one of which will be described shortly, thereby significantly extending the knowledge of this former monotypic genus. A more detailed insight into some of these candidates was solely possible by comparison of further genes, which otherwise would have been missed solely by 16S rRNA gene sequencing. Interestingly, a previous study came to the conclusion that disparities in 16S rRNA might in fact be based on different co-evolution of strains in different rat host species as suggested by Kimura et al. (2008). Indeed were isolates directly or indirectly (mouse after rat bite) obtained from brown rats (*Rattus norvegicus*; strains no. 14, 16, 18, 19, 21–24) belonging to *S. moniliformis*, but for the remaining *S. moniliformis* strains the exact source rat species remained obscure. Variations of the 16S rRNA gene were mainly observed in the region at nucleotide positions 1 to 300 [12], which could also be confirmed in our study and involved four strains (AHL 370–1, KWG2, KWG24, OGS16 cf. Fig 3). Their outstanding position from *S. moniliformis* was also supported by analysis of other functional genes (cf. Fig 4), but these four strains represented in fact two separate clusters. Interestingly, we

found that strain AHL 370–1 from the spinifex hopping mouse clustered identical with strains KWG2 and KWG24 and respective genomes were also indistinguishable as obtained by ANI.

We therefore believe that strains OGS16, KWG2 and KWG24 are not exclusively restricted to *R. rattus*. This assumption is, on the other hand, also supported by the complete absence of human isolates resembling the 16S rRNA pattern of these three strains despite the rarity of *R. rattus* in many regions worldwide. Further epidemiologically based studies are required to elucidate the true prevalence of these microorganisms in different rat as well as further rodent host species. However, at present there is indeed no evidence that these genetic differences are geographically related, because the yet undescribed species were found in close proximity in Japan [12] and strain AHL 370–1 from this study originated from Australia.

With respect to G/C contents our investigations revealed a nearly identical G/C content of 25.7–28.9 mol% in all investigated *Streptobacillus* strains. The G/C content of *Seibaldella termitidis* was only 33.38 mol% [26, 66], thereby deceiving the classical value for species discrimination of 10 mol% [67]. Results from the literature of *S. hongkongensis* revealed G/C content of 26.0 [9, 10] and *S. felis* had 26.4 mol%. Analogous results could also be confirmed by ANI. A value of 70% DDH was proposed by Wayne et al. (1987) [68] as a recommended standard for delineating species. Goris et al. (2007) [37] could demonstrate a close relationship between DDH values and ANI in that the recommended cut-off point of 70% for species discrimination corresponded to 95% ANI. The 95–96% species boundary is also supported by Richter & Rosselló-Móra [38], who have developed an alignment free interface to calculate ANI also used in this study, which should even work for taxonomic issues on a 20% partial genome of strains under study. In contrast to the highly homologous group of *S. moniliformis* strains not only *S. hongkongensis* and *S. felis* but again also AHL 370–1, KWG2, KWG24 and OGS16 had significantly lower ANI values thereby clearly pointing towards separate species apart from *S. moniliformis*.

Concerning pathogenicity one might suspect haemolysis as a possible marker of virulence [3]. Indeed were haemolytic strains of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis* and *S. felis* involved in clinical disease in a rat (strain no. 14, ATCC49940) [15], a dog [7], a cat [39] and a human [10], but other clinical isolates, especially those causing severe or even fatal disease turned out to be non-haemolytic so that other virulence factors apparently play a more important role. These might include the extraordinary high amount of DNase in all strains, which was released even independently of bacterial growth [26]. However, another possible relationship was detected during haemagglutination experiments that could also be explained as trait of virulence: susceptibility of erythrocytes to haemagglutination was generally highest in species serving as potential hosts like humans, mice, rats, turkeys and guinea-pigs compared to non-host species suggesting a predisposing role for potential host species. No significant differences were observed between agglutination of erythrocytes from 'original' host species, i.e. from which respective strains were originally isolated and other host red blood cells, which again gives rise to the assumption that infectious strains do at least not rapidly adapt to their hosts following infection. However, these experiments unequivocally suggest the presence of adhesins, a mechanism involved in pathogenicity which is a prerequisite for the 'successful' infection of a host. Indeed, there appear to remain other factors besides adhesins as can be concluded from infections in hosts with missing host specificity. These might include not yet identified genetic factors at the host side which can be concluded from differences in susceptibility to infection like for instance the genetically diverse, highly susceptible C57BL/6J mice compared to BALB/c mice [18, 69].

Conclusion

Rat bite fever represents a significant public health threat that is under-diagnosed in humans and animal species. We have analyzed the largest-ever collection of strains with respect to time

and geography of this rarely isolated microorganism. In a polyphasic approach we could show that some recently described as well as novel candidate species besides *S. moniliformis* could be differentiated, which are not restricted to 16S rRNA gene differences. It will be challenging to note the true prevalence of these novel members in human and animal infections. Systematical data for several of the strains from this study with respect to G/C contents as well as haemagglutination were assessed before [26], but never made available to the public at large, which will hopefully help in future research to further elucidate virulence properties of these neglected bacterial species. Growth characteristics together with traditional physiological methods and also standardized biochemistry are suitable for genus determination, but do not possess enough discriminatory power to sufficiently differentiate *Streptobacillus* spp. We have shown that the strains of *S. moniliformis* as well as putative and designated type strains of the novel species could be easily classified with modern genotypic and phenotypic methods including sequence analysis of selected functional genes as well as FT-IR and MALDI-TOF MS. The latter proved to have the potential to easily diagnose the novel species *S. hongkongensis* and *S. felis* and also at least one yet undescribed species. Further genetic studies on *Streptobacillus* should include investigations on possible virulence genes and differences in pathogenic mechanism between strains.

Supporting Information

S1 Fig. Linear discriminant analysis (LDA) of 182 infrared spectra of 22 *Streptobacillus* isolates. The wave numbers 550–1800 cm^{-1} and 2800–3200 cm^{-1} of second derivative spectra were selected and vector normalized. After a principal component analysis, the first 40 components were used for the LDA. In this LDA every isolate was defined as one group. Spectra of *Streptobacillus felis* are represented by diamonds, *Streptobacillus hongkongensis* by triangles, *Streptobacillus* sp. (AHL 370–1) by circles and *S. moniliformis* by dots. Note that LDA axis 1 and 3 are shown, because axis 3 contains the differences between *Streptobacillus* sp. (AHL 370–1) and *S. moniliformis*. (TIF)

S1 Table. Antimicrobial susceptibility testing of *Streptobacillus moniliformis* strains and of reference strains *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Sebadella termitidis* NCTC 11300^T. Broth microdilution susceptibility testing was performed with the Merlin Micronaut system; results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) MIC criteria based on CLSI MIC interpretive standards for other non-*Enterobacteriaceae* and anaerobes [25]. AZM: azithromycin, CIP: ciprofloxacin, CLI: clindamycin, CMP: chloramphenicol, ERY: erythromycin, GEN: gentamicin, MER: meropenem, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, T/S: trimethoprim/sulfamethoxazole, TEL: telithromycin, TET: tetracycline, R: resistant, I: intermediate susceptible, S: susceptible phenotype, MIC values in mg/L. (DOCX)

S2 Table. Guanin/cytosin (G/C) contents of *Streptobacillus* spp. isolates and average nucleotide identity (ANI) of all strains under study to *S. moniliformis* type strain DSM 12112^T. (DOCX)

Acknowledgments

For excellent technical assistance we thank Ulrike Kling, Anna Mohr, Katharina Engel and Barbara Depner and Barbara Gamb for making even the most exotic manuscripts available. Stefanie P. Glaeser and Christoph Lämmeler are acknowledged for comments on an earlier draft of

the manuscript. Viola Spamer and Osama Sammra contributed in valuable pretrials. This study would not have been possible without the strain collection and the great interest of Michael Wullenweber in *S. moniliformis*. We are greatly acknowledging the support of Walter Geißdörfer (Erlangen), Judith Rohde (Hannover), Bernard La Scola (Marseille) and Koichi Imaoka (Tokyo) for providing strains or DNA of strains no. 17, 18, 19 and 21–28, respectively. Parts of this work belong to the doctoral thesis of Nicola Hofmann.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TE NH CE. Performed the experiments: TE WN NM JR MC TS NH KA. Analyzed the data: TE WN NM JR MC TS NH KA CE. Contributed reagents/materials/analysis tools: TE WN NM JR MC TS NH KA CE. Wrote the paper: TE.

References

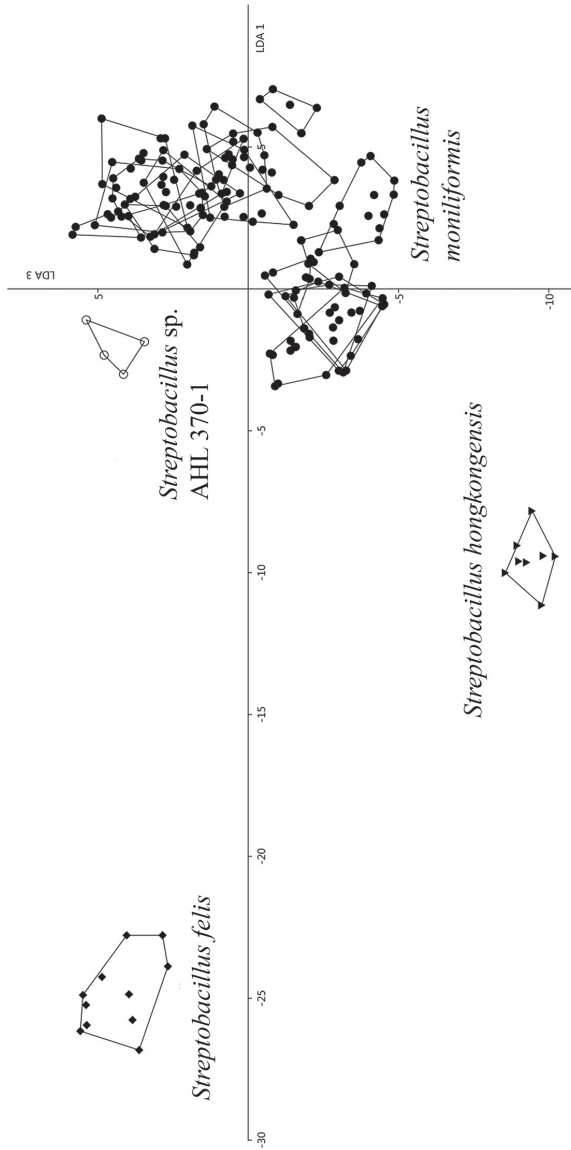
1. Levaditi C, Nicolau S, Poincloux P. Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. C R Acad Sci. 1925; 180:1188–90.
2. Elliott SP. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1):13–22. Epub 2007/01/16. doi: [10.1128/cmr.00016-06](https://doi.org/10.1128/cmr.00016-06) PMID: [17223620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17223620/); PubMed Central PMCID: [PMC1797630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1797630/).
3. Gaastra W, Boot R, Ho HT, Lipman LJ. Rat bite fever. Vet Microbiol. 2009; 133(3):211–28. Epub 2008/11/15. doi: [10.1016/j.vetmic.2008.09.079](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.079) PMID: [19008054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19008054/).
4. Torres L, Lopez AI, Escobar S, Marne C, Marco ML, Perez M, et al. Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22(4):258–60. Epub 2003/04/24. PMID: [12709841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12709841/).
5. Bleich A, Nicklas W. Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as laboratory or pet animals [in German]. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2008; 121(7–8):241–55. Epub 2008/08/21. PMID: [18712260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18712260/).
6. Hayashimoto N, Yoshida H, Goto K, Takakura A. Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. J Vet Med Sci. 2008; 70(5):493–5. Epub 2008/06/06. PMID: [18525173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18525173/).
7. Ditchfield J, Lord LH, McKay KA. *Streptobacillus moniliformis* infection in a dog. Can Vet J. 1961; 2(12):457–9. Epub 1961/12/01. PMID: [17421433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17421433/); PubMed Central PMCID: [PMC1585851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1585851/).
8. Washburn RG. *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin RG, editors. Principles and practice of infectious diseases Vol 2 New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 2084–6.
9. Woo PC, Wu AK, Tsang CC, Leung KW, Ngan AH, Curree SO, et al. *Streptobacillus hongkongensis* sp. nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis in Hong Kong, and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2014. doi: [10.1099/ijs.0.061242-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.061242-0) PMID: [24912824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912824/).
10. Eisenberg T, Glaeser S, Nicklas W, Mauder N, Contzen M, Aledelbi K, et al. *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. Int J Syst Evol Microbiol—accepted manuscript. 2015.
11. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, et al. The canine oral microbiome. PLoS One. 2012; 7(4):e36067. Epub 2012/05/05. doi: [10.1371/journal.pone.0036067](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036067) PONE-D-12-02767 [pii]. PMID: [22558330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22558330/); PubMed Central PMCID: [PMC3338629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3338629/).
12. Kimura M, Tanikawa T, Suzuki M, Koizumi N, Kamiyama T, Imaoka K, et al. Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 2008; 52(1):9–15. Epub 2008/03/21. doi: [10.1111/j.1348-0421.2008.00005.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00005.x) PMID: [18352907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18352907/).
13. Costas M, Owen RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Streptobacillus moniliformis* strains from human, murine and avian infections. J Med Microbiol. 1987; 23(4):303–11. Epub 1987/06/01. PMID: [3585963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3585963/).
14. Edwards R, Finch RG. Characterisation and antibiotic susceptibilities of *Streptobacillus moniliformis*. J Med Microbiol. 1986; 21(1):39–42. Epub 1986/02/01. PMID: [3950962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3950962/).
15. Wullenweber M. *Streptobacillus moniliformis*—a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. Lab Animal. 1995; 29(1):1–15. Epub 1995/01/01. PMID: [7707673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7707673/).
16. Yamamoto R, Clark GT. *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. Vet Rec. 1966; 79(4):95–100. Epub 1966/07/23. PMID: [5968147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5968147/).

17. Hopkinson WI, Lloyd JM. *Streptobacillus moniliformis* septicaemia in spinifex hopping mice (*Notomys alexis*). Aust Vet J. 1981; 57(11):533–4. Epub 1981/11/01. PMID: [7342940](#).
18. Wullenweber M, Kaspareit-Rittinghausen J, Farouq M. *Streptobacillus moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of different strains of mice. Lab Anim Sci. 1990; 40(6):608–12. Epub 1990/11/01. PMID: [2172624](#).
19. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. Lab Anim. 2002; 36(2):200–8. Epub 2002/04/12. PMID: [11943086](#).
20. Wullenweber M, Jonas C, Kunstyr I. *Streptobacillus moniliformis* isolated from otitis media of conventionally kept laboratory rats. J Exp Anim Sci. 1992; 35(1):49–57. Epub 1992/03/01. PMID: [1534999](#).
21. Kondruweit M, Weyand M, Mahmoud FO, Geissdorfer W, Schoerner C, Ropers D, et al. Fulminant endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis* in a young man. J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 134(6):1579–80. Epub 2007/11/21. doi: [10.1016/j.jtcvs.2007.08.010](#) PMID: [18023687](#).
22. Loridant S, Jaffar-Bandjee MC, La Scola B. Shell vial cell culture as a tool for *Streptobacillus moniliformis* "resuscitation". Am J Trop Med Hyg. 2011; 84(2):306–7. Epub 2011/02/05. doi: [10.4269/ajtmh.2011.10-0466](#) PMID: [21292904](#); PubMed Central PMCID: PMC3029187.
23. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiological reviews. 1991; 55(3):335–48. PMID: [1943991](#); PubMed Central PMCID: PMC372823.
24. Wellinghausen N, Pietzcker T, Poppert S, Belak S, Fieser N, Bartel M, et al. Evaluation of the Merlin MICRONAUT system for rapid direct susceptibility testing of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol. 2007; 45(3):789–95. doi: [10.1128/JCM.01856-06](#) PMID: [17202283](#); PubMed Central PMCID: PMC1829091.
25. Anonymous. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI document 2013;M100–S23.
26. Hofmann N. Phenotypical and molecular taxonomic investigations on the systematic status of *Streptobacillus moniliformis*, the agent of rat-bite-fever [in German]. Thesis Dr. rer. nat., Faculty of Biology, Leibniz Universität Hannover 1994.
27. Kuhn AE, Suter D, Felleisen R, Rau J. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(18):5809–13. doi: [10.1128/AEM.00206-09](#) PMID: [19617388](#); PubMed Central PMCID: PMC2747871.
28. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J Gen Microbiol. 1991; 137(1):69–79. PMID: [1710644](#).
29. Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M. Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus* strains from food—differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR, and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates [in German]. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2009; 122(1–2):25–36. PMID: [19226933](#).
30. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. J Amer Statist Assoc 1963; 58:236–44.
31. Rohde J, Rapsch C, Fehr M. Case report: Abscessation due to *Streptobacillus moniliformis* in a rat [in German]. Prakt Tierarzt. 2008; 89(6):466–73.
32. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 2008; 9:75. doi: [10.1186/1471-2164-9-75](#) PMID: [18261238](#); PubMed Central PMCID: PMC2265698.
33. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012; 28(12):1647–9. doi: [10.1093/bioinformatics/bts199](#) PMID: [22543367](#); PubMed Central PMCID: PMC3371832.
34. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 2002; 30(14):3059–66. PMID: [12136088](#); PubMed Central PMCID: PMC135756.
35. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic biology. 2003; 52(5):696–704. PMID: [14530136](#).
36. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of molecular evolution. 1985; 22(2):160–74. PMID: [3934395](#).
37. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57(Pt 1):81–91. doi: [10.1099/ijs.0.64483-0](#) PMID: [17220447](#).

38. Richter M, Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(45):19126–31. doi: [10.1073/pnas.0906412106](https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106) PMID: [19855009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19855009/); PubMed Central PMCID: [PMC2776425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2776425/).
39. Eisenberg T, Nesselser A, Nicklas W, Spamer V, Seeger H, Zschöck M. *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports*. 2014; 2014:1–7. doi: [10.1099/jmmcr.0.000562](https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.000562)
40. Roughgarden JW. Antimicrobial therapy of ratbite fever. A review. *Archives of Internal Medicine*. 1965; (116.):39–54.
41. Cohen RL, Wittler RG, Faber JE. Modified biochemical tests for characterization of L-phase variants of bacteria. *Appl Microbiol*. 1968; 16(11):1655–62. Epub 1968/11/01. PMID: [4302280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4302280/); PubMed Central PMCID: [PMC547735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC547735/).
42. Lambe DW Jr, McPhedran AM, Mertz JA, Stewart P. *Streptobacillus moniliformis* isolated from a case of Haverhill fever: biochemical characterization and inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate. *Am J Clin Pathol*. 1973; 60(6):854–60. Epub 1973/12/01. PMID: [4586017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4586017/).
43. Smith CD, Sampson CC. Studies of *Streptobacillus moniliformis* from a case of human rat-bite fever. *Am J Med Technol*. 1960; 26:47–50. Epub 1960/01/01. PMID: [13831909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13831909/).
44. Wittler RG, Cary SG. Genus *Streptobacillus* Levaditi. In: Buchanan RE, Gibbons NE, editors. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th edition. Baltimore: Williams & Wilkins Co.; 1974. p. 378–81.
45. Pins MR, Holden JM, Yang JM, Madoff S, Ferraro MJ. Isolation of presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 1996; 22(3):471–6. Epub 1996/03/01. PMID: [8852965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8852965/).
46. Rowbotham TJ. Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. *Lancet*. 1983; 2(8349):567. Epub 1983/09/03. PMID: [6136713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6136713/).
47. Rygg M, Bruun CF. Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a child. *Scand J Infect Dis*. 1992; 24(4):535–40. Epub 1992/01/01. PMID: [1411321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1411321/).
48. Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Gollner C, Karges W, et al. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol*. 2010; 10:269. Epub 2010/10/26. doi: [10.1186/1471-2180-10-269](https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-269) [pii]. PMID: [20969797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20969797/); PubMed Central PMCID: [PMC2984481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2984481/).
49. Greenwood JR, Harvey SM. *Streptobacillus moniliformis*. In: Dworkin M, Falkow M, Rosenberg SE, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria*. volume 7, Proteobacteria. New York, NY: Springer; 2006. p. 983–5.
50. Nolan M, Gronow S, Lapidus A, Ivanova N, Copeland A, Lucas S, et al. Complete genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901). *Stand Genomic Sci*. 2009; 1(3):300–7. Epub 2009/01/01. doi: [10.4056/signs.48727](https://doi.org/10.4056/signs.48727) PMID: [21304670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21304670/); PubMed Central PMCID: [PMC3035246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3035246/).
51. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2000. p. 102–31.
52. Boot R, Bakker RH, Thuis H, Veenema JL, De Hoog H. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus moniliformis* antibodies. *Lab Anim*. 1993; 27(4):350–7. Epub 1993/10/01. PMID: [8277708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8277708/).
53. Berger C, Altwegg M, Meyer A, Nadal D. Broad range polymerase chain reaction for diagnosis of rat-bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20(12):1181–2. Epub 2001/12/12. PMID: [11740332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11740332/).
54. Glasman PJ, Thuraisingam A. Rat bite fever: a misnomer? *BMJ Case Rep*. 2009; 2009. Epub 2009/01/01. doi: [10.1136/bcr.04.2009.1795](https://doi.org/10.1136/bcr.04.2009.1795) PMID: [22180758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180758/); PubMed Central PMCID: [PMC3029161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3029161/).
55. Nakagomi D, Deguchi N, Yagasaki A, Harada K, Shibagaki N, Kimura M, et al. Rat-bite fever identified by polymerase chain reaction detection of *Streptobacillus moniliformis* DNA. *J Dermatol*. 2008; 35(10):667–70. Epub 2008/11/20. doi: [10.1111/j.1346-8138.2008.00541.x](https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2008.00541.x) PMID: [19017047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19017047/).
56. Wallet F, Savage C, Loiez C, Renaux E, Pischedda P, Courcol RJ. Molecular diagnosis of arthritis due to *Streptobacillus moniliformis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47(4):623–4. Epub 2004/01/09. PMID: [14711486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14711486/).
57. Woo PC, Wong SS, Teng JL, Leung KW, Ngan AH, Zhao DQ, et al. *Leptotrichia hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural reservoir. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010; 11(6):391–401. Epub 2010/05/28. doi: [10.1631/jzus.B1000056](https://doi.org/10.1631/jzus.B1000056) PMID: [20506569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20506569/); PubMed Central PMCID: [PMC2880351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2880351/).
58. Conrads G, Claros MC, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam V, Goldstein EJ. 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002; 52(Pt 2):493–9. Epub 2002/04/05. PMID: [11931161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11931161/).

59. Sun D, Zhang H, Lv S, Wang H, Guo D. Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of other *Fusobacterium* species. *Res Vet Sci*. 2013; 95(1):27–33. Epub 2013/02/26. doi: [10.1016/j.rvsc.2013.01.016](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.016) PMID: [23433684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23433684/).
60. Kim HS, Lee DS, Chang YH, Kim MJ, Koh S, Kim J, et al. Application of *rpoB* and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(2):545–53. Epub 2009/12/04. doi: [10.1128/jcm.01631-09](https://doi.org/10.1128/jcm.01631-09) PMID: [19955278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19955278/); PubMed Central PMCID: [PMC2815611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2815611/).
61. Shah HN, Olsen I, Bernard K, Finegold SM, Gharbia S, Gupta RS. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. *Anaerobe*. 2009; 15(5):179–94. Epub 2009/08/22. doi: [10.1016/j.anaerobe.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.003) PMID: [19695337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19695337/).
62. Strauss J, White A, Ambrose C, McDonald J, Allen-Vercoe E. Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut. *Anaerobe*. 2008; 14(6):301–9. Epub 2008/12/31. doi: [10.1016/j.anaerobe.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.003) PMID: [19114111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114111/).
63. Jin J, Haga T, Shinjo T, Goto Y. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium varium* and *Fusobacterium nucleatum* based on *gyrB* gene sequences. *J Vet Med Sci*. 2004; 66(10):1243–5. Epub 2004/11/06. PMID: [15528856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15528856/).
64. Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Fillifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999; 49 Pt 4:1375–9. Epub 1999/11/11. PMID: [10555315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10555315/).
65. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR, Collins MD. Intrageneric relationships of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Int J Syst Bacteriol*. 1991; 41(3):347–54. Epub 1991/07/01. PMID: [1715737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1715737/).
66. Harmon-Smith M, Celia L, Chertkov O, Lapidus A, Copeland A, Glavina Del Rio T, et al. Complete genome sequence of *Sebalidella termitidis* type strain (NCTC 11300). *Stand Genomic Sci*. 2010; 2(2):220–7. Epub 2011/02/10. doi: [10.4056/signs.811799](https://doi.org/10.4056/signs.811799) PMID: [21304705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21304705/); PubMed Central PMCID: [PMCpmc3035275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMCpmc3035275/).
67. Schleifer KH, Stackebrandt E. Molecular systematics of prokaryotes. Annual review of microbiology. 1983; 37:143–87. doi: [10.1146/annurev.mi.37.100183.001043](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001043) PMID: [6416143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6416143/).
68. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37:463–4.
69. Wullenweber M, Hedrich HJ, Reetz IC. Susceptibility to streptobacillosis of mice is highly influenced by genetic factors. *AALAS Bulletin*. 1991; 30:43.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



Supporting Information

S1 Fig. Linear discriminant analysis (LDA) of 182 infrared spectra of 22 *Streptobacillus* isolates.

The wave numbers 550–1800 cm^{-1} and 2800–3200 cm^{-1} of second derivative spectra were selected and vector normalized. After a principal component analysis, the first 40 components were used for the LDA. In this LDA every isolate was defined as one group. Spectra of *Streptobacillus felis* are represented by diamonds, *Streptobacillus hongkongensis* by triangles, *Streptobacillus sp.* (AHL 370–1) by circles and *S. moniliformis* by dots. Note that LDA axis 1 and 3 are shown, because axis 3 contains the differences between *Streptobacillus sp.* (AHL 370–1) and *S. moniliformis*. (TIF)

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

S1 Table. Antimicrobial susceptibility testing of *Streptobacillus moniliformis* strains and of reference strains *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Sebadella termiitidis* NCTC 11300^T.

Strain no.	Strain	AZM	CIP	CLI	CMP	ERY	GEN	MER	NAL	STR	T/S	TEL	TET
1	DSM 12112 ^T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
		0.0625	=1	=0.25	=1	≤0.5	≤0.125	=0.25	=2	≤1	>8/152	≤0.125	≤0.125
2	CIP 55-48	S	S	S	S	I	I	S	R	I	R	S	S
		=0.25	=0.25	≤0.125	=4	=16	=4	≤0.0625	128	=8	>8/152	=4	=0.5
3	ATCC 27747	S	S	S	S	S	R	S	R	I	R	S	S
		=0.25	=1	≤0.125	=4	=4	=8	=1	=64	=16	>8/152	=2	=1
4	NCTC 10773	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
		=0.25	=0.5	≤0.125	=2	=2	=1	≤0.0625	=64	=2	>8/152	=1	≤0.125
5	NCTC 11194	S	I	S	S	I	I	S	R	I	R	S	S
		=1	=2	≤0.125	=4	=16	=4	≤0.0625	128	=8	>8/152	=4	=0.5
6	AHL 370-1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
		=0.25	=1	≤0.125	=1	≤0.5	≤0.125	≤0.0625	=16	=4	=8/152	=2	≤0.125
7	IPDH 144/80	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S
		=0.125	=1	≤0.125	=1	=2	=1	≤0.0625	=64	=8	>8/152	=0.5	≤0.125
8	CIP 81-99	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S
		=0.5	=1	≤0.125	=4	=4	=4	=0.25	=32	=8	>8/152	=2	=0.5
9	AHL 370-4	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
		=1	=1	≤0.125	≤0.5	≤0.5	=2	≤0.0625	=16	=8	>8/152	=1	=0.25
10	NCTC 11941	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
		≤0.0625	=1	≤0.125	=2	=8	=0.5	≤0.0625	=16	=2	=8/152	=0.25	≤0.125
11	IPDH 109/83	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
		=0.5	=1	≤0.125	=2	=8	=2	≤0.0625	=128	=2	>8/152	=2	=0.25
12	ATCC 49567	S	S	S	S	S	I	S	R	I	R	S	S
		=0.5	=1	≤0.125	=4	=4	=4	≤0.0625	=128	=8	>8/152	=2	=0.5

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

13	Kun 3 (RIVM)	S	=0.125	S	=0,5	S	≤0.125	S	=4	S	=2	S	=0,5	R	=32	I	=8	R	=8/152	S	=0,5	S	=0,25
14	ATCC 49940	S	=0,5	I	=2	S	≤0.125	I	=16	I	=4	S	=0,5	R	=64	I	=8	R	>8/152	S	=4	S	=0,5
15	B10/15	S	=0,5	S	=0,5	S	≤0.125	S	=4	S	=2	S	=0,5	I	=32	I	=8	R	>8/152	S	=0,5	S	=0,25
16	A378/1	S	=0,25	S	=0,5	S	≤0.125	S	=1	S	=1	S	≤0.0625	I	=32	S	=2	R	>8/152	S	=0,5	S	≤0.125
17	VA11257/2007	S	=0,25	S	=1	S	≤0.125	S	=2	S	=2	S	≤0.0625	I	=32	I	=16	R	>8/152	S	=2	S	=0,25
18	VK105/14	S	≤0.0625	S	=0,25	S	≤0.125	S	≤0,5	S	=1	S	≤0.0625	R	=64	R	=32	R	=8/152	S	≤0.125	S	=0,25
19	B5/1	S	=1	I	=2	S	≤0.125	S	=8	S	=2	S	≤0.0625	R	=64	I	=8	R	>8/152	S	=2	S	=0,5
20	Marseille	S	=2	S	=2	S	≤0.125	S	=4	S	=2	S	≤0.0625	S	=64	I	=8	R	>8/152	S	=2	S	=0,25
28	131000547 ^T	S	=0,125	S	=1	S	≤0.125	S	=4	S	=2	S	=0,25	R	=32	I	=4	R	>8/152	S	=2	S	=0,25
29	DSM 26322 ^T	S	≤0.0625	S	=0,5	S	≤0.125	S	≤0,5	S	≤0.125	S	≤0.0625	S	≤1	S	≤1	S	≤0.0625/1.1875	S	≤0.125	S	≤0.125
30	NCICT 11300 ^T	R	>8	R	>8	R	=8	R	=32	R	=64	S	=0,5	R	>128	R	>64	R	>8/152	R	>16	I	=8

Broth microdilution susceptibility testing was performed with the Merlin Micronaut system; results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) MIC criteria based on CLSI MIC interpretive standards for other non-*Enterobacteriaceae* and anaerobes [18].
 AZM: azithromycin, CIP: ciprofloxacin, CLI: clindamycin, CMP: chloramphenicol, ERY: erythromycin, GEN: gentamicin, MER: meropenem, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, T/S: trimethoprim/sulfamethoxazole, TEL: telithromycin, TET: tetracycline, R: resistant, I: intermediate susceptible, S: susceptible phenotype, MIC values in mg/L

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

S2 Table. Guanin/cytosin (G/C) contents of *Streptobacillus* spp. isolates and average nucleotide identity (ANI) of all strains under study to *S. moniliformis* type strain DSM 12112^T.

Strain designation	Species	G/C content (%)	ANI to DSM 12112 ^T (reciprocal)
DSM 12112 ^T	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.3	100 (100)
CIP 55-48	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	99.13 (98.90)
ATCC 27747	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	98.61 (98.92)
NCTC 10773	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	28.9	98.96 (98.21)
NCTC 11194	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	99.30 (98.59)
AHL 370-1	<i>Streptobacillus</i> sp.	26.1	88.43 (87.89)
IPDH 144/80	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	98.99 (99.15)
CIP 81-99	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.4	99.16 (99.39)
AHL 370-4	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.9	98.60 (99.23)
NCTC 11941	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.7	99.27 (98.33)
IPDH 109/83	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	99.00 (99.27)
ATCC 49567	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	99.00 (99.35)
Kun 3	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.9	98.69 (99.38)
ATCC 49940	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.9	98.93 (99.09)
B10/15	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.2	98.99 (99.21)
A378-1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.0	98.78 (99.19)
VA11257/2007	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	98.77 (98.77)
VK105/14	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.2	99.15 (99.41)
B5/1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.8	98.51 (98.99)
Marseille	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.1	99.15 (98.17)
IKC1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.0	99.21 (98.86)
IKC5	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.2	98.65 (98.92)
IKB1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	25.9	99.14 (99.07)
TSD4	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	26.0	98.90 (99.10)
OGS16	<i>Streptobacillus</i> sp.	25.9	89.10 (89.87)
KWG2	<i>Streptobacillus</i> sp.	26.4	88.21 (88.57)
KWG24	<i>Streptobacillus</i> sp.	26.3	88.25 (88.66)
131000547 ^T	<i>Streptobacillus felis</i>	26.4	82.00 (82.02)
DSM 26322 ^T	<i>Streptobacillus hongkongensis</i>	26.1	74.04 (75.03)
NCTC 11300 ^T	<i>Sebaldella termitidis</i>	33.4	67.45 (66.73)

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.4 Root sepsis associated with insect-dwelling *Sebaldella termitidis* in a lesser dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*)

Eisenberg, T.*, S. P. Glaeser, P. Kämpfer, N. Schauerte & C. Geiger

Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(6): 1373-1382.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in Antonie van Leeuwenhoek.
The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-015-0590-4>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript

1 **Root sepsis associated with insect-dwelling *Sebaldella termitidis* in a lesser dwarf lemur**
2 **(*Cheirogaleus medius*)**

3 Tobias Eisenberg^{1*}, Stefanie P. Glaeser², Peter Kämpfer², Nicole Schauerte³, Christina
4 Geiger³

5

6 Author affiliations:

7 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60, 35392
8 Giessen, Germany

9 ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, Heinrich-Buff-
10 Ring 26, 35392 Giessen, Germany

11 ³ Zoo Frankfurt, Bernhard-Grzimek-Allee 1, 60316 Frankfurt, Germany

12

13 * corresponding author, mailing address: Hessisches Landeslabor, Abteilung
14 Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ Haus 13, 35392 Giessen, Germany. Phone: 49-641-4800
15 5219. Fax: 49-641-4800 5268. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de.

16

17 **Acknowledgements**

18 The authors like to thank Karen Schlez, Ulrike Kling, Anna Mohr, Katharina Engel, Mersiha
19 Curić, Jens Heinbächer and Anna Baum for excellent support. Jörg Rau is acknowledged for
20 kindly providing the MALDI database entry for *S. termitidis* NCTC 11300^T. The Hessian
21 State Laboratory is supported by the Hessian Ministry for the Environment, Climate Change,
22 Agriculture and Consumer Protection.

23 Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

24 **Abstract**

25 **Introduction:** *Sebaldella termitidis* is a rare fastidious microorganism of the *Leptotrichiaceae*
26 family. A variety of closely related species is associated with severe and even life-threatening
27 disease in humans and animals like for instance *Streptobacillus moniliformis*, the etiological
28 organism of rat-bite fever as well as members of *Leptotrichia* spp. and *Sneathia*
29 *sanguinegens*, which have been reported from cases of septicaemia. Contrarily, since its
30 description some 50 years ago, *Sebaldella termitidis* has so far never been reported as a
31 vertebrate pathogen, nor has it been found aside from its natural termite host.

32 **Case presentation:** A lesser dwarf lemur was presented with unilateral facial inflammation
33 originating from rotten maxillary teeth and septic root abscess. Surgical intervention and root
34 extraction significantly improved the clinical course in that a pus-filled cavity underneath the
35 right eye could be drained, sampled and flushed. Bacteria displaying substantial
36 characteristics of *Sebaldella termitidis* were cultured from the sampled pus. Morphological
37 features observed included strictly anaerobic regular Gram-negative rods. Significant shared
38 biochemical properties included negative reactions for cytochrome oxidase, catalase, urease,
39 nitrate reduction and indole production. Furthermore, 16S rRNA gene sequencing revealed
40 99.9 % sequence homology to *Sebaldella termitidis* type strain NCTC 11300^T, from which it,
41 nevertheless, differed with respect to *rep* and RAPD profiles. An affiliation of the lemur
42 isolate described in this study with the type strain of *Sebaldella termitidis* as well as a clear
43 discrimination from other members of the *Leptotrichiaceae* could also be confirmed by
44 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry and Fourier
45 transform-infrared spectroscopy.

46 **Conclusion:** This is the first evidence for clinical disease caused by *Sebaldella termitidis* in a
47 vertebrate species indicating a broader host spectrum of this rarely encountered
48 microorganism.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

49 **Keywords:** *Sebaldella*; *termitidis*, lesser dwarf lemur, fat-tailed dwarf lemur, *Cheirogaleus*
50 *medius*, FT-IR, MALDI-TOF MS, *rep*, RAPD, root sepsis, dental disease

51 **Background**

52 The monotypic *Sebaldella* (*S.*) *termitidis* was in 1962 originally described as *Sphaerophorus*
53 *siccus* var. *termitidis* by Sebald. This is an obligately anaerobic Gram-negative bacterium
54 isolated from gut contents of the termite *Reticulitermes lucifugus* (Sebald 1962). The
55 organism was later reclassified as *Bacteroides termitidis* (Holdeman and Moore 1970) and
56 proposed as a monotypic species in a novel genus *Sebaldella* in 1986 (Collins and Shah 1986)
57 within the *Leptotrichiaceae* family together with the genera *Streptobacillus*, *Sneathia*, and
58 *Leptotrichia* (Gharbia and Edwards 2010). Whereas the closely related *Streptobacillus*
59 *moniliformis* has a long history as important human and animal pathogen responsible for rat
60 bite fever and Haverhill fever (Eisenberg et al. 2014; Eisenberg et al. 2015a) *Leptotrichia* spp.
61 and *Sneathia sanguinegens* are known members of the mucosal flora, that have repeatedly
62 been associated with human disease such as vaginitis, urethritis, pneumonia, endocarditis and
63 septicaemia (Marques da Silva et al. 2006; Hot et al. 2008; Kawanami et al. 2009; Harwich et
64 al. 2012; Lo 2012; Manhart et al. 2013). Contrarily, *S. termitidis* has – to our knowledge –
65 never been isolated from sources beside its insect host. This organism is able to degrade uric
66 acid to CO₂, acetate, and ammonia, and may play a role in providing nitrogen to the termite
67 host (Potrikus and Breznak 1980b; Potrikus and Breznak 1980a). It is non-motile and has rod-
68 shaped cells with central swellings that occur singly, in pairs, and in filaments. Surface
69 colonies are 1 to 2 mm in diameter, circular, and transparent to opaque. Acetic and lactic acids
70 are the major end products of glucose metabolism; formic acid may also be produced (Collins
71 and Shah 1986). We have isolated *S. termitidis* for the first time from a clinical sample
72 associated with a root sepsis in a frugivorous lesser dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*). The

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

73 present case description indicates a broader host spectrum of this rarely encountered
74 microorganism as a potential pathogen in a vertebrate.

75

76 **Methods**

77 **Case description**

78 *Cheirogaleus medius*, commonly known as “lesser dwarf lemur” or “western fat-tailed dwarf
79 lemur”, is a nocturnal primate species native to Malagasy. A breeding pair in a zoo was
80 housed in an enclosure of 9.4 m² (22 m³) with a dense setup of branches and vegetation as
81 well as several hiding places like a wooden box, several cork tubes and a cave in a tree. The
82 primarily frugivorous lemurs received a diet of 40 g mixed fruits and 5 g mixed vegetables
83 daily with mineral supplement added. They were fed insects like for instance meal beetle
84 (*Tenebrio molitor*), darkling beetle (*Zophobas morio*), wax moth larvae (*Galleria mellonella*)
85 and grasshoppers (*Locusta migratoria*) on a daily basis and received 2 g of minced cattle heart
86 twice a week. Occasionally, the animals captured free roaming cockroaches (*Blatta orientalis*)
87 in the terrarium. During the dry season (April to October) the amount of food is reduced and
88 the animals live on the fat reservoir in their tail. The 16-year old male lesser dwarf lemur
89 weighing only 185 grams was first presented at the zoo veterinary clinic with a swelling of the
90 right facial side involving nose and lower eye in January 2014. Inspection of the
91 approximately 2 cm³ measuring oral cavity revealed a broken and rotten right upper canine.
92 Clinical history involved removal of the tooth remnants and its root as well as antibiotic
93 treatment by oral application of 5 mg/kg enrofloxacin (Bayer, Leverkusen, Germany) on a
94 daily basis for ten days which significantly improved clinical symptoms during the next
95 weeks and the swelling disappeared. In February 2015, the male was again presented with a
96 facial swelling and a chronically ulcerated area below the eye on the right side. Because of the

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

97 previous history and the common involvement of tooth problems in insectivorous primates
98 (Meredith and Johnsons-Delaney 2010), the animal was examined under plain inhalation
99 anaesthesia (isoflurane, cp-pharma, Burgdorf, Germany). Exploration of the oral cavity
100 revealed an almost complete loss of dentation with teeth remnants solely at the gingival level
101 of the jaw. No signs of gingival inflammation or dysfunction could be detected. Attempts to
102 aspirate fluid from the facial swelling were unsuccessful. Empirical antibiotic treatment with
103 enrofloxacin was continued for seven days in a view of abscess formation. In March 2015, the
104 unilateral facial swelling on the right side had deteriorated (Figure 1) and pus could be
105 aspirated from a cavity underneath the ulcerated skin below the right eye and a swab sample
106 was taken for bacteriology. Animal husbandry fulfilled ethical standard guidelines according
107 to the code of ethics and animal welfare of the world association of zoos and aquariums
108 (WAZA;
109 http://www.waza.org/files/webcontent/1.public_site/5.conservation/code_of_ethics_and_animal_welfare/Code%20of%20Ethics_EN.pdf).

111

112 **Bacteria isolation**

113 *Sebaldella termitidis* was isolated during routine bacteriological investigations following
114 swabbing of the pus-filled inflamed root area. Briefly, the swab sample was directly
115 inoculated onto culture media. Agar plates were incubated for up to 48 hours at 30 °C
116 (Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and gentamicin) and 37 °C using aerobic
117 (Columbia agar with 5 % sheep blood [SBA] and Gassner agar), capnophilic (SBA and
118 chocolate agar) and anaerobic conditions (Schaedler agar with and without kanamycin and
119 vancomycin), respectively. All agar plates were purchased from Oxoid, Wesel, Germany.

120

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

121 **Phenotypic characterization**

122 Phenotypic characterization was performed by standard microbiological procedures:
123 Haemolytic properties of the bacteria were examined on SBA, microscopic examinations of
124 fixed smears were performed using Gram staining. Bacterial colonies were tested for catalase
125 activity with 3 % H₂O₂ on microscopic slides. The isolate of *S. termitidis* as well as the
126 concomitant flora were subjected to standardized test systems, i.e. Vitek2-compact with
127 respective card systems for Gram-negative bacteria (GN), anaerobes (ANC) and yeasts (YST;
128 bioMérieux, Nürtingen, Germany). All tests were performed according to the manufacturer's
129 instructions. *Sebaldella termitidis* (NCTC 11300^T) as well as *Streptobacillus moniliformis*
130 (DSM 12112^T), *Streptobacillus hongkongensis* (DSM 26322^T) and *Streptobacillus felis*
131 (131000547^T) were used as reference strains for comparison.

132

133 **Antimicrobial susceptibility testing**

134 Antimicrobial drug susceptibility testing was carried out using the broth microdilution
135 susceptibility testing with a commercial system (Merlin Micronaut) according to the
136 instructions of the manufacturer. The test design (Merlin according to AVID [Arbeitskreis
137 Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik of the German Veterinary Society] guidelines)
138 contained the following 19 antimicrobial substances for minimum inhibitory concentration
139 (MIC) testing: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, apramycin, cefquinome, ceftiofur,
140 clindamycin, colistin, cephalothin, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, gentamicin,
141 neomycin, penicillin G, spectinomycin, trimethoprim/ sulfamethoxazol, tetracycline, tiamulin,
142 and tilmicosin. Susceptibility was determined by assessing MIC interpretative standards for
143 anaerobes (in human infections) for amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, clindamycin,
144 penicillin G and tetracycline according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

145 criteria for broth microdilution susceptibility testing (Anonym 2015). In default of clinical
146 veterinary breakpoints only MIC values are reported for the remaining antimicrobial agents.

147

148 **Identification by MALDI-TOF MS**

149 Isolates were selected from the SBA culture plates and then subjected to steel-targets
150 according to the manufacturer's instructions (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen,
151 Germany). Isolates were prepared using the direct transfer (DT) method and analyzed by
152 MALDI-TOF MS using Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 5627,
153 BrukerDaltonics) was supplemented with spectra from one isolate each from *S. termitidis*
154 NCTC 11300^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis*
155 DSM 26322^T and *Streptobacillus felis* 131000547^T (Eisenberg et al. 2015b). Respective
156 database entries (main spectra peaks [msp]) were derived from isolate preparations according
157 to an extraction protocol (ethanol/ formic acid) provided by the manufacturer.

158

159 **Cluster analysis of infrared spectra of isolates obtained by FT-IR**

160 All bacterial isolates were cultivated independently in 5-7 replicates at 37 °C for 72 h on
161 SBA. Harvesting of cells, preparation of bacteria films on zinc selenide plates, drying and
162 handling were performed as described previously (Kuhm et al. 2009). The dried bacteria films
163 were used directly for examination by FT-IR spectroscopy. Infrared spectra were recorded for
164 each sample in a transmission mode from 500 to 4000 cm⁻¹ with an FT-IR spectrometer
165 (Tensor27 with HTS-XT-module, BrukerOptics, Ettlingen, Germany). Acquisition and first
166 analysis of data were carried out using OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics). IR spectra
167 from the *S. termitidis* isolate from this study as well as from reference strains from *S.*
168 *termitidis* and *Streptobacillus* spp. were compared by cluster analysis (cf. (Helm et al. 1991;

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

169 Rau et al. 2009)), a comparative method based on species or even strain specific spectral
170 differences in their patterns of biomolecules. For cluster analysis, the second derivation of the
171 vector normalized spectra in the wave number range of 500-1400 cm⁻¹ and 2800-3000 cm⁻¹
172 were used for calculation with Ward's algorithm (OPUS 4.2; (Ward 1963)). The dendrogram
173 obtained depicts the arrangement of isolates in groups according to their spectral differences.

174

175 **16S rRNA gene analysis**

176 Amplifications of nearly full-length 16S rRNA gene sequences were carried out using primer
177 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-
178 ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane 1991) using a cell lysate generated by three freeze
179 (-20°C) and thawing cycle (100°C, 1 min) as DNA template. PCR purification and Sanger
180 sequencing with primer 27F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and E786F (5'-
181 GATTAGATACCCTGGTAG-3') (Coloqhoun 1997) were performed at LGC Genomics,
182 Berlin, Germany. The DNA sequence was manually processed in MEGA 5 (Tamura et al. 2011)
183 based on the electropherograms.

184 The phylogenetic tree was reconstructed with the maximum-likelihood method using RAXML
185 version 7.2.8 (Stamatakis 2014) with GTRGAMMA and rapid bootstrap analysis and based on
186 bootstrap analysis with 100 replications using Geneious software (Biomatters, vers. 8.1.6)
187 (Kearse et al. 2012).

188

189 **Genomic fingerprint analysis**

190 Comparative genomic fingerprint analysis of the isolate and the type strain of *S. termitidis* was
191 performed with three different randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCRs and

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

192 two repetitive element primed (*rep*)-PCRs, BOX- and (GTG)₅-PCR. The three RAPD-PCRs
193 were either performed with primer A (5'-CTGGCGGCTTG-3'), B (5'-ATCTGGCAGC-3') or
194 C (5'-GGTCAGTAGC-3') (Ziemke et al. 1997); BOX- and (GTG)₅-PCR with primer
195 BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') and (GTG)₅ (5'-
196 GTGGTGGTGGTGGTG-3'), respectively (Versalovic et al. 1994). PCR amplifications and
197 subsequent analysis were performed as described previously in detail by Glaeser et al. (2013).

198

199 **Results**

200 **Treatment**

201 On the basis of the worse state of dentation in this aged individual palliative dental treatment
202 was given an option to maintain nutrition and improve the surrounding inflammation. To
203 prevent further spread of microorganisms from a septic process into the underlying tissue and
204 to gain access on the respective structures underneath the gingiva niveau, the remaining root
205 of the left canine was also extracted.

206 After sampling the animal was treated by local flushing of the skin ulceration with
207 chlorhexidine solution and oral application of 5 mg/kg enrofloxacin daily. This antibiotic
208 turned out to be ineffective after receiving the susceptibility testing and was discontinued but
209 surgical treatment almost immediately improved the clinical state as the swelling vanished
210 quickly over the next days. Since then, the lemur is still living in good body condition and no
211 further deterioration has been noticed.

212

213 **Bacterial isolates**

214 *Sebaldella termitidis* and a yeast species were growing in moderate and low numbers from the
215 swab sample, respectively. The *S. termitidis* isolate grew after 24 hours on SBA as whitish,

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

216 tiny colonies, approximately 0.2-0.3 mm in diameter. No growth was observed on Gassner
217 agar. After prolonged incubation for an additional 24 hours the regular, moist colonies
218 reached a size of 1-2 mm in diameter without any form of haemolysis. Gram staining revealed
219 regular Gram-negative bacilli.

220

221 **Biochemical studies**

222 The conventional biochemical tests revealed corresponding results for isolate 151002920 and
223 *S. termitidis* NCTC 11300^T for the following reactions: oxidative and fermentative glucose
224 metabolism, β -glucosidase and acidification of glucose, lactose, sucrose, trehalose, raffinose,
225 mannose, sorbitol, inositol and mannitol (all positive); motility, catalase, cytochrome oxidase,
226 Voges Proskauer (acetoin), α -galactosidase, β -galactosidase, hippurat hydrolysis, malonate,
227 urease, citrate, H₂S and indole production, urea hydrolysis and nitrate reduction (all negative).
228 Using Vitek2-compact isolate 151002920 and *S. termitidis* NCTC 11300^T were identified as
229 *Clostridium ramosum* (85-86 % confidence; bio profile no. 4017710130110, 5017710130110)
230 with the ANC card (for anaerobes and corynebacteria) and as unidentified
231 organism/*Aggregatibacter segnis* (bio profile no. 0504630012, 0504630052) with the NHI
232 card (for microaerobically growing bacteria). Differing results included D-galactose (ANC)
233 and phosphatase (NHI) both with positive reactions for the type strain but not for 151002920.
234 The yeast was identified as *Candida freyschussii* (94 % confidence; bio profile no.
235 4455550275347311) with the YST card.

236

237 **Antimicrobial susceptibility testing**

238 Isolate 151002920 as well as the type strain of *S. termitidis* were *in vitro* susceptible
239 (according to CLSI MIC interpretative standards for anaerobes in human infections; MIC in

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

240 brackets in µg/ml) to amoxicillin/clavulanic acid (2/1-4/2) and tetracycline (≤ 1) or
241 intermediate susceptible to clindamycin (1). A resistant phenotype was recorded for penicillin
242 G (>16) and ampicillin (16- >32). The remaining antimicrobial agents displayed MIC as
243 follows: colistin (≤ 0.5), florfenicol (≤ 1), trimethoprim/sulfamethoxazol (0.25/4.75),
244 apramycin (>32), cefquinome (>8), cephalothin (>32), enrofloxacin (≥ 2), erythromycin (>8),
245 neomycin (>32), tiamulin (>32), tilmicosin (>32), ceftiofur (4-8), gentamicin (8-16) and
246 spectinomycin (32-64).

247

248 **Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-** 249 **TOF MS)**

250 Using MALDI-TOF MS and the BioTyper database the isolate from this study was identified
251 to the species level as *S. termitidis* with a score level of 2.269, using the DT method in sample
252 preparation. The *S. termitidis* NCTC 11300^T formed the basis for this comparison after
253 respective msp had been manually added to the BioTyper database.

254

255 **Fourier Transformation-Infrared Spectroscopy (FT-IR)**

256 The comparison of the infrared (IR)-spectra of *S. termitidis* from this study with a collection
257 of reference strains showed a clear separation in two main branches for the genera *Sebaldella*
258 and *Streptobacillus*, including the type species of *S. termitidis*, *Streptobacillus moniliformis*,
259 *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis* (Figure 2). Inside the *Sebaldella*
260 branch the isolate from the lesser dwarf lemur clustered compactly together with *S. termitidis*
261 NCTC 11300^T.

262

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

263 **16S rRNA gene analysis**

264 Sequencing of the nearly full-length 16S rRNA gene yielded a sequence length of 1455 bp.
265 Sequence analysis was carried out by EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>) (Chun et al. 2007)
266 and revealed 99.9 % sequence identity to *S. termitidis* ATCC 33386^T (=NCTC 11300^T)
267 (CP001739). Figure 3 depicts a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences of
268 isolate 151002920 from a lesser dwarf lemur within the family *Leptotrichiaceae*.

269

270 **Genomic fingerprinting**

271 Comparison of isolate 151002920 and *S. termitidis* ATCC 33386^T by three RAPD-PCRs and
272 two *rep*-PCRs, BOX- and GTG₅-PCR, clearly showed different genomic fingerprint pattern of
273 the two strains indicating their genetic distinction (Figure 4).

274

275 **Accession and strain numbers**

276 The partial 16S rRNA sequence of isolate 151002920 has been submitted to the GenBank
277 database under accession no. KR150994. Isolate 151002920 has been stored as DSM 100379
278 in the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM, Braunschweig,
279 Germany).

280

281 **Discussion**

282 The etiology of tooth problems in prosimian species of the suborder Strepsirrhini is diverse,
283 but disease in teeth and adjacent anatomical structures is relatively frequently observed in
284 captivity (Sutherland-Smith and Stalis 2001; Plesker and Schulze 2013). During necropsies in
285 25 slender lorises the authors found missing or loose teeth, teeth severely affected by dental

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

286 calculus, severe periodontal disease and purulent/gangrenous inflammation next to the teeth in
287 seven adult individuals (Plesker and Schulze 2013). The other study summarizes dental
288 disease in 14 slow and pygmy lorises. The etiopathology and/or predisposing factors are
289 caries induction by sugar-rich diets, mucosal trauma by spiny (insect) food items,
290 automutilation and technopathy, genetic factors as well as viral and bacterial infection
291 following stress and immune suppression (Plesker and Schulze 2013). Our group has
292 previously encountered bacterial cellulitis following a loose molar tooth also in a slender loris
293 (Eisenberg et al. 2012). This case was characterized by a single infectious strain of
294 *Trueperella pyogenes* in the same group of animals repeatedly causing dental problems in
295 different cage mates (Eisenberg, unpublished data). As determined for wild populations, there
296 exists, moreover, a correlation between dental impairment and – with respect to quality and
297 quantity – potentially less efficient utilization of foods (Millette et al. 2012).

298 The here described case report attracts special interest primarily by the isolation of *S.*
299 *termitidis*, a very rarely encountered microorganism (Harmon-Smith et al. 2010). Whereas
300 yeasts are regularly isolated from mouth flora samples, the finding of *S. termitidis* has never
301 been reported in a vertebrate, nor has it been found to be associated with a pathological
302 process. The role of *S. termitidis* as the dominant flora in this case was confirmed by its pure
303 and intense growth. However, it remains a little clouded, whether further, very slowly
304 growing anaerobes could have been found by extending the incubation period. Interestingly,
305 *S. termitidis* is an obligatory anaerobic Gram-negative bacterium that can be found in
306 moderate densities up to 0.67×10^4 bacteria per termite intestine (Potrikus and Breznak
307 1980b). Furthermore, uncultured clones with identical 16S rRNA sequence have been
308 detected in the digestive tracts of ground beetles (*Poecilus chalcites*) (Lehman et al. 2009),
309 red palm weevils (*Rhynchophorus ferrugineus*) (Jia et al. 2013), chironomid egg masses
310 (Senderovich and Halpern 2012) and in anaerobic digesters that treat wastewater sludge in
311 France and Brazil (Riviere et al. 2009; Cardinali-Rezende et al. 2013). The occasional insect

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

312 diet of the lesser dwarf lemurs from this case suggests a probable route of infection, unless
313 this could not be proven. Despite testing all feeder insect items for the presence of *S.*
314 *termitidis* no further proofs of this microorganism could be obtained. Furthermore, no termite
315 species live in the surrounding of the lemurs suggesting that *S. termitidis* may occupy another,
316 yet unidentified ecological niche.

317 From the diagnostic point of view species determination of *S. termitidis* by biochemistry alone
318 can be insufficient, because the variability of this microorganism is poorly understood and only
319 a single strain has been stored to date (Harmon-Smith et al. 2010). Furthermore it has not yet
320 been included in any commercial biochemical test system. Nevertheless, the isolate from this
321 study was highly similar to biochemical and antimicrobial properties of the type strain. We
322 could successfully identify *S. termitidis* by MALDI-TOF MS, because previous user specific
323 demands necessitated manual adding of respective reference spectra to the MALDI database. In
324 addition, we demonstrate that FT-IR can also clearly identify *S. termitidis* at species level,
325 showing a sufficiently high degree of spectral diversity to closely related bacterial species under
326 study. However, sequencing of the nearly full-length 16S rRNA gene showed 99.9 % homology
327 to the type strain, thus also supporting species identification in the here described isolate.
328 However, genetic fingerprinting using different RAPD- and *rep*-PCR techniques clearly showed
329 a different banding pattern between the isolate from this study and the type strain, thereby
330 proving the suitability for typing strains of this species. Fuelled by the idea to unravel the source
331 of infection by comparison with potential other isolates of this microorganism and since
332 virtually nothing is known about clonality and distribution of certain *Sebaldella* lineages these
333 data might enable future research to answer epidemiological questions in prospective isolations.

334

335 **Conclusion**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

336 The finding of *S. termitidis* in a clinical sample from a lemur significantly extends the known
337 ecological niche and host range of this rare fastidious microorganism. Future studies will
338 hopefully enlighten its role outside the termite host as well as a potential vertebrate pathogen.

339

340 **List of abbreviations**

341 *S.*: *Sebaldella*; MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
342 mass spectrometry; FT-IR: Fourier-transform infrared-spectroscopy; ANC: corynebacteria
343 and anaerobes; GN: Gram-negative bacteria; MIC: minimum inhibitory concentration; IR:
344 infrared; DSM: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; NCTC: National
345 Collection of Type Cultures; AVID: Arbeitskreis Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik;
346 MIC: minimal inhibitory concentration; CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

347

348 **Authors' contributions**

349 TE conceived the study, carried out diagnostics and experiments. SPG and PK performed *rep*-
350 and RAPD-PCR, NS and CG were in charge of animal care, sample acquisition and therapy. TE
351 wrote the manuscript and all the authors read and approved the final manuscript.

352

353 **Ethical approval:** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the
354 care and use of animals were followed.

355

356 **References:**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 357 Anonym (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th
358 informational supplement CLSI document M100-S25
- 359 Cardinali-Rezende J, Araujo JC, Almeida PG, Chernicharo CA, Sanz JL, Chartone-Souza E,
360 Nascimento AM (2013) Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape
361 prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor
362 treating domestic wastewater Antonie van Leeuwenhoek 104:993-1003
363 doi:10.1007/s10482-013-0018-y
- 364 Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW (2007) EzTaxon: a web-based
365 tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences
366 Int J Syst Evol Microbiol 57:2259-2261 doi:10.1099/ijs.0.64915-0
- 367 Collins MD, Shah HN (1986) Reclassification of *Bacteroides termitidis* Sebald (Holdeman
368 and Moore) in a new genus *Sebaldella*, as *Sebaldella termitidis* comb. nov. Int J Syst
369 Bacteriol 36:349-350
- 370 Coloqhoun JA (1997) Discovery of deep-sea Actinomycetes. . University of Kent
- 371 Eisenberg T, Glaeser S, Nicklas W, Mauder N, Contzen M, Aledelbi K, Kämpfer P (2015a)
372 *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia Int J Syst Evol
373 Microbiol doi:10.1099/ijs.0.000238
- 374 Eisenberg T et al. (2012) *Trueperella pyogenes* as cause of a facial abscess in a grey slender
375 loris (*Loris lydekkerianus nordicus*) - a case report Berl Münch Tierärztl Wochenschr
376 125:407-410
- 377 Eisenberg T, Nesseler A, Nicklas W, Spamer V, Seeger H, Zschöck M (2014) *Streptobacillus*
378 sp. isolated from a cat with pneumonia J Clin Microbiol Case Reports 2014:1-7
379 doi:10.1099/jmmcr.0.000562
- 380 Eisenberg T et al. (2015b) Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus
381 *Streptobacillus* PLoS One 10:e0134312 doi:10.1371/journal.pone.0134312

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 382 Gharbia SE, Edwards KJ (2010). In: Krieg NR et al. (eds) *Bergey's Manual of Systematic*
383 *Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes),*
384 *Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes,*
385 *Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, vol Four. 2nd edn.*
386 *University of Georgia, Athens, GA,*
- 387 Glaeser SP, Galatis H, Martin K, Kampfer P (2013) *Niabella hirudinis* and *Niabella drilacis*
388 sp. nov., isolated from the medicinal leech *Hirudo verbana* *Int J Syst Evol Microbiol*
389 63:3487-3493 doi:10.1099/ijss.0.050823-0
- 390 Harmon-Smith M et al. (2010) Complete genome sequence of *Sebaldella termitidis* type strain
391 (NCTC 11300) *Stand Genomic Sci* 2:220-227 doi:10.4056/sigs.811799
- 392 Harwich MD, Jr., Serrano MG, Fettweis JM, Alves JM, Reimers MA, Buck GA, Jefferson
393 KK (2012) Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov
394 *BMC Genomics* 13 Suppl 8:S4 doi:10.1186/1471-2164-13-s8-s4
- 395 Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D (1991) Classification and identification of
396 bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy *J Gen Microbiol* 137:69-79
- 397 Holdeman LV, Moore WEC (1970) *Bacteroides*. In: Cato EP, Cummins CS, Holdeman LV,
398 Johnson JL, Moore WEC, Smibert RM, Smith LDS (eds) *Outline of clinical methods*
399 *in anaerobic bacteriology. 2nd revision edn. Virginia Polytechnic Institute Anaerobe*
400 *Laboratory, Blacksburg, Virginia, pp 33-44*
- 401 Hot A, Coppere B, Ninet J, Thiebault A (2008) Lemierre syndrome caused by *Leptotrichia*
402 *buccalis* in a neutropenic patient *Int J Infect Dis* 12:339-340
403 doi:10.1016/j.ijid.2007.08.009
- 404 Jia S et al. (2013) Seasonally variable intestinal metagenomes of the red palm weevil
405 (*Rhynchophorus ferrugineus*) *Environmental microbiology* 15:3020-3029
406 doi:10.1111/1462-2920.12262

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 407 Kawanami T, Fukuda K, Yatera K, Kido T, Yoshii C, Taniguchi H, Kido M (2009) Severe
408 pneumonia with *Leptotrichia* sp. detected predominantly in bronchoalveolar lavage
409 fluid by use of 16S rRNA gene sequencing analysis J Clin Microbiol 47:496-498
410 doi:10.1128/jcm.01429-08
- 411 Kearsse M et al. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software
412 platform for the organization and analysis of sequence data Bioinformatics 28:1647-
413 1649 doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- 414 Kuhm AE, Suter D, Felleisen R, Rau J (2009) Identification of *Yersinia enterocolitica* at the
415 species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy Appl
416 Environ Microbiol 75:5809-5813 doi:10.1128/AEM.00206-09
- 417 Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic
418 acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester,
- 419 Lehman RM, Lundgren JG, Petzke LM (2009) Bacterial communities associated with the
420 digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their
421 modification by laboratory rearing and antibiotic treatment Microbial ecology 57:349-
422 358 doi:10.1007/s00248-008-9415-6
- 423 Lo TS (2012) A cavitary pneumonia caused by *Leptotrichia* species in an immunocompetent
424 patient Infect Dis Rep 4:e24 doi:10.4081/idr.2012.e24
- 425 Manhart LE et al. (2013) Bacterial vaginosis-associated bacteria in men: association of
426 *Leptotrichia/Sneathia* spp. with nongonococcal urethritis Sex Transm Dis 40:944-949
427 doi:10.1097/olq.0000000000000054
- 428 Marques da Silva R et al. (2006) Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S
429 ribosomal RNA gene analysis J Vasc Surg 44:1055-1060
430 doi:10.1016/j.jvs.2006.07.021
- 431 Meredith A, Johnsons-Delaney C (2010) BSAVA Manual of Exotic Pets. 5th edn. Wiley,
432 New York

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 433 Millette JB, Sauther ML, Cuozzo FP, Ness JL (2012) The impact of dental impairment on
434 ring-tailed lemur food processing performance *Am J Phys Anthropol* 148:238-248
435 doi:10.1002/ajpa.21571
- 436 Plesker R, Schulze H (2013) Dental disease in slender lorises (*Loris tardigradus*) *Zoo biology*
437 32:571-574 doi:10.1002/zoo.21072
- 438 Potrikus CJ, Breznak JA (1980a) Anaerobic degradation of uric acid by gut bacteria of
439 termites *Appl Environ Microbiol* 40:125-132
- 440 Potrikus CJ, Breznak JA (1980b) Uric acid-degrading bacteria in guts of termites
441 [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)] *Appl Environ Microbiol* 40:117-124
- 442 Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M (2009) Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus*
443 strains from food - differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR,
444 and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates [in German] *Berl*
445 *Münch Tierärztl Wochenschr* 122:25-36
- 446 Riviere D et al. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in
447 anaerobic digestion of sludge *ISME J* 3:700-714 doi:10.1038/ismej.2009.2
- 448 Sebald M (1962) Etude sur les bacteries anaerobies gram-negatives asporulees. Theses de
449 L'universite Paris, Imprimerie Barneoud S. A. Laval, France
- 450 Senderovich Y, Halpern M (2012) Bacterial community composition associated with
451 chironomid egg masses *Journal of insect science (Online)* 12:149
452 doi:10.1673/031.012.14901
- 453 Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of
454 large phylogenies *Bioinformatics* 30:1312-1313 doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- 455 Sutherland-Smith M, Stalis I (2001) Health-review of loris clinical information and pathology
456 data from the San Diego zoo: 1982-1995 In: *Management of lorises in captivity: a*
457 *husbandry manual for Asian lorises (*Nycticebus* & *Loris* spp.). CRES Zool Soc San*
458 *Diego, San Diego, pp 60-70*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 459 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular
460 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and
461 maximum parsimony methods Mol Biol Evol 28:2731-2739
462 doi:10.1093/molbev/msr121
- 463 Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria
464 using repetitive sequence-based polymerase chain reaction Methods Mol Cell Biol
465 5:25-40
- 466 Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function J Amer Statist Assoc
467 58:236-244
- 468 Ziemke F, Brettar I, Höfle MG (1997) Stability and diversity of the genetic structure of a
469 *Shewanella putrefaciens* population in the water column of the central Baltic Aquat
470 Microb Ecol 13:63-74

471

472 Figure Captions:

473 Figure 1: Massively swollen head of a lesser dwarf lemur from this study upon initial
474 presentation.

475 Figure 2: Cluster analysis of respective spectra obtained by Fourier-transform infrared-
476 spectroscopy (FT-IR) using OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics). In each case mean IR-
477 spectra from three experiments of each isolate of *Sebaldella termitidis* 151002920 from a
478 lesser dwarf lemur and the type strain and a selection of several *Streptobacillus* spp. strains
479 were used for calculation with Ward's algorithm. The dendrogram obtained depicts the
480 arrangement of isolates in groups according to their spectral differences after vector
481 normalisation.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

482 Figure 3: Maximum-Likelihood consensus tree nucleotide alignment based on 16S rRNA
483 gene sequences showing the phylogenetic position of isolate *Sebaldella termitidis* 151002920
484 from a lesser dwarf lemur within the family *Leptotrichiaceae*. The tree was generated in
485 Geneious (Biomatters; version 8.1.6) (Kearse et al. 2012) using RAxML version 7.2.8
486 (Stamatakis 2014) with GTRGAMMA and rapid bootstrap analysis (100 replications;
487 bootstrap values >80 %). GenBank accession numbers are given in parentheses.

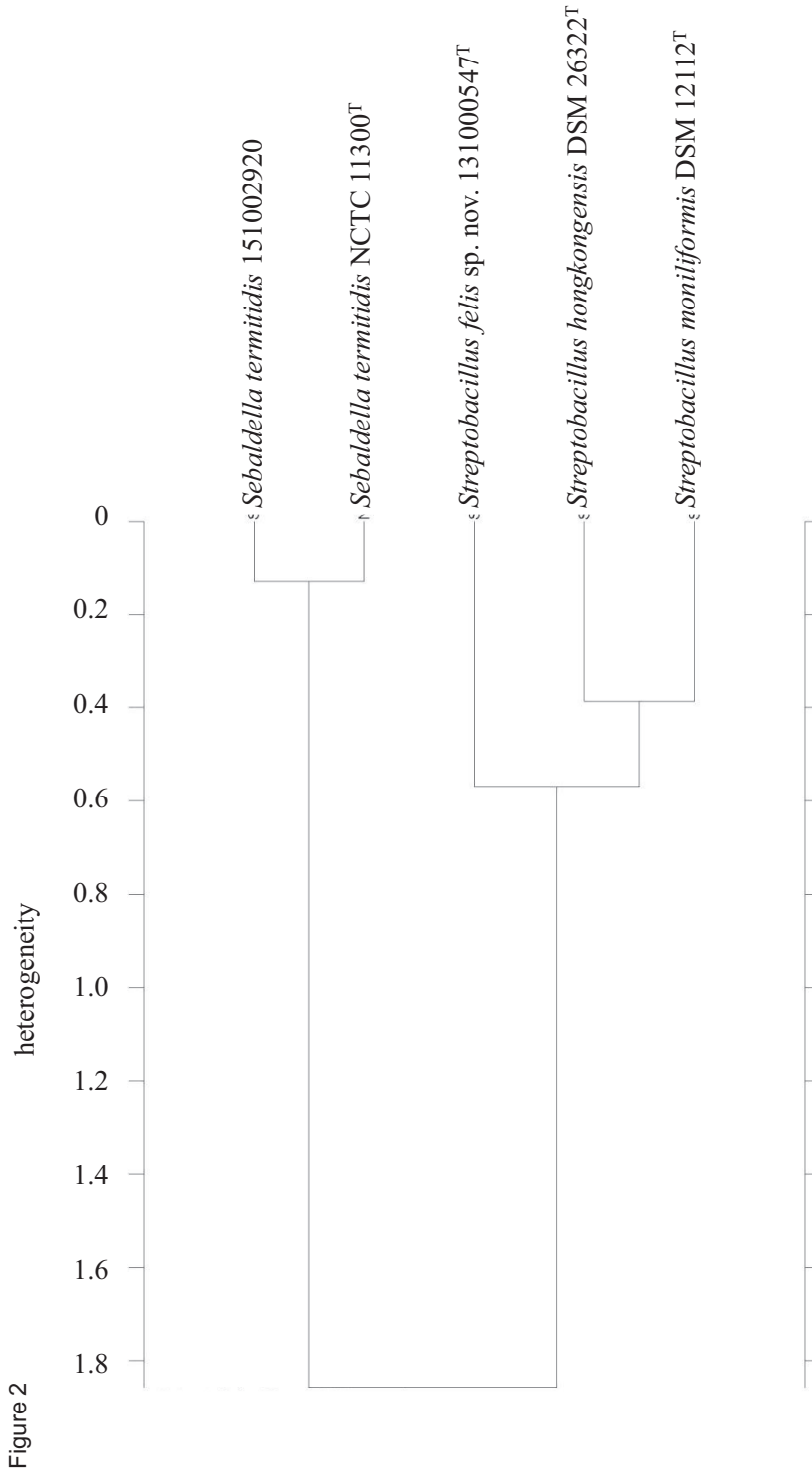
488 Figure 4: Differentiation of *Sebaldella termitidis* 151002920 from *Sebaldella termitidis*
489 ATCC 33386^T by genomic fingerprint analysis using three RAPD-PCRs performed with
490 Primer A, B, C (RAPD-A, B, C) and two *rep*-PCRs, BOX-PCR and (GTG)₅ PCR. The figure
491 shows fingerprint pattern dissolved on 1.7 % agarose gel stained with ethidium bromide. 1:
492 *Sebaldella termitidis* 151002920, 2: *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T. Each analysis was
493 performed in two independent replicates. M: 100 bp DNA ladder (ThermoScientific, formerly
494 Fermentas).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



Figure 1

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Figure 3

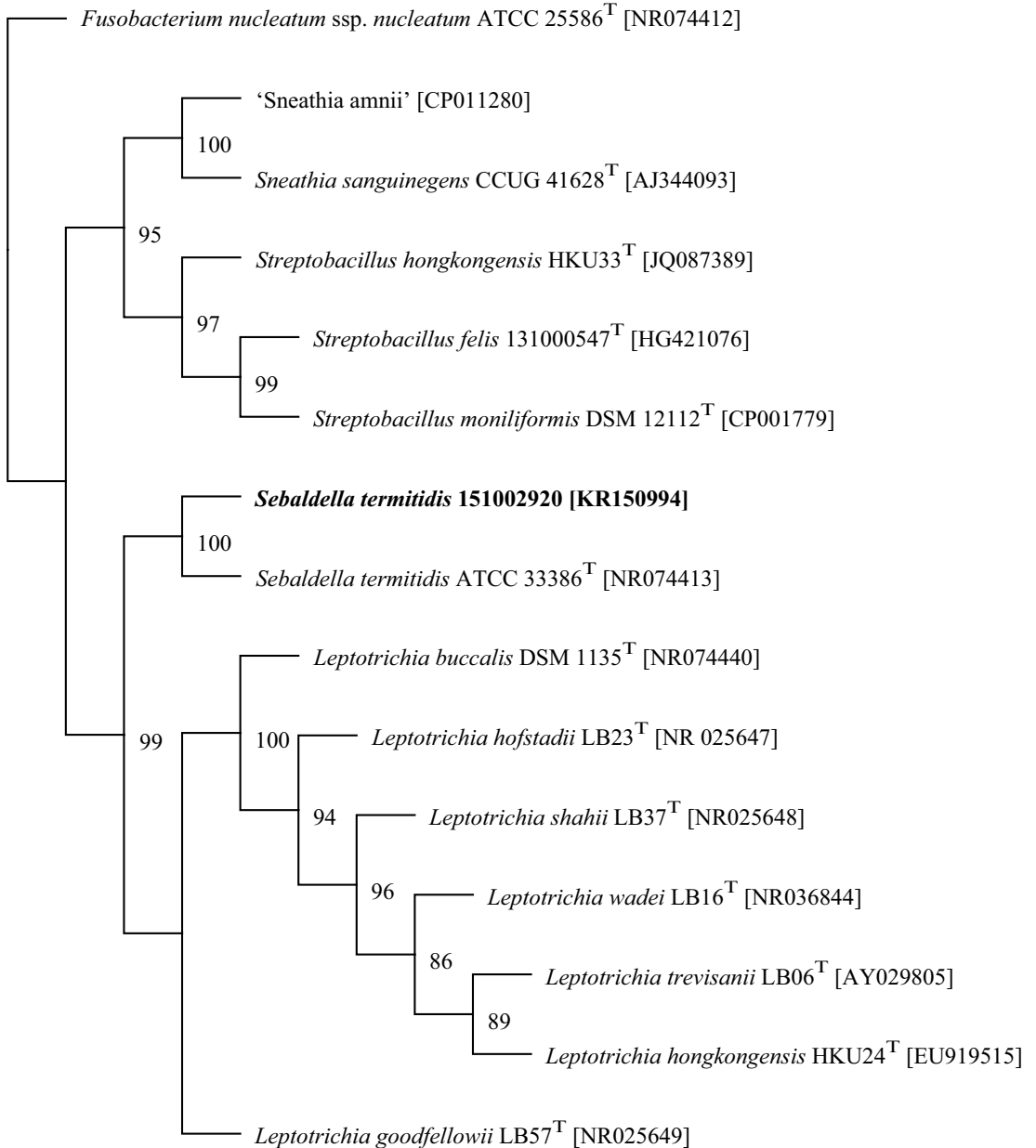
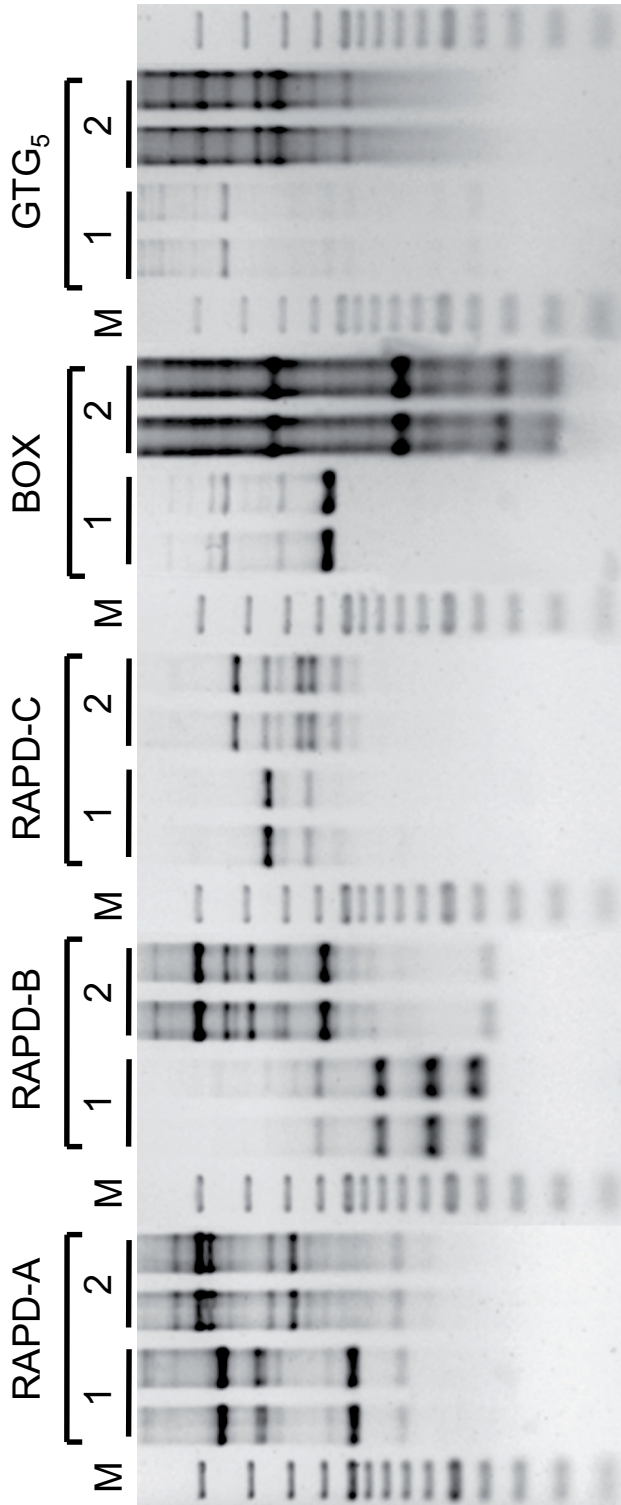


Figure 4



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 6.5 *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis* THOMAS, 1922), and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI *et al.* 1925, EISENBERG *et al.* 2015 emend.

Eisenberg, T.*, S. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, W. Nicklas, J. Rau, N. Mauder, N. Hofmann, K. Imaoka, M. Kimura & P. Kämpfer

Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65(12): 4823-4829.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000654>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript Including References (Word document)

1 *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse
2 (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al.
3 1925, Eisenberg et al. 2015 emend.

4
5 Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵,
6 Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and
7 Peter Kämpfer²

8
9 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany

10 ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392
11 Giessen, Germany

12 ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen,
13 D-35392 Giessen, Germany

14 ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany

15 ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany

16 ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany

17 ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany

18 ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640,
19 Tokyo, Japan

20

21 **Corresponding author:**

22 Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ H13; D-
23 35392 Giessen, Germany, Phone: +49 641 4800 5219; Fax: +49 641 4800 5268. Dr. Tobias
24 Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

25

26 **Running title:** Description of *Streptobacillus notomytis* sp. nov.

27 **Content category:** New Taxa

28 **Subsection:** Other Bacteria/ Fusobacteriia

29 **Keywords:** *Streptobacillus*, *notomytis*, Fusobacteriales, novel, Australian spinifex hopping
30 mouse, *Notomys alexis*

31

32 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL*, and *recA*
33 gene sequences as well as for the complete genome sequence of strain AHL 370-1^T are
34 KR001919, KR001957, KR001938, and KR001976 as well as LJR000000000 (BioSample

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

35 SAMN04038436), respectively. Other gene sequences generated within this study are
36 summarized in Table S1.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

37 SUMMARY

38 A pleomorphic, Gram-negative, rod-shaped, indole-, oxidase- and catalase-
39 negative, non-spore-forming, non-motile bacterium was 1979 originally isolated from
40 the heart of an Australian spinifex hopping mouse with septicaemia and stored as
41 *Streptobacillus moniliformis* in the strain collections of Animal Health Laboratory, South
42 Perth, Western Australia (AHL 370-1) as well as under CCUG 12425. On the basis of
43 16S rRNA gene sequence analyses the strain was assigned to the genus *Streptobacillus*
44 with 99.4% sequence similarity to *Streptobacillus moniliformis*, 95.6% sequence
45 similarity to *Streptobacillus hongkongensis* and 99.0% sequence similarity to
46 *Streptobacillus felis*. The clear differentiation of strain AHL 370-1^T from *Streptobacillus*
47 *moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis* was also supported
48 by *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence analysis. Average
49 nucleotide identity revealed 87.16% (reciprocal 87.16%) DNA-DNA relatedness between
50 strain AHL 370-1^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T.

51 Physiological data confirmed the allocation of strain AHL 370-1^T to the family
52 *Leptotrichiaceae* considering very similar profiles of enzyme activities and fatty acids
53 compared to closely related species. Within the genus *Streptobacillus*, isolate AHL 370-1^T
54 could also unambiguously be separated from *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus*
55 *hongkongensis* and *Streptobacillus felis* by MALDI-TOF mass spectrometry. Two
56 further strains (KWG2, KWG24) isolated from asymptomatic black rats in Japan were
57 highly similar to AHL 370-1^T. On the basis of these data we propose the novel species
58 *Streptobacillus notomytis* sp. nov. with the type strain AHL 370-1^T (= CCUG 12425^T =
59 DSM 100026^T = CCM 8593^T = EF 12425).

60

61

62 Rat bite fever (RBF) and Haverhill fever (HF) are disease entities caused by *Streptobacillus*
63 *moniliformis*, that represented for almost 90 years a monotypic species within the genus
64 *Streptobacillus* (Levaditi *et al.*, 1925) (*Streptobacillus*, *Leptotrichiaceae*, *Fusobacteriales*)
65 (Elliott, 2007). The bacterial zoonosis RBF is under-reported worldwide and predominantly
66 transmitted through rat bites and scratches (Gaastra *et al.*, 2009), whereas HF represents a
67 second, food-borne form of *Streptobacillus moniliformis* infection, which is transmitted by
68 direct or indirect contact with rat urine (Bleich & Nicklas, 2008, Hayashimoto *et al.*, 2008,
69 Torres *et al.*, 2003). Acute symptoms of RBF include fever, malaise, muscle pain, arthritis
70 and abscess formation, endocarditis, bacteraemia, and maculopapular, petechial or pustular

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

71 rash as well as vomiting and pharyngitis (Gaastra, *et al.*, 2009). Approximately 50-100% of
72 wild rats usually asymptotically carry *Streptobacillus moniliformis* in their oro- or
73 nasopharynx and shed the organism with saliva and urine (Ditchfield *et al.*, 1961, Elliott,
74 2007, Washburn, 1995), but abscess formation has been also described in rats and mice
75 (Rohde *et al.*, 2008, Wullenweber *et al.*, 1990). Other rodent species like gerbils, squirrels or
76 guinea pigs as well as companion and exotic animals and livestock are principally susceptible
77 to infection besides rats and mice, but mice may strain-dependently develop clinical disease
78 (Boyer *et al.*, 1958, Das, 1986, Ditchfield, *et al.*, 1961, Gaastra, *et al.*, 2009, Glünder *et al.*,
79 1982, Gourlay *et al.*, 1982, Mohamed *et al.*, 1969, Russell & Straube, 1979, Smallwood,
80 1929, Valverde *et al.*, 2002, Wullenweber, *et al.*, 1990, Yamamoto & Clark, 1966).

81 In the last few years *Streptobacillus*-like organisms have been noticed beside *Streptobacillus*
82 *moniliformis*, from which *Streptobacillus hongkongensis* (Woo *et al.*, 2014) and
83 *Streptobacillus felis* (Eisenberg *et al.*, 2015, Eisenberg *et al.*, 2014) were recently described as
84 new species causing quinsy and septic arthritis in humans and pneumonia in a cat,
85 respectively. Furthermore, two *Streptobacillus* spp. were reported, one of which was found in
86 a canine oral microbiome project (sequence COT-370) (Dewhirst *et al.*, 2012). The other is a
87 *Streptobacillus* sp. (OGS16) isolated from the oral cavity of a Japanese black rat (*Rattus*
88 *rattus*) (Kimura *et al.*, 2008). We have found evidence for a further novel species and the
89 respective strain is object of the present description.

90

91 Strain AHL 370-1^T was originally isolated from the heart of an Australian spinifex
92 hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 with septicaemia (Hopkinson & Lloyd,
93 1981). AHL 370-1^T grows after 2-5 days incubation at 37°C under a capnophilic atmosphere
94 of 10% CO₂ on Columbia agar with 5% sheep blood (SBA; Oxoid, Wesel, Germany). On this
95 agar, strain AHL 370-1^T was able to grow also weakly at
96 43°C, but not at 10, 20 or 50°C. The strain could also be cultivated on TSA (tryptone soy
97 agar, Oxoid), supplemented with 20% horse serum, Schaedler agar as well as in liquid media
98 (tryptone soy broth [TSB], brain-heart infusion and peptone broth, supplemented with 20%
99 cattle or horse serum) but not on Gassner and MacConkey agar (all Oxoid). Growth is very
100 fastidious and colonies are butyraceous, dry and heterogeneous, resembling mixed cultures at
101 first impression. Gram-staining was done according to the Hucker method as described
102 previously (Gerhardt *et al.*, 1994). Cell morphological features were observed under a Leitz
103 Diaplan light microscope at ×1000, with cells grown for 3 days at 37°C on SBA. Gram
104 staining revealed irregular Gram-negative pleomorphic, fusiform to filamentous, non-spore

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

105 forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods which were arranged in chains and clumps,
106 sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Single laying rod-shaped cell were
107 approximately 0.45 +/- 0.1 µm wide and 0.83 +/- 0.08 µm long.

108

109 Two strains (KWG2, KWG24) isolated from oral swabs of asymptomatic black rats in Japan
110 were highly similar to AHL 370-1^T and were therefore included in the present study. For
111 phylogenetic analysis genomic DNA was extracted from a bacterial culture from all viable
112 strains with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (MasterPure™
113 Complete DNA and RNA Purification Kit, Epicentre, distributed by Biozym Scientific,
114 Hessisch Oldendorf, Germany) and subjected to whole genome sequencing.

115 De novo assembly was performed with CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio,
116 Aarhus, Denmark). For automatic annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations
117 using Subsystems Technology (Aziz *et al.*, 2008). Phylogenetic analysis was performed in
118 ARB release 5.2 (Ludwig *et al.*, 2004) using the 16S rRNA-based "All-Species Living Tree"
119 Project (LTP) database (Yarza *et al.*, 2008) release 108 (July 2012). All sequences not
120 included in the LTP database were aligned with the SINA online alignment tool version
121 1.2.11 (Pruesse *et al.*, 2012) and implemented in the LTP database. Pairwise sequence
122 similarities were calculated in ARB using the ARB Neighbor-joining tool without the use of
123 an evolutionary substitution model. Phylogenetic trees were constructed with the maximum-
124 likelihood method using RAxML version 7.04 (Stamatakis, 2006) with GTR-GAMMA and
125 rapid bootstrap analysis and the maximum-parsimony method using DNAPARS v 3.6
126 (Felsenstein, 2005). Both trees based on 100 replications (bootstrap analysis) (Felsenstein,
127 2005) and 16S rRNA gene sequences between sequence termini 103 and 1356 (numbering
128 according to the *E. coli* rRNA sequence published by (Brosius *et al.*, 1978)).

129 The sequenced 16S rRNA gene fragment of strain AHL 370-1^T represents a
130 continuous stretch of 1481 unambiguous nucleotides between sequence positions 9 to 1444
131 (*E. coli* numbering; (Brosius, *et al.*, 1978)).

132 Strain AHL 370-1^T shares highest 16S rRNA gene sequence identity with type strains of the
133 species *Streptobacillus moniliformis* (99.4%), *Streptobacillus hongkongensis* (95.6%) and
134 *Streptobacillus felis* (99.0%), followed by *Sneathia sanguinegens* (92.9%). Sequence
135 similarities to all other taxa were below 91%. Independent of the treeing method, strain AHL
136 370-1^T (and also KWG2 and KWG24) formed a distinct cluster (>90% bootstrap support)
137 with the type strains of *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and
138 *Streptobacillus felis* (Fig. 1) clearly separated from the genera *Sneathia*, *Sebaldella* and

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

139 *Leptotrichia*. Strain AHL 370-1^T clustered closest with the type strain of *Streptobacillus*
140 *moniliformis*, which is supported by a high bootstrap value (97%). Beside the *Streptobacillus*
141 *moniliformis* type strain six further *Streptobacillus moniliformis* strains isolated from different
142 isolation sources (Table S1) were analysed in parallel. All shared identical 16S rRNA gene
143 sequences and did not affect the distinct clustering of strain AHL 370-1^T in the phylogenetic
144 tree.

145 Amplification of the specific 16S rRNA gene sequences for strains AHL 370-1^T, KWG2 and
146 KWG24 resulted in characteristic amplicon sizes of approximately 269 and 1222 bp
147 employing the published protocols for *Streptobacillus moniliformis*-specific PCR assays
148 according to Kimura *et al.* (primers S5: 5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3' and AS2: 5'-
149 GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3') (Kimura, *et al.*, 2008) and Nicklas (primers SbmF: 5'-
150 GAGAGAGCTTTGCATCCT-3' and SbmR: 5'-GTAACCTCAGGTGCAACT-3') (cited in
151 (Rohde, *et al.*, 2008)), respectively.

152 For further clarification of the phylogenetic relationship of strain AHL 370-1^T to other
153 *Streptobacillus* species phylogenetic analyses based on partial nucleotide and amino acid
154 sequences (Glaeser & Kämpfer, 2015) of *gyrB*, *groEL*, and *recA* genes were performed
155 according to the analysis performed by Woo *et al.* (2014). Respective nucleotide sequences
156 were aligned according to amino acid sequences using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)
157 implemented in MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). The correct open reading frame (ORF) was
158 obtained by using the full-length gene sequence of *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T
159 as a reference. Pairwise sequence similarities were calculated based on *p*-distances (calculated
160 without an evolutionary model). Phylogenetic trees were generated using the maximum-
161 likelihood method with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories and by
162 assuming that a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I) (for nucleotide
163 sequences) and the Jones-Thornton-Taylor model (JTT; (Jones *et al.*, 1992)) +G +I (for amino
164 acid sequences). Both trees based on 100 replications.

165 Phylogenetic trees based on partial nucleotide and more conserved amino acid
166 sequences (Glaeser & Kämpfer, 2015) of *gyrB*, *groEL* and *recA* showed in all trees the
167 formation of monophyletic clusters including all *Streptobacillus* species. Strain AHL 370-1^T
168 clustered together with strains KWG2 and KWG24 (with high bootstrap support) closest but
169 in a distinct branch to *Streptobacillus moniliformis* strains (Fig. S1-S3). In addition
170 nucleotide and amino acid sequence similarities were always considerably lower between
171 strain AHL 370-1^T (and KWG2, KWG24) and strains of the species *Streptobacillus*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

172 *moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis* (Table S2), thereby
173 clearly indicating the genetic distinction of strain AHL 370-1^T.
174 Instead of weak DNA-DNA hybridization results for members of this genus (Eisenberg *et al.*,
175 2015) average nucleotide identity (ANI) was carried out according to the method described by
176 (Goris *et al.*, 2007). The overall DNA-DNA relatedness between strain AHL 370-1^T and
177 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T was 87.16% (reciprocal 87.16%) as determined by
178 ANI, and therefore it is evident that they are separate species (Richter & Rossello-Mora,
179 2009). Accordingly, ANI between AHL 370-1^T and KWG2/ KWG24 revealed 98.72%/
180 96.79% (reciprocal 97.31%/ 96.79%) overall DNA-DNA relatedness thus pointing towards
181 conspecificity. Unique features of strain AHL 370-1^T compared to other *Streptobacillus*
182 *moniliformis* strains were also found by DNA-DNA-hybridization and electrophoretic protein
183 patterns during previous studies (Costas & Owen, 1987, Hofmann, 1994). From the results of
184 the sequence analysis of the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL* and *recA* genes and ANI it is evident,
185 that strain AHL 370-1^T is different to the genera *Sneathia*, *Sebaldella*, *Leptotrichia* and to the
186 species *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis*.

187

188 Results from the physiological characterization are given in the species description and in
189 Table 1. Extended biochemical profiling was carried out according to the manufacturer's
190 instructions using commercial test systems, i.e. Micronaut Strep2 (Merlin Diagnostika,
191 Bornheim-Hersel, Germany; (Manafi *et al.*, 1991)), VITEK2-compact with the NHI card and
192 API-ZymTM (both bioMeriëux, Nürtingen, Germany). Vitek NHI identified strain AHL 370-
193 1^T as *Neisseria elongata* (bio profile 0233000000) and *Streptobacillus moniliformis* DSM
194 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus felis* 131000547^T as
195 *Neisseria cinerea* with 98% (0232000000), 93% (0220000040) and 99% (0220000000)
196 confidence, respectively. Strain AHL 370-1^T cannot be differentiated from type strains of
197 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and
198 *Streptobacillus felis* 131000547^T by physiological characteristics alone. Results are given in
199 the species description and Table 1. The antimicrobial susceptibility pattern was determined
200 using minimal inhibitory concentrations (MIC) obtained by broth microdilution test (Merlin
201 Diagnostika). Results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards
202 Institute (CLSI) MIC criteria based on CLSI MIC interpretive standards for other non-
203 *Enterobacteriaceae* and anaerobes (Anonym, 2015) according to Table S3. Strain AHL 370-
204 1^T turned out to be sensitive towards azithromycin, ciprofloxacin, clindamycin,
205 chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, meropenem, nalidixic acid, telithromycin and

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

206 tetracycline, but resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and intermediate resistant to
207 streptomycin.

208 For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-
209 TOF MS), *Streptobacillus notomytis* sp. nov. strains AHL 370-1^T, KWG2 and KWG24,
210 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and six *Streptobacillus moniliformis* reference
211 strains, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T and
212 *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T were incubated for 24h and subsequently selected from
213 the SBA plates and then transferred to steel targets according to manufacturer's instructions
214 (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). Strains were prepared using the direct
215 smear method provided by the manufacturer. Analysis was performed on a MALDI-TOF MS
216 Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised only
217 one entry from *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T. *Streptobacillus moniliformis* DSM
218 12112^T and six *Streptobacillus moniliformis* reference strains were identified to the species
219 level with score levels above 2.2. Strain AHL 370-1^T could also be identified as
220 *Streptobacillus moniliformis* yielding score levels above 2.0. A dendrogram including
221 selected main spectra peak lists (msp) of the family *Leptotrichiaceae* from the Bruker
222 database as well as *Streptobacillus notomytis* sp. nov. strains AHL 370-1^T, KWG2 and
223 KWG24, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T and further reference strains,
224 *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Sneathia*
225 *sanguinegens* CCUG38322^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T is depicted in Fig. S4
226 and shows, however, a separate position of spectra from strain AHL 370-1^T compared to
227 those from *Streptobacillus hongkongensis*, *Streptobacillus felis* as well as all strains from
228 *Streptobacillus moniliformis*.

229 Fatty acid composition was carried out according to (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996) (Table
230 2). The major fatty acids C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} and C_{18:2} (summed feature 5) as described by
231 (Pins *et al.*, 1996, Rowbotham, 1983, Rygg & Bruun, 1992) could also be detected in our
232 investigations.

233 Both, the molecular differences obtained by ANI and phylogenetic analyses (Figs. 1 and S1,
234 S2, S3) and the differences based on MALDI-TOF MS and fatty acid composition (Figs. S4,
235 Table 2) support the separate position of strain AHL 370-1^T as a distinct species of
236 *Streptobacillus*. The dependence of strain AHL 370-1^T to grow fastidiously in capnophilic
237 environment with 10% CO₂ in the presence of blood or serum, its negative reactivity for
238 cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole, the production of cotton ball-like appearance
239 in liquid media, its inducible L-forms beside "normal" small butyraceous colonies, its Gram-

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

240 negative filamentous rod-shaped phenotype arranged in chains and clumps with irregular
241 bulbar swellings and its broad antimicrobial susceptibilities (Table 1, S4) also support the
242 placement of the isolate in the genus *Streptobacillus* and distinguish it from *Sneathia*
243 *sanguinegens* and “*Leptotrichia amnionii*” (Woo, *et al.*, 2014). Moreover, genotypical and
244 phenotypical differences prove strain AHL 370-1^T as a novel species different from
245 *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis*. For this
246 reason we are here proposing the novel species *Streptobacillus notomytis* sp. nov. with the
247 type strain AHL 370-1^T (= CCUG 12425^T = DSM 100026^T = CCM 8593^T = EF 12425*) * E.
248 Falsen strain collection, University of Goteborg, Sweden

249

250 **Emended description of the genus *Streptobacillus* Levaditi *et al.* 1925, Eisenberg *et al.*** 251 **2015**

252 The description is emended from that given by (Eisenberg, *et al.*, 2015), but the following
253 features are added. Rods with rounded or pointed ends or pleomorphic bacilli with
254 coccobacillary, bacillary and filamentous forms. Occur singly or form long, wavy chains.
255 Gram-stain-negative. Non motile. Non-spore-forming. Most strains are dependent on a
256 capnophilic atmosphere containing 5-10 % CO₂ and grow anaerobically only weakly. Few
257 strains are able to grow aerobically. Capable to grow on blood agar and weakly on chocolate
258 agar but not on MacConkey agar; require blood, serum or ascitic fluid for growth. Optimum
259 temperature for growth 35-37°C. Most strains are non-haemolytic, some are alpha-
260 haemolytic. Most strains are positive for esterase (C4) and esterase lipase (C8). Negative for
261 catalase and cytochrome oxidase, indole production and nitrate reduction. The major fatty
262 acids are C_{16:0} (palmitic acid), C_{18:0} (stearic acid), and C_{18:1 ω 9c} (oleic acid). DNA G+C
263 content is 24.0-28.9 mol%. The type species is *Streptobacillus moniliformis*.

264

265 **Description of *Streptobacillus notomytis* sp. nov.**

266 *Streptobacillus* (no.to'my.tis. N.L. gen. n. notomytis of the hopping mouse *Notomys alexis*)

267

268 Growth occurs after 2-5 days at 37°C in a capnophilic atmosphere of 10% CO₂ on SBA, TSA
269 or TSB with 20% horse serum, but only weak growth is observed on Schaedler and chocolate
270 agar and no growth on Gassner and MacConkey agar. In an anaerobic environment reduced
271 growth can be observed. Colonies are tiny, dry, butyraceous and slightly opaque, measuring
272 0.1-0.4 mm in diameter. Colonies are non-haemolytic on SBA. Conversion to L-phase or
273 transitional phase variant may rarely occur spontaneously during cultivation. In liquid media

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

274 (e.g. TSB with 20% horse serum), streptobacillary growth can be detected after 2-5 days as
275 typical “cotton ball” or “bread crumb”-like appearance.

276 Microscopic morphological features are indicative of Gram-negative, pleomorphic, fusiform
277 to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods with a size of 0.45
278 +/- 0.1 µm (width) and 0.83 +/- 0.08 µm (length) that are arranged in chains and clumps, also
279 sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Positive for esterase C4, esterase
280 lipase C8, leucine arylamidase, phenylalanine arylamidase, ala-phe-pro arylamidase and α-
281 chymotrypsin. Negative for motility, acid phosphatase, alkaline phosphatase, lipase (C14),
282 valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase α-
283 galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-
284 glucosaminidase, α-mannosidase, α-fucosidase, cytochrome oxidase, catalase, nitrate and
285 indole.

286 The type strain AHL 370-1^T (= CCUG 12425^T = DSM 100026^T = CCM 8593^T = EF 12425*)
287 was isolated from the heart of an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*)
288 THOMAS, 1922 with septicaemia (Hopkinson & Lloyd, 1981) and for priority reasons the
289 species epithet *notomytis* was chosen despite its occurrence also in *Rattus rattus*. The G+C
290 content of the DNA of the type strain is 28.1 mol%, genome size is 1.76 Mbp.

291

292 Acknowledgement

293 We thank Ulrike Kling, Anna Mohr, Katharina Engel, Mersiha Curić, Jens Heinbächer,
294 Andrea Erles-Kemna, Bernhard Berkus, Barbara Depner, Maria Sowinsky and Gundula Will
295 for excellent technical assistance and Barbara Gamb for making even the most exotic
296 manuscripts available. Khayrieh Aledelbi (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Germany)
297 is acknowledged for assessing selected physiological parameters.

298

299 References

300 **Anonym (2015)**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th
301 informational supplement. *CLSI document M100-S25*.

302 **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & 23 other authors (2008)**. The RAST Server: rapid
303 annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.

304 **Bleich, A. & Nicklas, W. (2008)**. Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as
305 laboratory or pet animals [in German]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **121**, 241-255.

306 **Boyer, C. I. J., Bruner, D. W. & Brown, J. A. (1958)**. A *Streptobacillus*, the cause of
307 tendon-sheath infection in turkeys. *Avian Dis* **2**, 418-427.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 308 **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide
309 sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**,
310 4801-4805.
- 311 **Costas, M. & Owen, R. J. (1987).** Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of
312 *Streptobacillus moniliformis* strains from human, murine and avian infections. *J Med*
313 *Microbiol* **23**, 303-311.
- 314 **Das, A. M. (1986).** *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. *Ind J Comp*
315 *Microbiol Immunol Infect Dis* **7**, 115.
- 316 **Dewhirst, F. E., Klein, E. A., Thompson, E. C., Blanton, J. M., Chen, T., Milella, L.,**
317 **Buckley, C. M., Davis, I. J., Bennett, M. L. & Marshall-Jones, Z. V. (2012).** The canine
318 oral microbiome. *PLoS One* **7**, e36067.
- 319 **Ditchfield, J., Lord, L. H. & McKay, K. A. (1961).** *Streptobacillus moniliformis* infection in
320 a dog. *Can Vet J* **2**, 457-459.
- 321 **Eisenberg, T., Glaeser, S., Nicklas, W., Mauder, N., Contzen, M., Aledelbi, K. &**
322 **Kämpfer, P. (2015).** *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. *Int J*
323 *Syst Evol Microbiol*.
- 324 **Eisenberg, T., Nesseler, A., Nicklas, W., Spamer, V., Seeger, H. & Zschöck, M. (2014).**
325 *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports* **2014**,
326 1-7.
- 327 **Eisenberg, T., Nicklas, W., Mauder, N., Rau, J., Contzen, M., Semmler, T., Hofmann,**
328 **N., Aledelbi, K. & Ewers, C. (2015).** Phenotypic and genotypic characteristics of members
329 of the genus *Streptobacillus*. *PLoS One* **10**, e0134312.
- 330 **Elliott, S. P. (2007).** Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* **20**,
331 13-22.
- 332 **Felsenstein, J. (2005).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6. Distributed by
333 the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- 334 **Gaastra, W., Boot, R., Ho, H. T. & Lipman, L. J. (2009).** Rat bite fever. *Vet Microbiol* **133**,
335 211-228.
- 336 **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. e. (1994).** *Methods for*
337 *general and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 338 **Glaeser, S. P. & Kämpfer, P. (2015).** Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
339 taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **38**, 237-245.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 340 **Glünder, G., Hinz, K. H. & Stiburek, B. (1982).** Joint disease in turkeys caused by
341 *Streptobacillus moniliformis* in Germany [in German]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **89**, 367-
342 370.
- 343 **Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. &**
344 **Tiedje, J. M. (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-
345 genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- 346 **Gourlay, R. N., Flanagan, B. F. & Wyld, S. G. (1982).** *Streptobacillus actinoides* (*Bacillus*
347 *actinoides*): isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in
348 gnotobiotic calves. *Res Vet Sci* **32**, 27-34.
- 349 **Hayashimoto, N., Yoshida, H., Goto, K. & Takakura, A. (2008).** Isolation of
350 *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. *J Vet Med Sci* **70**, 493-495.
- 351 **Hofmann, N. (1994).** Phenotypical and molecular taxonomic investigations on the systematic
352 status of *Streptobacillus moniliformis*, the agent of rat-bite-fever [in German]. In Faculty of
353 Biology, Leibniz Universität Hannover, pp. 105. Thesis Dr. rer. nat., Faculty of Biology,
354 Leibniz Universität Hannover
- 355 **Hopkinson, W. I. & Lloyd, J. M. (1981).** *Streptobacillus moniliformis* septicaemia in
356 spinifex hopping mice (*Notomys alexis*). *Aust Vet J* **57**, 533-534.
- 357 **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation
358 data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**,
359 275-282.
- 360 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of
361 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- 362 **Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. &**
363 **Yamada, A. (2008).** Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase
364 chain reaction. *Microbiol Immunol* **52**, 9-15.
- 365 **Levaditi, C., Nicolau, S. & Poincloux, P. (1925).** Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus*
366 *moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. *C R Acad Sci* **180**,
367 1188-1190.
- 368 **Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R. & 29 other authors (2004).** ARB: a software
369 environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363-1371.
- 370 **Manafi, M., Kneifel, W. & Bascomb, S. (1991).** Fluorogenic and chromogenic substrates
371 used in bacterial diagnostics. *Microbiological reviews* **55**, 335-348.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 372 **Mohamed, Y. S., Moorhead, P. D. & Bohl, E. H. (1969).** Natural *Streptobacillus*
373 *moniliformis* infection of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. *Avian Dis*
374 **13**, 379-385.
- 375 **Pins, M. R., Holden, J. M., Yang, J. M., Madoff, S. & Ferraro, M. J. (1996).** Isolation of
376 presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital
377 tract. *Clin Infect Dis* **22**, 471-476.
- 378 **Pruesse, E., Peplies, J. & Glockner, F. O. (2012).** SINA: accurate high-throughput multiple
379 sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823-1829.
- 380 **Richter, M. & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the
381 prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19126-19131.
- 382 **Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008).** Case report: Abscessation due to *Streptobacillus*
383 *moniliformis* in a rat [in German]. *Prakt Tierarzt* **89**, 466-473.
- 384 **Rowbotham, T. J. (1983).** Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. *Lancet* **2**,
385 567.
- 386 **Russell, E. G. & Straube, E. F. (1979).** Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos*
387 *cinereus*). *J Wildl Dis* **15**, 391-394.
- 388 **Rygg, M. & Bruun, C. F. (1992).** Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with
389 septicemia in a child. *Scand J Infect Dis* **24**, 535-540.
- 390 **Smallwood, R. P. (1929).** Ratbite fever from the bite of a pig. *Brit Med J* **29**, 1159.
- 391 **Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses
392 with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
- 393 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).**
394 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary
395 distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- 396 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the
397 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
398 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- 399 **Torres, L., Lopez, A. I., Escobar, S., Marne, C., Marco, M. L., Perez, M. & Verhaegen,**
400 **J. (2003).** Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. *Eur J*
401 *Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 258-260.
- 402 **Valverde, C. R., Lowenstine, L. J., Young, C. E., Tarara, R. P. & Roberts, J. A. (2002).**
403 Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol* **31**,
404 345-349.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 405 **Washburn, R. G. (1995).** *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever). In Principles and
406 practice of infectious diseases Vol 2 pp. 2084–2086. Edited by G. L. Mandell, J. E. Bennett
407 and R. G. Dolin. New York: Churchill Livingstone.
- 408 **Woo, P. C., Wu, A. K., Tsang, C. C., Leung, K. W., Ngan, A. H., Curreem, S. O., Lam,**
409 **K. W., Chen, J. H., Chan, J. F. & Lau, S. K. (2014).** *Streptobacillus hongkongensis* sp.
410 nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis in Hong Kong, and emended
411 descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. *Int J*
412 *Syst Evol Microbiol*.
- 413 **Wullenweber, M., Kaspareit-Rittinghausen, J. & Farouq, M. (1990).** *Streptobacillus*
414 *moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of
415 different strains of mice. *Lab Anim Sci* **40**, 608-612.
- 416 **Yamamoto, R. & Clark, G. T. (1966).** *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet*
417 *Rec* **79**, 95-100.
- 418 **Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzebly, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W.,**
419 **Glockner, F. O. & Rossello-Mora, R. (2008).** The all-species living tree project: a 16S
420 rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**, 241-250.
421
422

423 **Table 1.** Physiological characteristics of *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T, and the type strains *Streptobacillus moniliformis*,
 424 *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis* obtained by Micronaut Strep2 (fermentation) and an individual reaction panel designed for
 425 the identification of *Streptobacillus* spp. (all Merlin Diagnostika^{*}, VITEK2-compact with the NHI card[†], API-Zym^{‡#} (both bioMérieux) and
 426 classical reactions[§]; Taxa: 1, *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T; 2, *Streptobacillus notomytis* sp. nov. KWG2; 3, *Streptobacillus*
 427 *notomytis* sp. nov. KWG24; 4, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 5, results from six *Streptobacillus moniliformis* reference strains (ATCC
 428 27747, ATCC 49567, ATCC 49940, NCTC 11194, CIP 55-48 and CIP 81-99); 6, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 7, *Streptobacillus*
 429 *felis* 131000547^T; +, positive; -, negative; +/- variable; n.d., not determined. Congruent results are solely presented in the species description.

Compound	1	2	3	4	5	6	7
Haemolysis on SBA [§]	-	-	-	-	+/-	+	+
Neuramidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+/-	-	-
Tripeptidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	-	+
Prolin aminopeptidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	-	+
Hydroxyprolin aminopeptidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	-	+
Glycyltryptophan aminopeptidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	-	+
Arginine aminopeptidase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	-	+
Pyrase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	+/-	+
Arginine dihydrolase [*]	+	n.d.	n.d.	+	+	+	+/-
Chitinase [*]	-	n.d.	n.d.	-	+/-	+	+
Phosphatase (unspecified) [†]	-	-	-	-	-	+	-
Phenylalanine arylamidase [†]	+	+	+	+	+	-	-
Ala-phe-pro arylamidase [†]	+	+	+	+	+	-	-

Alkaline phosphatase [†]	-	-	-	w	+/-	+	+
Esterase (C4) [†]	+	w	w	w	+/-	w	+
Esterase lipase (C8) [†]	+	-	-	+	w/+	w	+
Leucine arylamidase [†]	w	-	-	-	+/-	-	-
α -Chymotrypsin [†]	+	w	w	+	w/+	-	-
Acid phosphatase [†]	-	-	-	w	-/w	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [†]	-	-	-	-	-	w	-
α -Glucosidase [†]	-	-	-	-	-	-	-

430 # score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0-2: negative [-], 3: weak [w], 4-5: positive [+])

431

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

432 **Table 2.** Cellular fatty acid pattern of *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T and type strains of the three *Streptobacillus* species. Taxa: 1,
 433 *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T; 2, *Streptobacillus notomytis* sp. nov. KWG2; 3, *Streptobacillus notomytis* sp. nov. KWG24; 4,
 434 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 5, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 6, *Streptobacillus felis* 131000547^T. Biomass for fatty
 435 acid analysis was harvested after 3 days of growth in capnophilic environment with 10% CO₂ on Columbia sheep blood agar at 36°C. Fatty acids
 436 below 1% are not listed in the table.

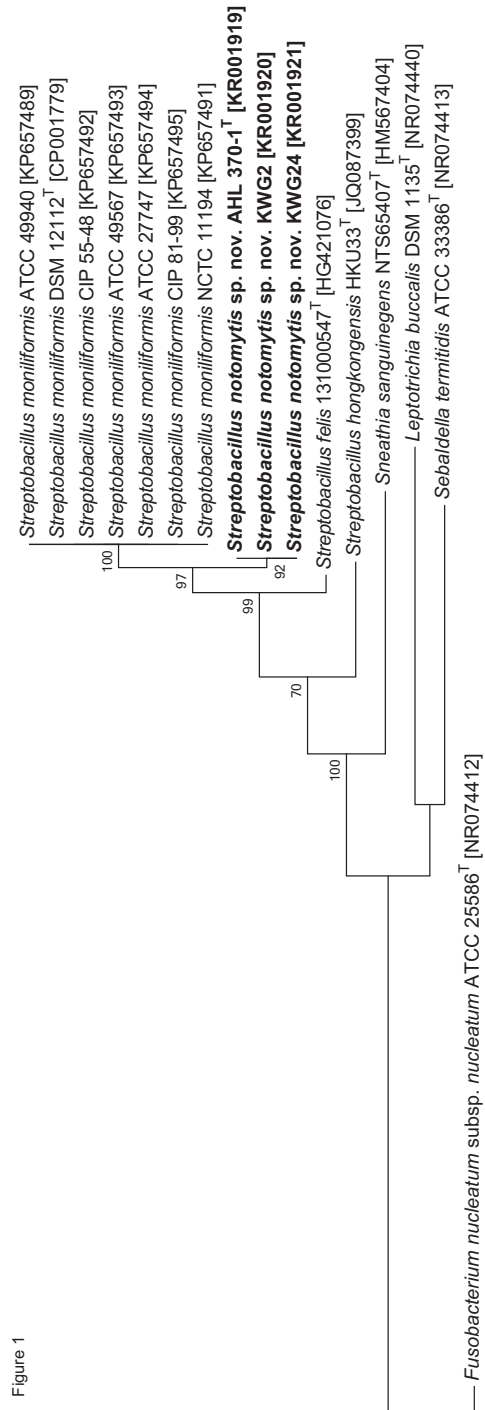
Fatty acid	1	2	3	4	5	6
C _{14:0}	-	1.2	1.8	-	-	1.4
C _{15:0} <i>iso</i>	-	-	-	-	3.0	2.1
C _{16:0}	32.5	23.7	23.0	35.4	26.5	31.8
C _{17:0}	1.5	1.1	1.0	-	-	-
summed feature 5 C _{18:0} ANTE/C _{18:2} ω6,9c	11.0	18.4	19.4	10.2	5.6	8.8
C _{18:1} ω9c	24.6	27.6	27.7	20.8	30.2	22.7
C _{18:0}	31.9	20.2	18.8	33.5	34.7	30.8
C _{20:4} ω6,9,12,15c	-	1.3	1.3	-	-	1.4

437

438 For unsaturated fatty acids, the position of the double bond is located by counting from the methyl (ω) end of the carbon chain. *cis* isomers are
 439 indicated by the suffix *c*.

440 **Fig. 1.** Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T within the family
441 *Leptotrichiaceae*. The tree was generated in MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) using GTR-GAMMA, Rapid Bootstrap analysis (100 bootstraps) and is
442 based on 16S rRNA gene sequences between positions 103 to 1356 (*E. coli* numbering, (Brosius, *et al.*, 1978). GenBank accession numbers are
443 given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates). Bar, 0.02 nucleotide substitutions per site

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S1. Overview of gene sequences of *Streptobacillus notomysis* sp. nov., *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus moniliformis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes and from DSM 12112^T (CP001779 (Nolan et al., 2009)). The accession number for the genome sequence of *Streptobacillus notomysis* sp. nov. AHL 370-1^T is LJR000000000 (BioSample SAMN04038436).

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA	gyrB	groEL	recA
<i>Streptobacillus notomysis</i> sp. nov.	AHL 370-1 ^T	Australian spinifex hopping mouse (<i>Notomys alexis</i>) with septicæmia, Australia	KR001919	KR001957	KR001938	KR001976
<i>Streptobacillus notomysis</i> sp. nov.	KWG2	oral cavity of a black rat (<i>Rattus rattus</i>), Japan	KR001920	KR001958	KR001939	KR001977
<i>Streptobacillus notomysis</i> sp. nov.	KWG24	oral cavity of a black rat (<i>Rattus rattus</i>), Japan	KR001921	KR001959	KR001940	KR001978
<i>Streptobacillus felis</i>	131000547 ^T	cat with pneumonia, Germany	HG421076	KP676101	KP657496	KP657504
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49940	rat with otitis media, Germany	KP657489	KP676102	KP657497	KP657505
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	NCTC 11194	human case of RBF, UK	KP657491	KP676104	KP657499	KP657507
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 55-48	mouse with lymphadenitis, UK	KP657492	KP676105	KP657500	KP657508
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49567	mouse with lymphadenitis, Germany	KP657493	KP676106	KP657501	KP657509
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 27747	turkey with septic arthritis, USA	KP657494	KP676107	KP657502	KP657510
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSM 12112 ^T	human case of rat bite fever, France	CP001779	CP001779	CP001779	CP001779
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 81-99	human blood culture, wild rat bite, France	KP657495	KP676108	KP657503	KP657511

Streptobacillus notomysis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus LEVADITI* et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Inaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S2. Sequence similarities of *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T compared to *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis* and *Streptobacillus felis*. Sequence similarities were calculated based on p-distances determined in MEGA5. 16S rRNA gene sequence similarities, *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence similarities. n: number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the phylogenetic trees (Fig. 1, FigS1-S3). Strain HKU33^T of *Streptobacillus hongkongensis* included in this analysis was analysed by Woo et al. (2014). Sequences were obtained from GenBank.

	<i>Streptobacillus notomytis</i> (n=3) - <i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=7)	<i>Streptobacillus notomytis</i> (n=3) - <i>Streptobacillus hongkongensis</i> (n=1)	<i>Streptobacillus notomytis</i> (n=3) - <i>Streptobacillus felis</i> (n=1)	<i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=7)
<i>groEL</i> (1602 nt)	92.5-93.1	80.6-80.7	84.1-84.3	99.2-99.9
GroEL (530 aa)	97.1-97.5	82.3-82.5	89.9-90.1	99.6-100
<i>recA</i> (1032 nt)	90.0	75.6	84.3	100
RecA (340 aa)	96.1	72.8-73.9	93.3	100
<i>gyrB</i> (1878 nt)	94.1-94.3	80.8	88.0-88.1	99.2-100
GyrB (613 aa)	97.7-97.9	81.4	94.5	99.8-100
16S rRNA (1119 nt)	99.4	95.6	99.0	100

Streptobacillus notomytis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus LEVADITI* et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Christa Ewers¹, Torsten Semmler¹, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masamobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²
¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

Table S3. Antimicrobial drug susceptibility testing of *Streptobacillus notomysis* sp. nov. AHL 370-1^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus felis* 131000547^T by broth microbouillon dilution susceptibility testing with Merlin Micronaut system; AZM: azithromycin, CIP: ciprofloxacin, CLI: clindamycin, CMP: chloramphenicol, ERY: erythromycin, GEN: gentamicin, MER: meropenem, NAL: nalidixic acid, STR: streptomycin, T/S: trimethoprim/sulfamethoxazole, TEL: telithromycin, TET: tetracycline, R: resistant, I: intermediate susceptible, S: susceptible phenotype, MIC values in µg/ml.

	AZM	CIP	CLI	CMP	ERY	GEN	MER	NAL	STR	T/S	TEL	TET
<i>Streptobacillus notomysis</i> sp. nov. AHL 370-1 ^T	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
	=0.25	=1	≤0.125	=1	≤0.5	≤0.125	≤0.0625	=16	=4	=8/152	=2	≤0.125
<i>Streptobacillus moniliformis</i> DSM 12112 ^T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
	0.0625	=1	=0.25	=1	≤0.5	≤0.125	=0.25	=2	≤1	>8/152	0.125	≤0.125
<i>Streptobacillus hongkongensis</i> DSM 26322 ^T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	0.0625	=0.5	0.125	0.5	0.5	≤0.125	≤0.0625	≤1	≤1	≤0.0625/1.1875	≤0.125	0.125
<i>Streptobacillus felis</i> 131000547 ^T	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S
	=0.125	=1	0.125	=4	=4	=2	=0.25	=32	=4	>8/152	=2	=0.25

Streptobacillus notomysis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

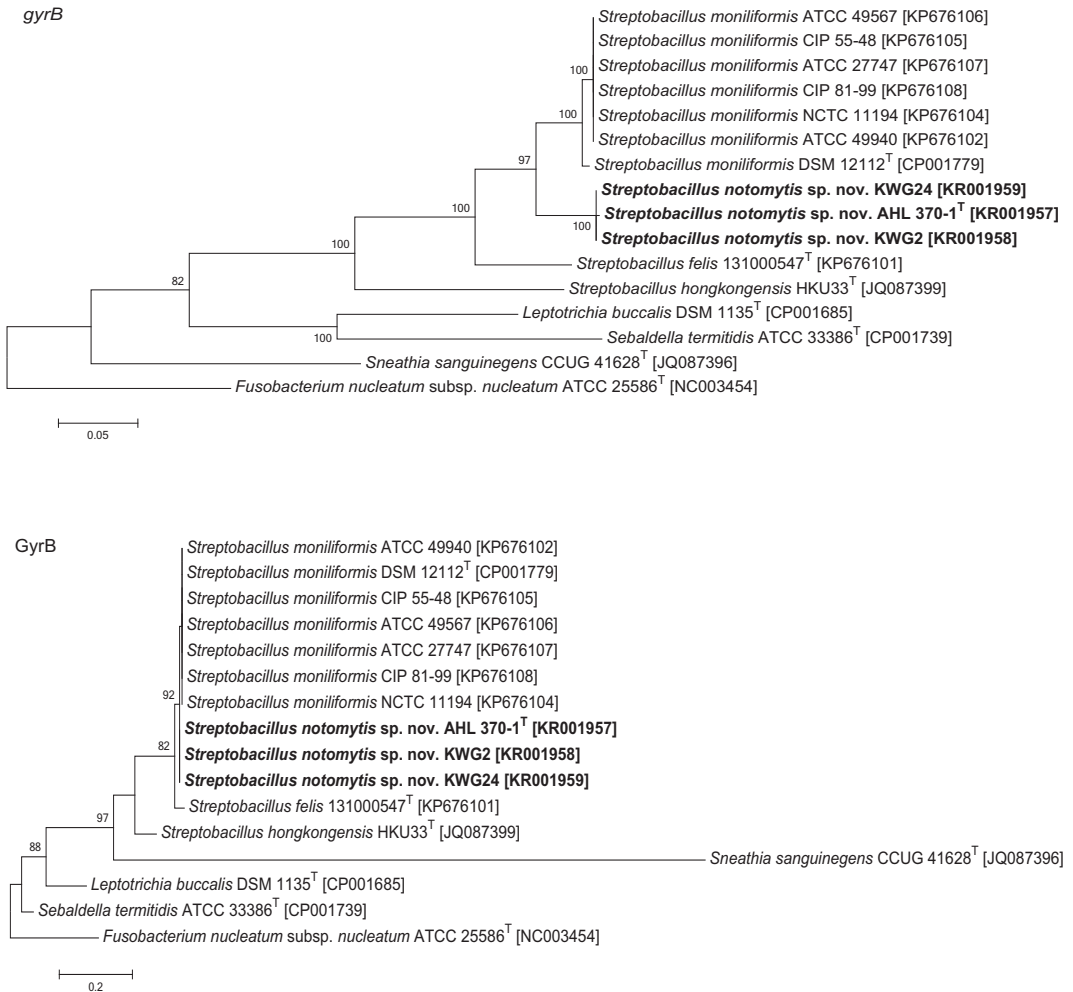
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masamobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S1. Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (529 nt) and *GyrB* (149 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain AHL 370-1^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.2 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Streptobacillus notomytis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

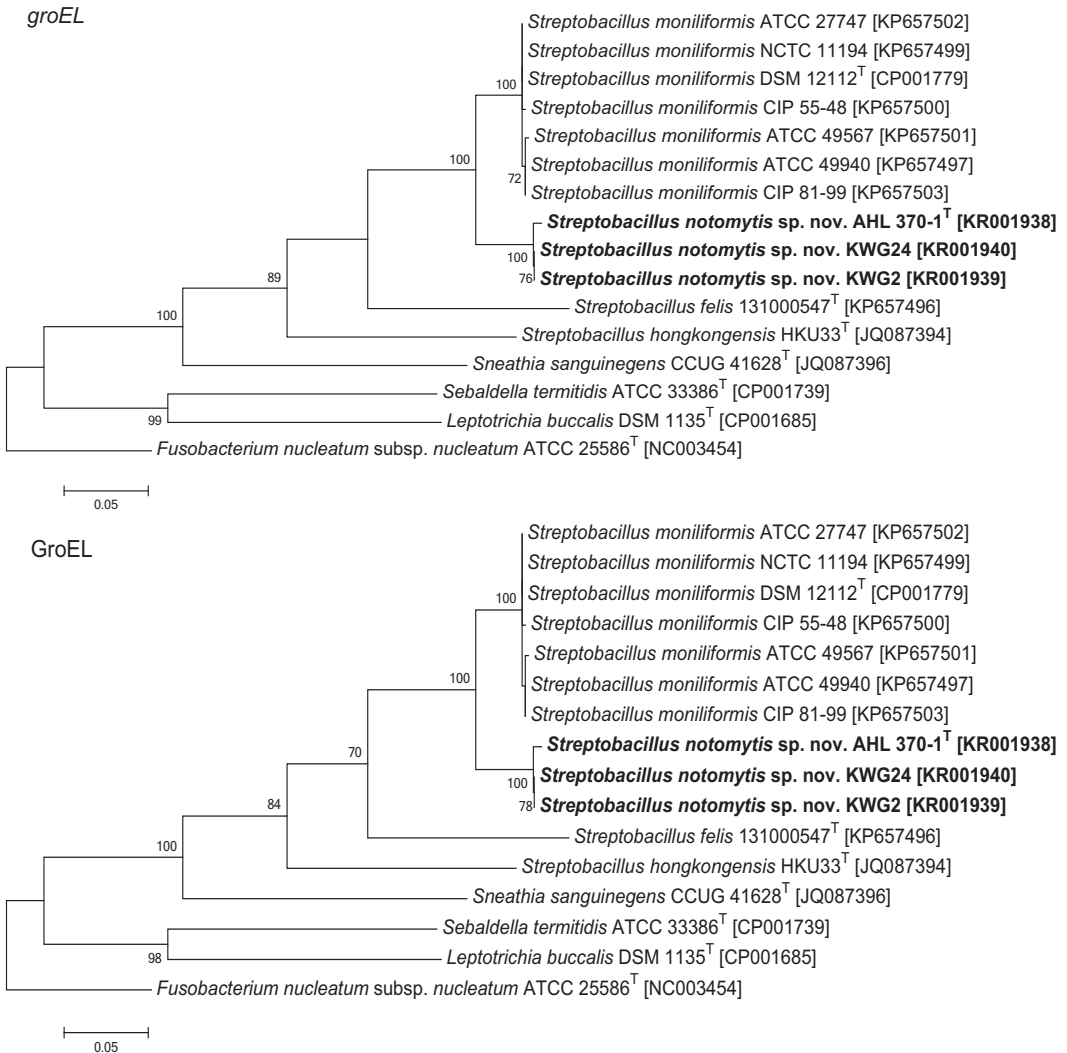
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S2. Phylogenetic trees based on partial *groEL* (556 nt) and GroEL (185 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain AHL 370-1^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino acid side, respectively..



Streptobacillus notomytis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392

Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch

Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt

Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute

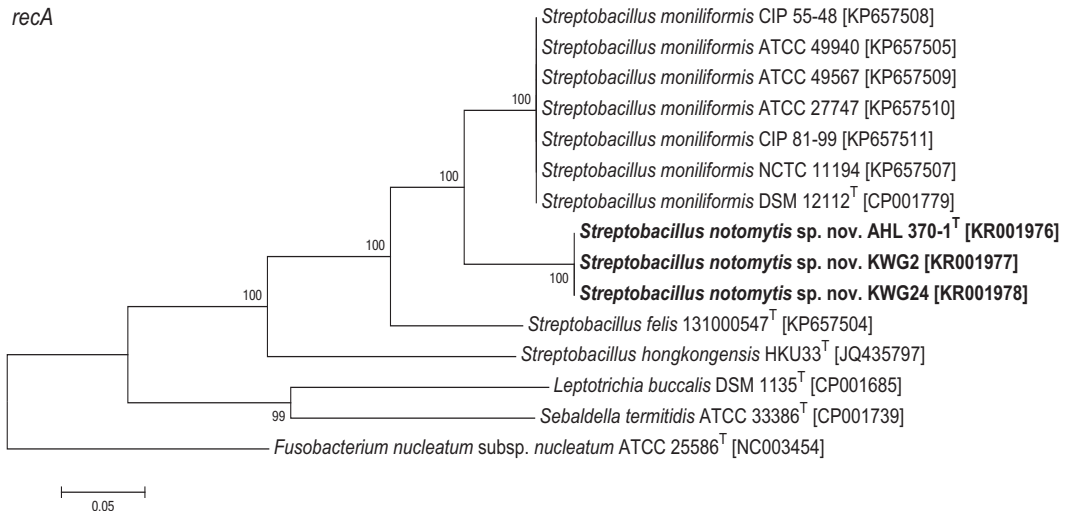
of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

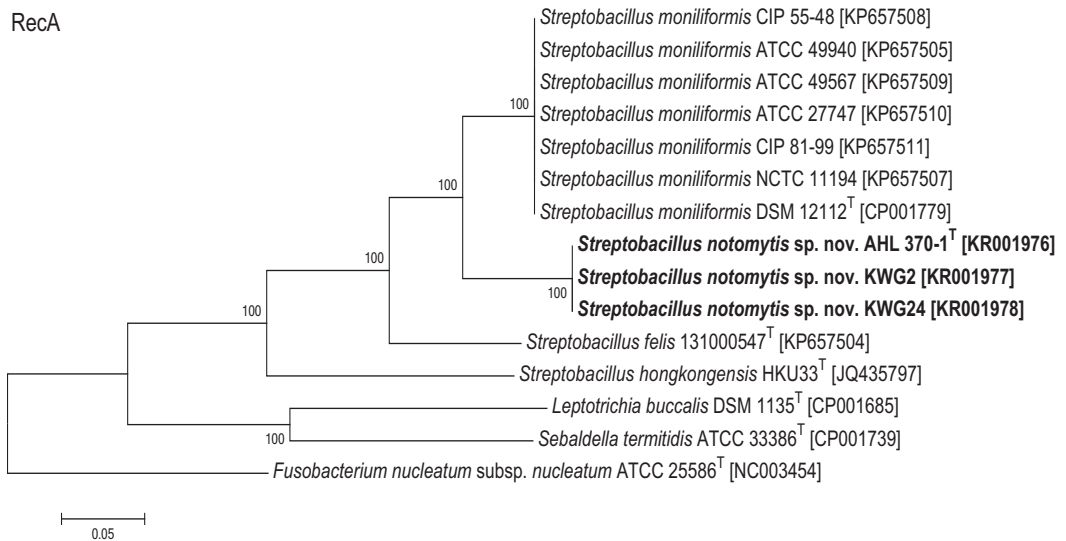
6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S3. Phylogenetic trees based on partial *recA* (1032 nt) and RecA (340 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain AHL 370-1^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino acid side, respectively..

recA



RecA



Streptobacillus notomytis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

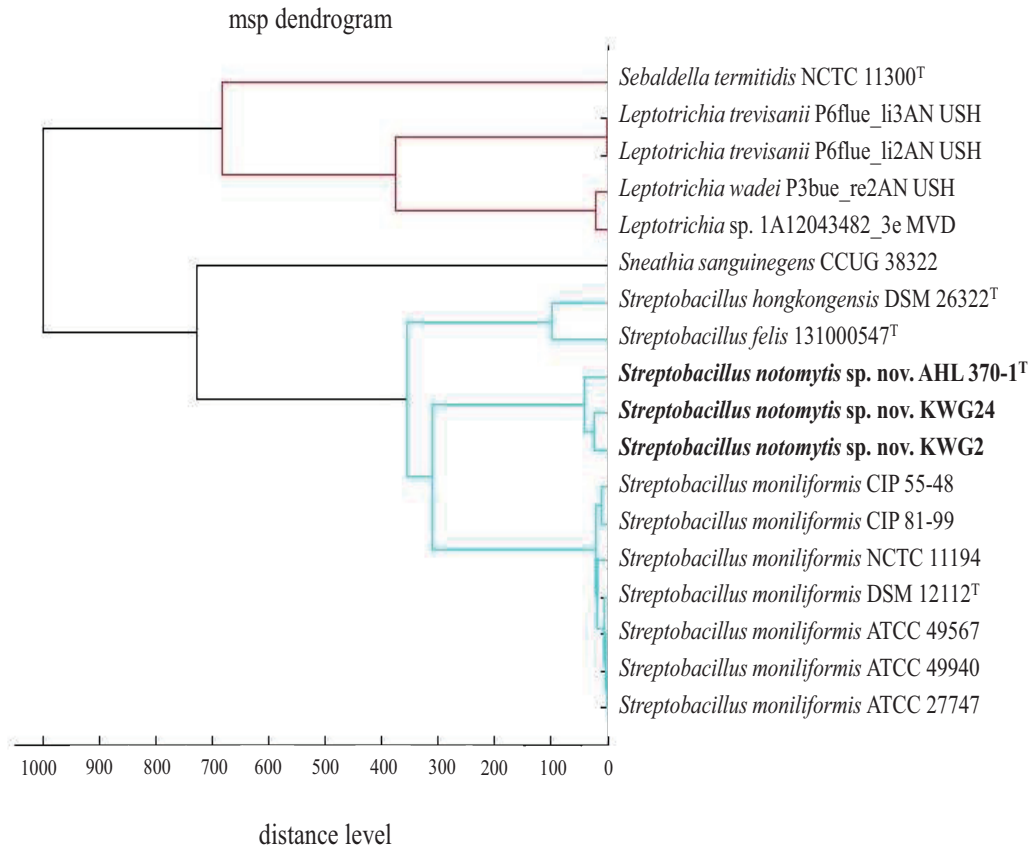
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S4. Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T, *Streptobacillus notomytis* sp. nov. AHL 370-1^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T and *Streptobacillus moniliformis* reference strains were recorded using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra from *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112^T); ^T type strain, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK.



Streptobacillus notomytis sp. nov. isolated from an Australian spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* LEVADITI et al. 1925, EISENBERG et al. 2015 emend.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Werner Nicklas⁵, Jörg Rau⁶, Norman Mauder⁶, Nicola Hofmann⁷, Koichi Imaoka⁸, Masanobu Kimura⁸ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Institut für Mehrphasenprozesse, D-30167 Hannover, Germany; ⁸ Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.6 *Streptobacillus ratti* sp. nov., isolated from a black rat (*Rattus rattus*).

Eisenberg, T.*, K. Imaoka, M. Kimura, S. P. Glaeser, C. Ewers,
T. Semmler, J. Rau, W. Nicklas, T. Tanikawa & P. Kämpfer

Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(4): 1620-1626.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000869>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript Including References (Word document)

1 *Streptobacillus ratti* sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

2

3 Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴,

4 Torsten Semmler⁵, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

5

6 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany

7 ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640,

8 Tokyo, Japan

9 ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392

10 Giessen, Germany

11 ⁴ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen,

12 D-35392 Giessen, Germany

13 ⁵ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany

14 ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany

15 ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany

16 ⁸ Ikari Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

17

18 **Corresponding author:**

19 Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ H13; D-

20 35392 Giessen, Germany, Phone: +49 641 4800 5219; Fax: +49 641 4800 5268. Dr. Tobias

21 Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

22

23 **Running title:** Description of *Streptobacillus ratti* sp. nov.

24 **Content category:** New Taxa

25 **Subsection:** Other Bacteria/ Fusobacteriia

26 **Keywords:** *Streptobacillus*, *ratti*, Fusobacteriales, novel, black rat, *Rattus rattus*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

27

28 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the gene sequences 16S rRNA, *gyrB*,
29 *groEL*, and *recA* as well as for the complete genome sequence of strain OGS16^T are
30 KR001922, KR001960, KR001941 and KR001979 as well as LKKW00000000 (BioSample
31 SAMN04099675), respectively. Further complete genome sequences for *Streptobacillus*
32 *hongkongensis* DSM26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T and *Streptobacillus notomytis*
33 AHL 370-1^T are BioProject PRJNA304683 (Accession SAMN04306666), BioProject
34 PRJNA304683 (Accession SAMN04306665) and LJRV00000000 (BioSample
35 SAMN04038436), respectively. Further sequences from reference strains used in this study
36 are summarized in Table S1.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

37 SUMMARY

38 From an oral swab of a feral black rat an indole-, oxidase- and catalase- negative,
39 non-motile bacterium was isolated in 2007 in Japan that stained Gram-negative and
40 showed a pleomorphic, rod-shaped, non-spore-forming appearance. Based on 16S rRNA
41 gene sequence analyses the strain OGS16^T was assigned to the genus *Streptobacillus* with
42 sequence similarities of 99.3%, 99.0%, 98.6% and 95.5% to *Streptobacillus moniliformis*,
43 *Streptobacillus notomytis*, *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus hongkongensis*,
44 respectively. Strain OGS16^T could also clearly be differentiated from other
45 *Streptobacillus* spp. by *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence
46 analysis. DNA-DNA relatedness as obtained by average nucleotide identity
47 demonstrated 89.10% between strain OGS16^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM
48 12112^T.

49 Chemotaxonomic and physiological data of strain OGS16^T were in congruence with
50 other closely related members of the family *Leptotrichiaceae*, represented by highly
51 similar enzyme profiles and fatty acid patterns. MALDI-TOF MS analysis also proved
52 suitable in unequivocally discriminating strain OGS16^T from all currently described
53 taxa of the genus *Streptobacillus*. On the basis of these data we propose the novel species
54 *Streptobacillus ratti* sp. nov. with the type strain OGS16^T (= JCM 31098^T = DSM
55 101843^T). The G+C content of the DNA of the type strain is 25.9 mol%, genome size is
56 1.50 Mbp.

57

58 *Streptobacillus moniliformis* represented for almost a century a monotypic species
59 within the genus *Streptobacillus* (Levaditi *et al.*, 1925) (*Streptobacillus*, *Leptotrichiaceae*,
60 *Fusobacteriales*) causing rat bite fever (RBF) and Haverhill fever (HF) (Elliott, 2007). Fever,
61 malaise, muscle pain, arthritis and abscess formation, endocarditis, bacteraemia, and
62 maculopapular, petechial or pustular rash as well as vomiting and pharyngitis are common

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

63 symptoms of acute RBF (Gaastra *et al.*, 2009). This bacterial zoonosis is predominantly
64 transmitted through rat bites and scratches (Gaastra, *et al.*, 2009), whereas HF represents a
65 second, food-borne form of *Streptobacillus moniliformis* infection, which is transmitted by
66 direct or indirect contact with rat urine (Bleich & Nicklas, 2008, Regnath *et al.*, 2015).
67 Approximately 50-100% of wild rats usually asymptotically carry *Streptobacillus*
68 *moniliformis* in their oro- or nasopharynx and shed the organism with saliva and urine (Elliott,
69 2007, Kimura *et al.*, 2008). Other rodent as well as companion and exotic animal species and
70 livestock are principally reported to be susceptible to clinical infection besides rats and mice,
71 but mice may strain-dependently develop disease (Boyer *et al.*, 1958, Das, 1986, Ditchfield *et*
72 *al.*, 1961, Gaastra, *et al.*, 2009, Glünder *et al.*, 1982, Gourlay *et al.*, 1982, Mohamed *et al.*,
73 1969, Russell & Straube, 1979, Smallwood, 1929, Valverde *et al.*, 2002, Wullenweber *et al.*,
74 1990, Yamamoto & Clark, 1966).
75 Recently, *Streptobacillus hongkongensis* (Woo *et al.*, 2014), *Streptobacillus felis* (Eisenberg
76 *et al.*, 2014, Eisenberg *et al.*, 2015a) and *Streptobacillus notomytis* (Eisenberg *et al.*, in press)
77 were described as new species, all of which causing considerable human or animal sequelae.
78 Furthermore, various *Streptobacillus* phylotypes consistent with 16S rRNA gene-based
79 operational taxonomic units were described from Philippine mustard, fish and microbiomes of
80 squirrels, cotton rats, dogs, ducks, dolphins, sea lions and humans (Bik *et al.*, 2010, Chaves-
81 Moreno *et al.*, 2015, Dewhirst *et al.*, 2012, Hullar *et al.*, 2015, Larcia *et al.*, 2011, Maher *et*
82 *al.*, 1995, Palmer *et al.*, 1994, Strong *et al.*, 2013, Xenoulis *et al.*, 2008) (Fig. S1). A series of
83 *Streptobacillus* sp. strains KWG2, KWG24, OGS16^T isolated from Japanese black rats
84 (*Rattus rattus*) (Kimura, *et al.*, 2008) was recently found to represent indeed two different
85 species (Eisenberg *et al.*, 2015b), one of which was recently described as *Streptobacillus*
86 *notomytis* (Eisenberg, *et al.*, in press). Strain OGS16^T gave evidence for a further novel
87 species and the respective strain is object of the present description.

88

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

89 Strain OGS16^T was originally isolated from the oral cavity of a Japanese black rat
90 (Kimura, *et al.*, 2008) in a rearing facility of a pest control company (Ikari Corporation,
91 Chiba, Japan). The ancestors of the rats in the facility were captured in 1989 on Chichijima,
92 one of the Ogasawara Islands (Bonin Islands), located some 1,000 km south of Japan.
93 OGS16^T grows after 1-2 days of incubation at 37°C under a capnophilic atmosphere of 10%
94 CO₂ on Columbia agar with 5% sheep blood (SBA; Oxoid, Wesel, Germany). On this agar,
95 strain OGS16^T was able to grow also weakly at 43°C, but not at 10, 20 or 50°C. The strain
96 could best be cultivated on TSA (tryptone soy agar, Oxoid), supplemented with 20% horse
97 serum, but also on Schaedler agar as well as in liquid media (tryptone soy bouillon [TSB],
98 brain-heart infusion and peptone broth, supplemented with 20% cattle or horse serum) but not
99 on Gassner and MacConkey agar (all Oxoid). Growth is fastidious and colonies are
100 indistinguishable from *Streptobacillus moniliformis*, displaying butyraceous, dry colonies.
101 Gram-staining was done according to the Hucker method as described previously (Gerhardt *et*
102 *al.*, 1994) and cell morphologies were assessed with cells grown for 3 days at 37°C on SBA
103 using a Leitz Diaplan light microscope at ×1000 magnification. Gram staining revealed
104 Gram-negative pleomorphic, fusiform to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated,
105 non-acid-fast rods that were sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings and were
106 arranged in chains and clumps. Single laying rod-shaped cells were approximately 0.45 +/-
107 0.1 µm wide and 0.83 +/- 0.08 µm long.
108 Whole genome sequencing was carried out with strain OGS16^T. Genomic DNA was therefore
109 extracted from a 72 h bacterial culture with a commercial kit according to the manufacturer's
110 instructions (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, Epicentre, distributed
111 by Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany). De novo assembly was performed with
112 CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). For automatic
113 annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology
114 (Aziz *et al.*, 2008).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

115 For the first phylogenetic placement phylogenetic trees based on nearly full-length
116 16S rRNA gene sequences were constructed with MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) with the
117 maximum-likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993)
118 and rapid bootstrap analysis and the maximum-parsimony (MP) method using the Subtree-
119 Pruning-Regrafting (SPR) algorithm (Nei & Kumar, 2000). Both trees based on 1108
120 nucleotide positions and 100 replications (bootstrap analysis) (Felsenstein, 1985).

121

122 The sequenced 16S rRNA gene fragment of strain OGS16^T represents a stretch of
123 1482 unambiguous nucleotides between sequence positions 28 to 1499 (*E. coli* numbering)
124 (Brosius *et al.*, 1978). The 16S rRNA gene sequence identity of strain OGS16^T was highest
125 with type strains of *Streptobacillus moniliformis* (99.3%), *Streptobacillus notomytis* (99.0%),
126 *Streptobacillus felis* (98.6%) and *Streptobacillus hongkongensis* (95.5%), followed by
127 *Sneathia sanguinegens* (93.0%). Lower (<92%) sequence similarities to all other taxa were
128 observed. ML as well as MP treeing revealed a distinct cluster (98% bootstrap support) of
129 strain OGS16^T with all other *Streptobacillus* type strains (Fig. 1), clearly separated from the
130 genera *Sneathia*, *Sebaldella* and *Leptotrichia*. The closest similarities were observed between
131 strain OGS16^T and all seven *Streptobacillus moniliformis* strains from different sources
132 (Table S2) including the type strain, which is supported by a bootstrap value of 78%. Two
133 earlier designed PCR assays for the detection of *Streptobacillus moniliformis* resulted in
134 characteristic amplicon sizes of approximately 269 and 1222 bp also for strain OGS16^T
135 (primers S5: 5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3' and AS2: 5'-
136 GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3') (Kimura, *et al.*, 2008) and (primers SbmF: 5'-
137 GAGAGAGCTTTGCATCCT-3' and SbmR: 5'-GTAACCTCAGGTGCAACT-3') (Nicklas,
138 cited in (Rohde *et al.*, 2008)). It was recently found that this PCR assays are rather 'genus
139 specific' than 'species specific' (Eisenberg, *et al.*, 2015b).

140

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

141 For a more detailed view into the phylogenetic relationship of strain OGS16^T and
142 closely related other *Streptobacillus* species the criteria of Woo, *et al.* (2014) were
143 considered. Phylogenetic analyses based on both partial nucleotide and amino acid sequences
144 of *gyrB*, *groEL*, and *recA* genes were performed to regard also non-synonymous substitutions
145 (Glaeser & Kämpfer, 2015). Respective nucleotide and amino acid sequences were aligned
146 using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implemented in MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011).
147 Pairwise sequence similarities were calculated based on *p*-distances (calculated without an
148 evolutionary model). Phylogenetic trees were generated using the maximum-likelihood
149 method with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that
150 a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I) (for nucleotide sequences) and the
151 Jones-Thornton-Taylor model (JTT; (Jones *et al.*, 1992)) +G +I (for amino acid sequences).
152 All trees based on 100 replications (bootstrap analysis).
153 Based on partial nucleotide and more conserved amino acid sequences of *gyrB*, *groEL* and
154 *recA* respective phylogenetic trees showed in all but the GyrB (amino acid) tree the formation
155 of monophyletic clusters including all *Streptobacillus* species. Strain OGS16^T clustered (with
156 high bootstrap support) closest but in a distinct branch between *Streptobacillus moniliformis*
157 and *Streptobacillus notomytis* strains (Fig. S2-S4). In the GyrB amino acid tree strain OGS16^T
158 clustered together with all other *Streptobacillus moniliformis* strains in one clade. The clear
159 genetic distinction of strain OGS16^T was supported by a comparison of nucleotide and amino
160 acid sequence differences that were always considerably lower between strain OGS16^T and
161 strains of the other *Streptobacillus* species (Table S2).
162 DNA-DNA hybridization (DDH) of *Streptobacillus* species gave weak results (Eisenberg, *et*
163 *al.*, 2015b). Instead, average nucleotide identity (ANI) was carried out according to the
164 method described by (Goris *et al.*, 2007). The overall DNA-DNA relatedness between strain
165 OGS16^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T was 89.10% as determined by ANI,
166 and therefore it is evident that they are separate species (Richter & Rossello-Mora, 2009). The

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

167 same assertion was supported by a comparison of genomes with the remaining *Streptobacillus*
168 type strains, in that ANI values between OGS16^T and *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T,
169 *Streptobacillus felis* 131000547^T and *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T were
170 calculated with 89.00%, 81.96% and 74.77%, respectively. As a countercheck and to avoid
171 statistical uncertainty we could confirm these results also by using the *in-silico* genome-to-
172 genome comparison tool (GGDC 2.0; <http://ggdc.dsmz.de/>) that is independently working
173 from ANI and was found to yield higher correlations with conventional DDH (Meier-Kolthoff
174 *et al.*, 2013). Strain OGS16^T constantly displayed DDH estimate levels of <40.40% (bootstrap
175 confidence intervals 20.4-38.0%) to all other *Streptobacillus* species using formula 2
176 (identities/HSP length) (data not shown).

177 Strain OGS16^T displayed three conserved signature indels (CSIs) in amino acid sequences of
178 MreB/MrI family protein (MreB/MrI; 2 aa deletion), Alanine-tRNA ligase (AlaS; 5 aa
179 insertion) and RecA (2 aa insertion) that were recently found to be specific for the
180 *Leptotrichiaceae* (data not shown)(Gupta & Sethi, 2014).

181

182 It is evident from the results of the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL* and *recA* gene sequence
183 analysis and also from ANI, that strain OGS16^T is different to the genera *Sneathia*,
184 *Sebaldella*, *Leptotrichia* and to the species *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus*
185 *hongkongensis*, *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus notomytis*.

186 Physiological results are considerably weak to unequivocally differentiate *Streptobacillus*
187 species (Eisenberg, *et al.*, 2015b). The physiological characterization of strain OGS16^T is
188 given in the species description and in Table 1. Biochemical profiling was carried out
189 according to the manufacturer's instructions using commercial test systems, i.e. VITEK2-
190 compact with the NHI card and API-ZymTM (both bioMérieux, Nürtingen, Germany). Vitek
191 NHI identified strain OGS16^T as *Neisseria cinerea* or *Neisseria elongata* (bio profiles
192 0222000000 or 0273000000) and *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

193 *hongkongensis* DSM 26322^T and *Streptobacillus felis* 131000547^T as *Neisseria cinerea* with
194 98% (0232000000), 93% (0220000040) and 99% (0220000000) confidence and
195 *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T as *Neisseria elongata* (bio profile 0233000000),
196 respectively. Physiological characteristics alone failed to possess enough discriminatory
197 power to differentiate strain OGS16^T from type strains of *Streptobacillus moniliformis* DSM
198 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T and
199 *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T. Antimicrobial susceptibility testing was in default of
200 validated clinical breakpoints limited to the assessment of minimal inhibitory concentrations
201 (MIC) as obtained by broth microdilution testing (Merlin Diagnostika) described previously
202 (Eisenberg, *et al.*, 2015b). Strain OGS16^T displayed MIC as follows (in µg/ml):
203 amoxicillin/clavulanic acid (<2/1), colistin (≥1), florfenicol (<1),
204 trimethoprim/sulfamethoxazol (<0.25/4.75), tetracycline (≤0.125), cephalothin (<1),
205 enrofloxacin (≥2), erythromycin (≥1), penicillin G (<0.0625), tiamulin (<8), tilmicosin (<1),
206 ceftiofur (≤0.25), gentamicin (≥0.5), spectinomycin (≥4), tulathromycin (<2) and ampicillin
207 (≥0.25).

208 For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-
209 TOF MS), 24h incubated strains were selected from SBA plates and subsequently transferred
210 to steel targets using the direct transfer protocol according to the manufacturer's instructions
211 (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Analysis was performed on a
212 MALDI-TOF MS Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 5627, Bruker
213 Daltonics) comprised only one entry from *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T. With
214 this database alone, strain OGS16^T could not be identified yielding only score levels between
215 1.3 and 1.5. Following the manual inclusion of respective spectra from strain OGS16^T as well
216 as other *Streptobacillus* type strains to the database all *Streptobacillus* species could be
217 differentiated based on spectral differences. Furthermore, MALDI spectra of strain OGS16^T
218 turned out to be most closely related to *Streptobacillus notomytis* and *Streptobacillus*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

219 *moniliformis*. A dendrogram including selected main spectra peak lists (msp) of the family
220 *Leptotrichiaceae* from the Bruker database as well as manual database entries of strain
221 OGS16^T, six further reference strains of *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus*
222 *hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus notomytis*
223 AHL 370-1^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T is depicted in Fig. S5 and shows,
224 however, a separate position of spectra from strain OGS16^T compared to those from other
225 *Streptobacillus* spp.

226 Fatty acid composition analysis followed (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996) (Table 2). The
227 major fatty acids C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} and C_{18:2} (summed feature 5) as described by (Pins *et*
228 *al.*, 1996, Rowbotham, 1983, Rygg & Bruun, 1992) could also be detected in our study,
229 thereby confirming the affiliation of OGS16^T to *Streptobacillus*.

230 The separate position of strain OGS16^T as a distinct species of *Streptobacillus* is well
231 supported by the molecular differences obtained by ANI, the phylogenetic analyses of
232 established housekeeping genes (Figs. 1 and S2-S4) and the differences based on MALDI-
233 TOF MS (Fig. S5). Growth characteristics are in full congruence with other members of the
234 genus. This is in particular the fastidious growth of strain OGS16^T and the dependence on
235 capnophilic environment with 10% CO₂ in the presence of blood or serum, its negative
236 reactivity for cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole, the production of cotton ball-
237 like appearance in liquid media, its inducible L-forms beside “normal” small butyraceous
238 colonies, its Gram-negative filamentous rod-shaped phenotype arranged in chains and clumps
239 with irregular bulbar swellings and its presumed broad antimicrobial susceptibilities (Table
240 1). These characteristics also justify the placement of strain OGS16^T in the genus
241 *Streptobacillus* and distinguish it from *Sneathia sanguinegens* and “*Sneathia amnii*” (Woo, *et*
242 *al.*, 2014). Summarising, genotypical and phenotypical differences prove strain OGS16^T as a
243 novel species different from *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis*,
244 *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus notomytis*. For this reason, we are here proposing the

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

245 novel species *Streptobacillus ratti* sp. nov. with the type strain OGS16^T (= JCM 31098^T =
246 DSM 101843^T)

247

248 **Description of *Streptobacillus ratti* sp. nov.**

249 *Streptobacillus ratti* (rat'ti. L. gen. n. ratti of the rat)

250 Growth can be observed after 1-2 days at 37°C and depends on a capnophilic
251 atmosphere of 5-10% CO₂ on SBA, TSA or TSB with 20% horse serum, but only weak
252 growth is observed on Schaedler and chocolate agar and no growth on Gassner and
253 MacConkey agar. In an anaerobic environment reduced growth can be observed. Colonies are
254 tiny, dry, butyraceous and slightly opaque, measuring 0.1-0.4 mm in diameter. Colonies are
255 initially non-haemolytic on SBA, but in aged cultures (>10 d) a tender zone of α-haemolysis
256 can be observed. Conversion to L-phase or transitional phase variant may rarely occur
257 spontaneously during cultivation. In liquid media, streptobacillary growth can be detected
258 after 2-5 days as typical “cotton ball” or “bread crumb”-like appearance.

259 Microscopic morphological features are indicative of Gram-negative, pleomorphic, fusiform
260 to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods with a size of 0.45
261 +/- 0.1 μm (width) and 0.83 +/- 0.08 μm (length) that are arranged in chains and clumps, also
262 sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Positive for esterase lipase (C8) and
263 α-chymotrypsin. Negative for motility, acid phosphatase, alkaline phosphatase, esterase (C4),
264 lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase, trypsin,
265 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-
266 glucosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase, α-fucosidase,
267 cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole. The major fatty acids are C_{16:0} (palmitic
268 acid), C_{18:0} (stearic acid), and C_{18:1ω9c} (oleic acid).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

269 The type strain OGS16^T (= JCM 31098^T = DSM 101843^T) was isolated from the oral cavity
270 of an asymptomatic black rat (*Rattus rattus*). The G+C content of the DNA of the type strain
271 is 25.9 mol%, genome size is 1.50 Mbp.

272

273 **Acknowledgement**

274 We thank Ulrike Kling, Anna Mohr, Katharina Engel, Mersiha Curić, Jens
275 Heinbächer, Ursula Leidner, Andrea Erles-Kemna, Bernhard Berkus, Maria Sowinsky and
276 Gundula Will for excellent technical assistance and Barbara Gamb for making even the most
277 exotic manuscripts available.

278

279 **References**

280 **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & 23 other authors (2008).** The RAST Server: rapid
281 annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.

282 **Bik, E. M., Rohlik, C. M., Chow, E., Carlin, K. P., Jensen, E. D., Venn-Watson, S. &**
283 **Relman, D. A. (2010).** Indigenous microbiota of marine mammals. In 13th International
284 Symposium on Microbial Ecology Seattle Washington.

285 **Bleich, A. & Nicklas, W. (2008).** Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as
286 laboratory or pet animals [in German]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **121**, 241-255.

287 **Boyer, C. I. J., Bruner, D. W. & Brown, J. A. (1958).** A *Streptobacillus*, the cause of
288 tendon-sheath infection in turkeys. *Avian Dis* **2**, 418-427.

289 **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide
290 sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**,
291 4801-4805.

292 **Chaves-Moreno, D., Plumeier, I., Kahl, S., Krismer, B., Peschel, A., Oxley, A. P.,**
293 **Jauregui, R. & Pieper, D. H. (2015).** The microbial community structure of the cotton rat
294 nose. *Environ Microbiol Rep*.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 295 **Das, A. M. (1986).** *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. *Ind J Comp*
296 *Microbiol Immunol Infect Dis* **7**, 115.
- 297 **Dewhirst, F. E., Klein, E. A., Thompson, E. C., Blanton, J. M., Chen, T., Milella, L.,**
298 **Buckley, C. M., Davis, I. J., Bennett, M. L. & Marshall-Jones, Z. V. (2012).** The canine
299 oral microbiome. *PLoS One* **7**, e36067.
- 300 **Ditchfield, J., Lord, L. H. & McKay, K. A. (1961).** *Streptobacillus moniliformis* infection in
301 a dog. *Can Vet J* **2**, 457-459.
- 302 **Eisenberg, T., Nesseler, A., Nicklas, W., Spamer, V., Seeger, H. & Zschöck, M. (2014).**
303 *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports* **2014**,
304 1-7.
- 305 **Eisenberg, T., Glaeser, S., Nicklas, W., Mauder, N., Contzen, M., Aladelbi, K. &**
306 **Kämpfer, P. (2015a).** *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. *Int J*
307 *Syst Evol Microbiol* **65**, 2172-2178.
- 308 **Eisenberg, T., Nicklas, W., Mauder, N., Rau, J., Contzen, M., Semmler, T., Hofmann,**
309 **N., Aladelbi, K. & Ewers, C. (2015b).** Phenotypic and genotypic characteristics of members
310 of the genus *Streptobacillus*. *PLoS One* **10**, e0134312.
- 311 **Eisenberg, T., Glaeser, S. P., Ewers, C. & 8 other authors.** *Streptobacillus notomytis* sp.
312 nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended
313 description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend. *Int J Syst*
314 *Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijsem.0.000654. [Epub ahead of print]
- 315 **Elliott, S. P. (2007).** Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* **20**,
316 13-22.
- 317 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap.
318 *Evolution* **39**, 783-791.
- 319 **Gaastra, W., Boot, R., Ho, H. T. & Lipman, L. J. (2009).** Rat bite fever. *Vet Microbiol* **133**,
320 211-228.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 321 **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. e. (1994).** *Methods for*
322 *general and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 323 **Glaeser, S. P. & Kämpfer, P. (2015).** Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
324 taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **38**, 237-245.
- 325 **Glünder, G., Hinz, K. H. & Stiburek, B. (1982).** Joint disease in turkeys caused by
326 *Streptobacillus moniliformis* in Germany [in German]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **89**, 367-
327 370.
- 328 **Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. &**
329 **Tiedje, J. M. (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-
330 genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- 331 **Gourlay, R. N., Flanagan, B. F. & Wyld, S. G. (1982).** *Streptobacillus actinoides* (*Bacillus*
332 *actinoides*): isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in
333 gnotobiotic calves. *Res Vet Sci* **32**, 27-34.
- 334 **Gupta, R. S. & Sethi, M. (2014).** Phylogeny and molecular signatures for the phylum
335 Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe* **28**, 182-198.
- 336 **Hullar, M. A., Lancaster, S. M., Li, F. & 8 other authors (2015).** Enterolignan-producing
337 phenotypes are associated with increased gut microbial diversity and altered composition in
338 premenopausal women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **24**, 546-554.
- 339 **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation
340 data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**,
341 275-282.
- 342 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of
343 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- 344 **Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. &**
345 **Yamada, A. (2008).** Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase
346 chain reaction. *Microbiol Immunol* **52**, 9-15.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 347 **Larcia, L. L., 2nd, Estacio, R. C. & Dalmacio, L. M. (2011).** Bacterial diversity in
348 Philippine fermented mustard (burong mustasa) as revealed by 16S rRNA gene analysis.
349 *Benef Microbes* **2**, 263-271.
- 350 **Levaditi, C., Nicolau, S. & Poincloux, P. (1925).** Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus*
351 *moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. *C R Acad Sci* **180**,
352 1188-1190.
- 353 **Maher, M., Palmer, R., Gannon, F. & Smith, T. J. (1995).** Relationship of a novel bacterial
354 fish pathogen to *Streptobacillus moniliformis* and the Fusobacteria group, based on 16S
355 ribosomal RNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 79-84.
- 356 **Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P. & Goker, M. (2013).** Genome sequence-
357 based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC*
358 *Bioinformatics* **14**, 60.
- 359 **Mohamed, Y. S., Moorhead, P. D. & Bohl, E. H. (1969).** Natural *Streptobacillus*
360 *moniliformis* infection of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. *Avian Dis*
361 **13**, 379-385.
- 362 **Nei, M. & Kumar, S. (2000).** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford
363 University Press.
- 364 **Palmer, R., Drinan, E. & Murphy, T. (1994).** A previously unknown disease of farmed
365 Atlantic salmon: pathology and establishment of bacterial aetiology. *Dis Aquat Org* **19**, 7-14.
- 366 **Pins, M. R., Holden, J. M., Yang, J. M., Madoff, S. & Ferraro, M. J. (1996).** Isolation of
367 presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital
368 tract. *Clin Infect Dis* **22**, 471-476.
- 369 **Regnath, T., Kurb, N., Wolf, M. & Ignatius, R. (2015).** Rat-bite fever – two cases of
370 infection with *Streptobacillus moniliformis* within two months [in German]. *Dtsch Med*
371 *Wochenschr* **140**, 741-743.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 372 **Richter, M. & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the
373 prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19126-19131.
- 374 **Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008).** Case report: Abscessation due to *Streptobacillus*
375 *moniliformis* in a rat [in German]. *Prakt Tierarzt* **89**, 466-473.
- 376 **Rowbotham, T. J. (1983).** Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. *Lancet* **2**,
377 567.
- 378 **Russell, E. G. & Straube, E. F. (1979).** Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos*
379 *cinereus*). *J Wildl Dis* **15**, 391-394.
- 380 **Rygg, M. & Bruun, C. F. (1992).** Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with
381 septicemia in a child. *Scand J Infect Dis* **24**, 535-540.
- 382 **Smallwood, R. P. (1929).** Ratbite fever from the bite of a pig. *Brit Med J* **29**, 1159.
- 383 **Strong, T., Dowd, S., Gutierrez, A. F. & Coffman, J. (2013).** Amplicon pyrosequencing of
384 wild duck eubacterial microbiome from a fecal sample reveals numerous species linked to
385 human and animal diseases [v1; ref status: awaiting peer review, <http://f1000r.es/1yy>]
386 *F1000Research* **2**, 1-7.
- 387 **Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the
388 control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512-
389 526.
- 390 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).**
391 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary
392 distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- 393 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the
394 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
395 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 396 **Valverde, C. R., Lowenstine, L. J., Young, C. E., Tarara, R. P. & Roberts, J. A. (2002).**
397 Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol* **31**,
398 345-349.
- 399 **Woo, P. C., Wu, A. K., Tsang, C. C., Leung, K. W., Ngan, A. H., Curreem, S. O., Lam,**
400 **K. W., Chen, J. H., Chan, J. F. & Lau, S. K. (2014).** *Streptobacillus hongkongensis* sp.
401 nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis, and emended descriptions of the
402 genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. *Int J Syst Evol Microbiol*
403 **64**, 3034-3039.
- 404 **Wullenweber, M., Kaspareit-Rittinghausen, J. & Farouq, M. (1990).** *Streptobacillus*
405 *moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of
406 different strains of mice. *Lab Anim Sci* **40**, 608-612.
- 407 **Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M. &**
408 **Suchodolski, J. S. (2008).** Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities
409 imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol*
410 *Ecol* **66**, 579-589.
- 411 **Yamamoto, R. & Clark, G. T. (1966).** *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet*
412 *Rec* **79**, 95-100.
- 413

- 414 **Table 1.** Physiological characteristics of *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16^T, and the type strains *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus*
415 *hongkongensis*, *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus notomytis* obtained by VITEK2-compact with the NHI card[†], API-Zym[#] (both bioMérieux)
416 and classical reactions[§]; Taxa: 1, *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16^T; 2, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 3, results from six
417 *Streptobacillus moniliformis* reference strains (ATCC 27747, ATCC 49567, ATCC 49940, NCTC 11194, CIP 55-48 and CIP 81-99); 4,
418 *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 5, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 6, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T +, positive; -, negative;
419 +/- variable. Congruent results are solely presented in the species description.

Compound	1	2	3	4	5	6
Haemolysis on SBA [§]	+	-	+/-	+	+	-
Phosphatase (unspecified) [†]	-	-	-	+	-	-
Phenylalanine arylamidase [†]	+	+	+	-	-	+
Ala-Phe-Pro arylamidase [†]	+	+	+	-	-	+
Alkaline phosphatase [†]	-	w	+/-	+	+	-
Esterase (C4) [‡]	-	w	+/-	w	+	+
Esterase lipase (C8) [‡]	+	+	w/+	w	+	+
Leucine arylamidase [†]	-	-	+/-	-	-	w
α -Chymotrypsin [†]	+	+	w/+	-	-	+

Acid phosphatase [†]	-	w	-/w	+	+	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [†]	-	-	-	w	-	-
α-Glucosidase [†]	-	-	-	-	-	-

420 # score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0-2: negative [-], 3: weak [w], 4-5: positive [+])

421

- 422 **Table 2.** Cellular fatty acid pattern of *Streptobacillus ratti* sp. nov. OGS16^T and type strains of the four *Streptobacillus* species. Taxa: 1, *Streptobacillus ratti* sp. nov. OGS16^T; 2, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 3, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 4, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 5, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T Biomass for fatty acid analysis was harvested after 3 days of growth in capnophilic environment with 10% CO₂ on Columbia sheep blood agar at 36°C.

Fatty acid	1	2	3	4	5
C _{14:0}	1.5	1.5	-	1.5	1.6
C _{15:0iso}	-	3.9	3.0	2.1	-
C _{16:0}	28.7	27.8	26.5	28.2	29.4
C _{17:0}	1.5	1.5	-	1.5	-
summed feature 5 C _{18:0} ANTE/C _{18:2ω6,9c}	8.5	13.3	5.6	12.1	13.0
C _{18:1 ω6c}	5.9	2.2	-	2.0	26.6
C _{18:1 ω9c}	23.6	25.1	30.2	24.1	29.4
C _{18:0}	26.3	23.5	34.7	21.6	-
C _{20:4ω6,9,12,15c}	-	1.2	-	1.1	-

427 For unsaturated fatty acids, the position of the double bond is located by counting from the methyl (ω) end of the carbon chain. *cis* isomers are
428 indicated by the suffix *c*.

429 **Fig. 1.** Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16^T within the family *Leptotrichiaceae*.
 430 The tree was generated with MEGA5 (Tamura, *et al.*, 2011) with the maximum-likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model (Tamura
 431 & Nei, 1993) and rapid bootstrap analysis (100 bootstraps) and is based on a 16S rRNA gene sequence alignment of 1108 nt. GenBank accession
 432 numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates). Bar, 0.05 nucleotide substitutions per

433 side

434

435

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

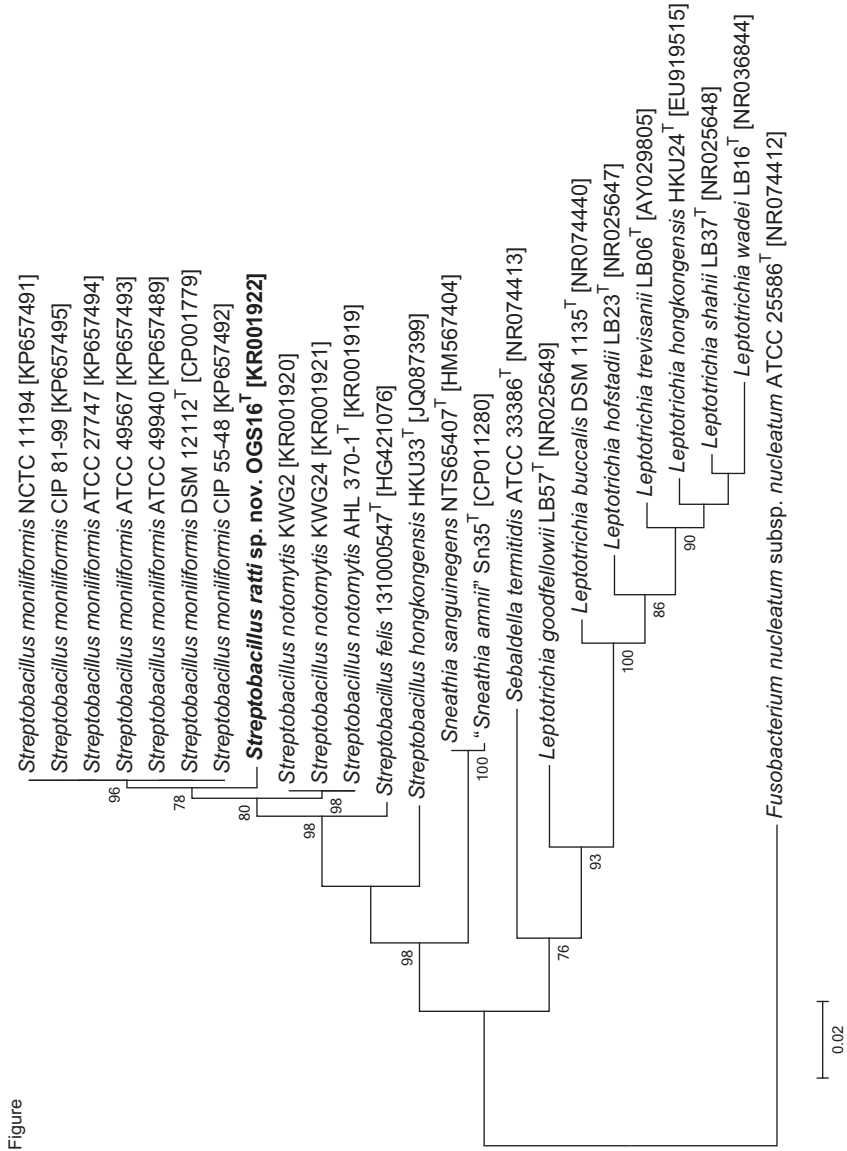


Table S1. Overview of gene sequences of *Streptobacillus rattii* sp. nov., *Streptobacillus notomytis*, *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus moniliformis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes and from DSM 12112^T (CP001779 (Nolan et al., 2009)). The accession number for the genome sequence of *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16^T is LKKW000000000 (BioSample SAMN04099675).

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA	gyrB	groEL	recA
<i>Streptobacillus rattii</i> sp. nov.	OGS16 ^T	black rat (<i>Rattus rattus</i>), oral cavity, Japan	KR001922	KR001960	KR001941	KR001979
<i>Streptobacillus notomytis</i>	AHL 370-1 ^T	Australian spinifex hopping mouse (<i>Notomys alexis</i>) with septicaemia, Australia	KR001919	KR001957	KR001938	KR001976
<i>Streptobacillus felis</i>	131000547 ^T	cat with pneumonia, Germany	HG42.1076	KP676101	KP657496	KP657504
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49940	rat with otitis media, Germany	KP657489	KP676102	KP657497	KP657505
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	NCTC 11194	human case of RBF, UK	KP657491	KP676104	KP657499	KP657507
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	CIP 55-48	mouse with lymphadenitis, UK	KP657492	KP676105	KP657500	KP657508
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 49567	mouse with lymphadenitis, Germany	KP657493	KP676106	KP657501	KP657509
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	ATCC 27747	turkey with septic arthritis, USA	KP657494	KP676107	KP657502	KP657510
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSM 12112 ^T	human case of rat bite fever, France	CP001779	CP001779	CP001779	CP001779

Streptobacillus rattii sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Inaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaesser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁵, Jörg Rauf⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tamikawa⁸ and Peter Kämpfer⁹

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikarit Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

Table S2. Sequence similarities of *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16¹ compared to *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hongkongensis*, *Streptobacillus felis* and *Streptobacillus notomysis*. Sequence similarities were calculated based on p-distances determined in MEGA5. 16S rRNA gene sequence similarities, *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence similarities. n: number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the phylogenetic trees (Fig S1-S3). Strain HKU33¹ of *Streptobacillus hongkongensis* included in this analysis was analysed by Woo et al. (2014). Sequences were obtained from GenBank.

	<i>Streptobacillus rattii</i> (n=1) - <i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=7)	<i>Streptobacillus rattii</i> (n=1) - <i>Streptobacillus hongkongensis</i> (n=1)	<i>Streptobacillus rattii</i> (n=1) - <i>Streptobacillus felis</i> (n=1)	<i>Streptobacillus rattii</i> (n=1) - <i>Streptobacillus notomysis</i> (n=1)	<i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=7)
<i>groEL</i> (556 nt)	92.6-92.8	79.5	81.8	93.3	99.6-100
GroEL (185 aa)	97.3	80.4	89.8	97.3	100
<i>recA</i> (735 nt)	92.0	78.4	85.3	91.4	100
RecA (244 aa)	99.6	98.3	100	99.6	100
<i>gyrB</i> (528 nt)	94.7-95.8	80.1	89.4	93.0	98.9-100
GyrB (176 aa)	100	78.5	95.9	99.4	100
16S rRNA gene (1108 nt)	99.3	95.5	98.6	99.0	99.3-100

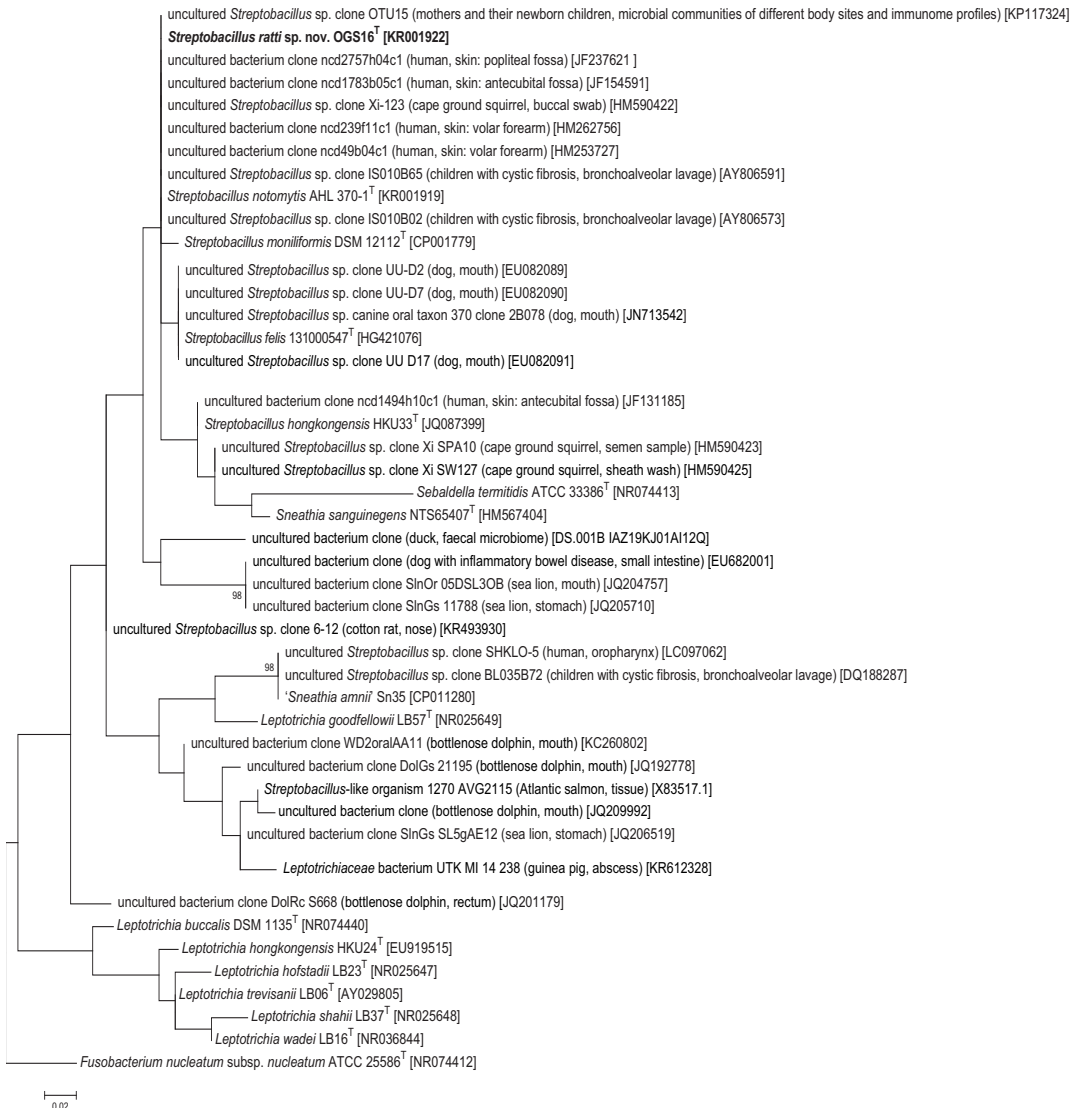
Streptobacillus rattii sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura³, Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁴, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³
¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S1. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Streptobacillus ratti* sp. nov. OGS16^T within the family *Leptotrichiaceae*. generated with MEGA5 (Tamura, et al., 2011) with the maximum-likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) and rapid bootstrap analysis (1000 bootstraps) and is based on a 16S rRNA gene sequence alignment of 102 nt. GenBank accession numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (1000 replicates). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide.



Streptobacillus ratti sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁵, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-

8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches

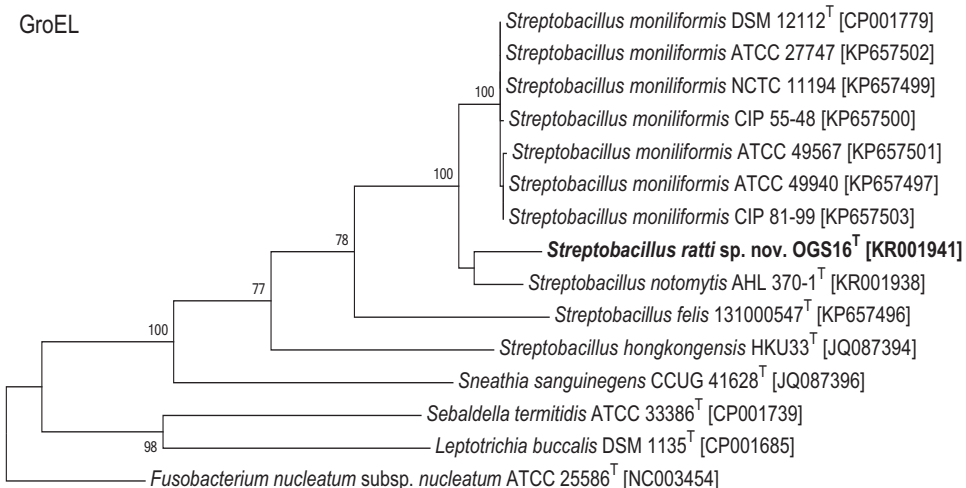
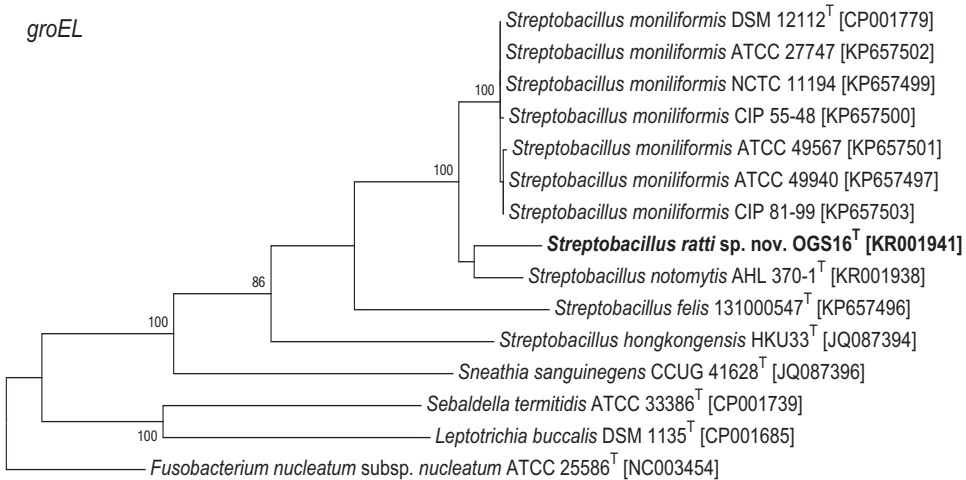
und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari

Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S2. Phylogenetic trees based on partial *groEL* (556 nt) and GroEL (185 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain OGS16^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Streptobacillus ratti sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁵, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-

8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches

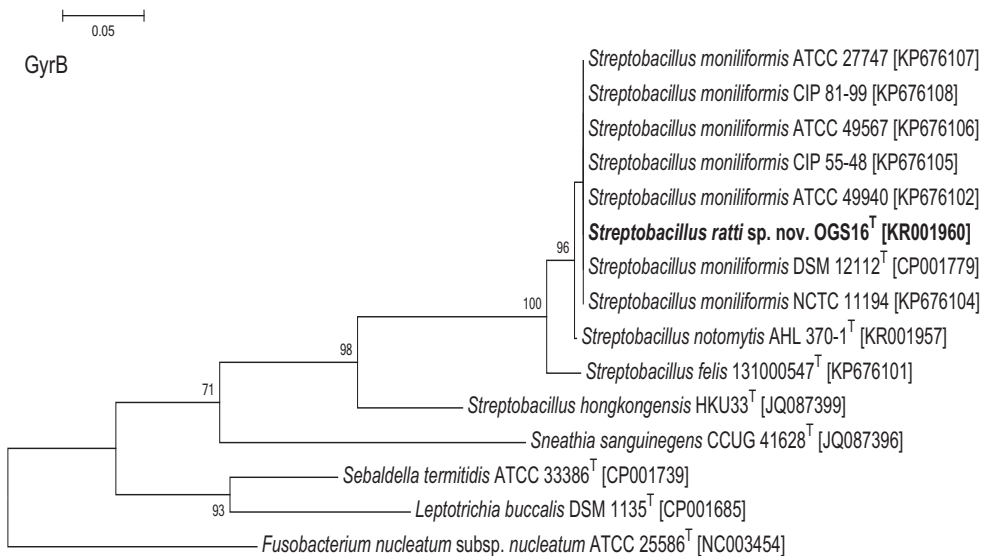
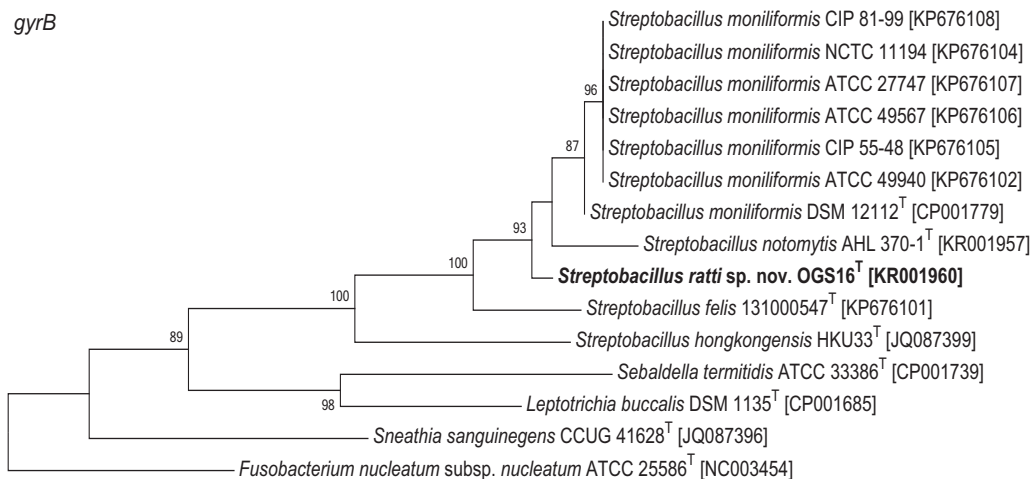
und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari

Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S3. Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (528 nt) and *GyrB* (176 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain OGS16^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Streptobacillus ratti sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-

8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches

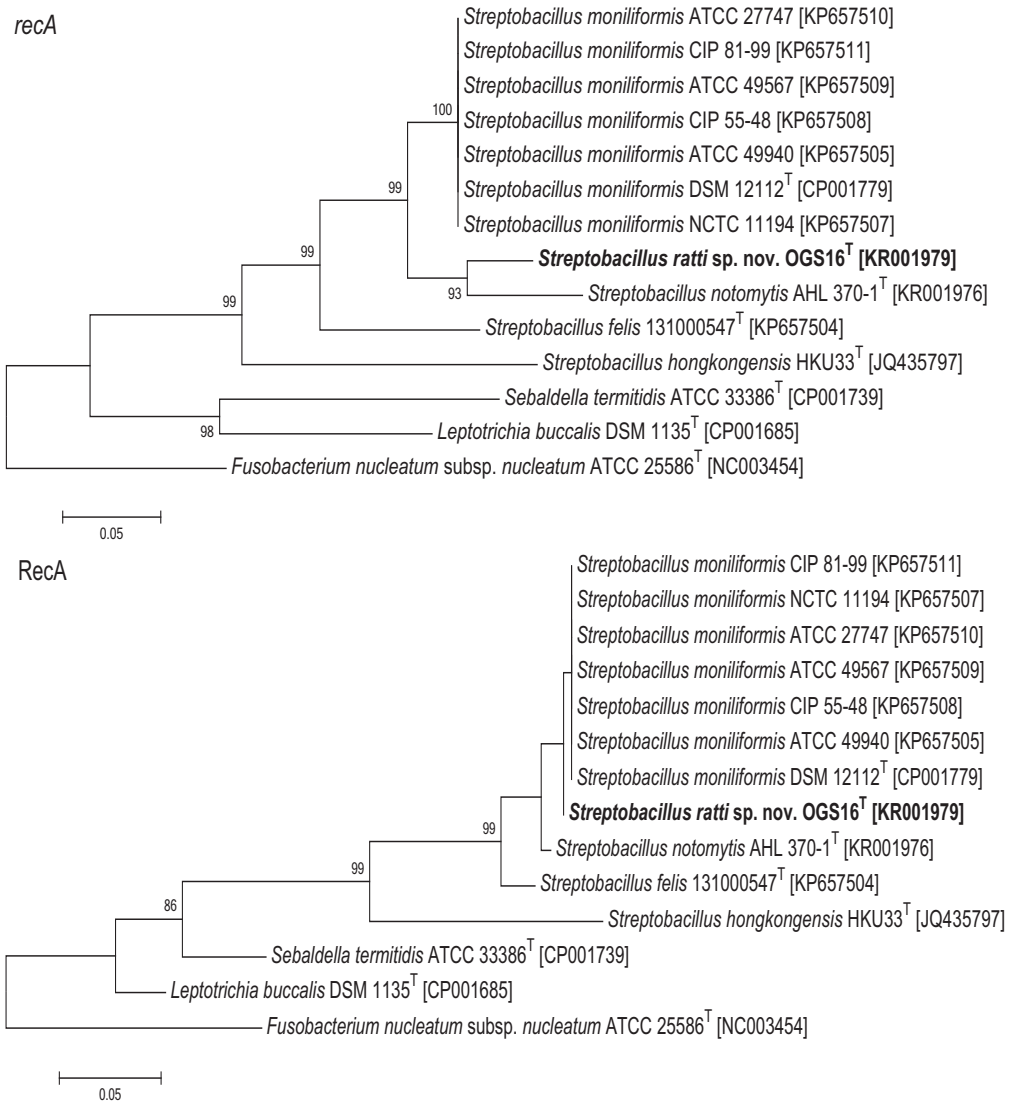
und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari

Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S4. Phylogenetic trees based on partial *recA* (735 nt) and RecA (244 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of strain OGS16^T to other *Streptobacillus* species. The trees were generated in MEGA5 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Streptobacillus ratti sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁵, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-

8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches

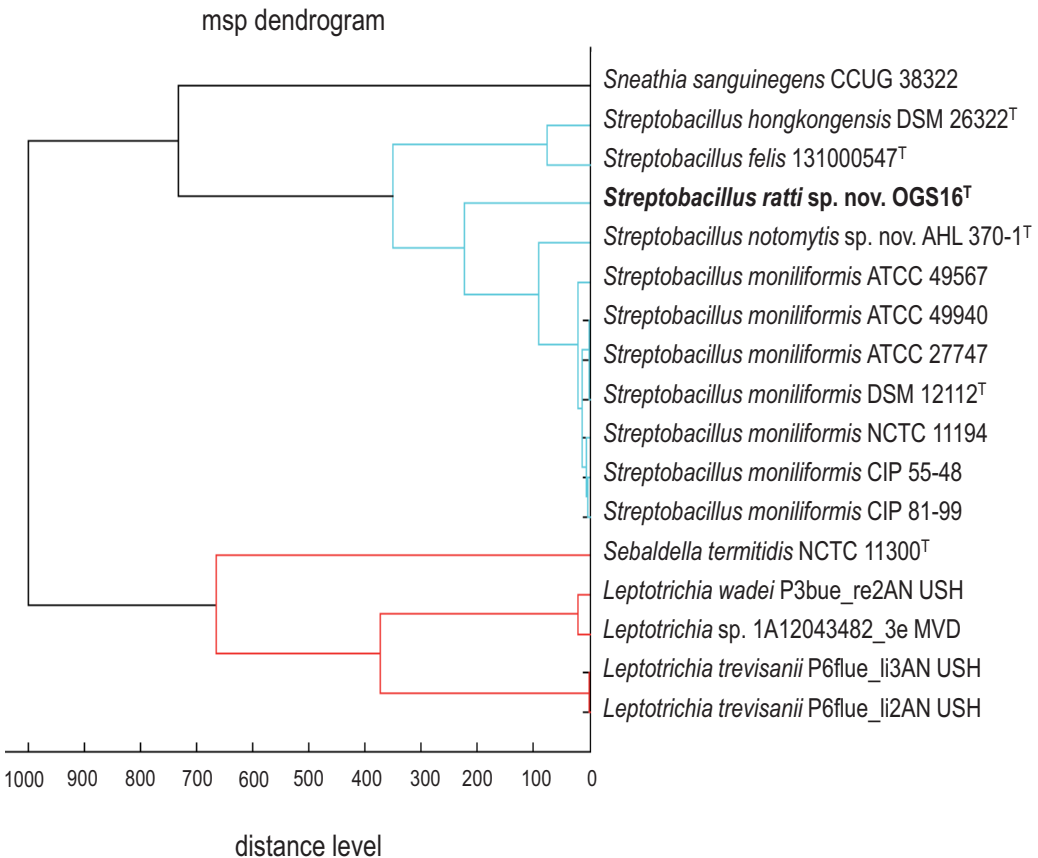
und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari

Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S5. Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Streptobacillus ratti* sp. nov. OGS16^T, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* and *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T reference strains were recorded using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra from *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112^T); ^T type strain, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK.



Streptobacillus ratti sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Koichi Imaoka², Masanobu Kimura², Stefanie P. Glaeser³, Christa Ewers⁴, Torsten Semmler⁵, Jörg Rau⁶, Werner Nicklas⁷, Tsutomu Tanikawa⁸ and Peter Kämpfer³

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 162-8640, Tokyo, Japan; ³ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, D-70736 Fellbach, Germany; ⁷ Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany; ⁸ Ikari Corporation, 579 Chibadera-cho, chuo-ku, Chiba-city, Chiba 260-0844, Japan

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.7 *Caviibacter abscessus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*).

Eisenberg, T.*, S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, B. Drescher & P. Kämpfer

Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(4): 1652-1659.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000922>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript Including References (Word document)

1 *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated
2 from guinea pigs (*Cavia porcellus*)

3

4 Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵
5 and Peter Kämpfer²

6

7 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany

8 ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen,
9 Germany

10 ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen,
11 D-35392 Giessen, Germany

12 ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany

13 ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

14

15 **Corresponding author:**

16 Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ H13; D-
17 35392 Giessen, Germany, Phone: +49 641 4800 5219; Fax: +49 641 4800 5268. Dr. Tobias
18 Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

19

20 **Running title:** Description of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov.

21 **Content category:** New Taxa

22 **Subsection:** Other Bacteria/ Fusobacteriia

23 **Keywords:** *Caviibacter*, *abscessus*, Fusobacteriales, novel, guinea pig, *Cavia porcellus*

24

25 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the complete genome sequences of
26 *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

27 and 151011837 all belong to BioProject PRJNA305231 and are SAMN04320708,
28 SAMN04320709 and SAMN04320710, respectively. Accession numbers of other gene
29 sequences generated within this study are summarized in Table S1.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

30 SUMMARY

31 A pleomorphic, Gram-negative, rod-shaped, indole-, oxidase- and catalase-
32 negative, non-spore-forming, non-motile bacterium was 1998 originally isolated from the
33 mandibular lymph node of a guinea pig and deposited as *Streptobacillus moniliformis*
34 CCUG 39713. A second strain 151011837 was 2015 isolated from an identical lesion in a
35 guinea pig from Germany. On the basis of 16S rRNA gene sequence analyses these strains
36 displayed highest sequence similarities with *Sneathia sanguinegens* (93.4%), '*Sneathia*
37 *amni*' (93.2%), followed by *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T (91.3%),
38 *Streptobacillus ratti* OGS16^T (91.2%), *Streptobacillus notomytis* AHL370-1^T (91.0%),
39 *Streptobacillus hongkongensis* HKU33^T (90.9%) and *Streptobacillus felis* 131000547^T
40 (90.9%). Sequence homology to all other members of the family *Leptotrichiaceae* was
41 <89%. Results of phylogenetic analyses of strains CCUG 39713^T and 151011837 based on
42 *gyrB*, *groEL* and *recA* nucleotide and deduced amino acid sequences were highly similar,
43 as the topologies of all trees were virtually identical (Figs. 1, S2-S4). The DNA similarity
44 values derived from average nucleotide identities (ANI) calculated for comparisons
45 between strain CCUG 39713^T versus the type strains *Sneathia sanguinegens* and
46 *Streptobacillus moniliformis*, respectively, were 72.05% and 70.42%. Genomes of
47 CCUG39713^T and 151011837 shared 99.57% ANI.

48 Chemotaxonomic and physiological data of strains CCUG 39713^T and 151011837 were in
49 congruence with other closely related members of the family *Leptotrichiaceae*,
50 represented by highly similar enzyme profiles and fatty acid patterns. MALDI-TOF MS
51 analysis was capable to clearly discriminate strains CCUG 39713^T and 151011837 from
52 all currently described taxa of the family *Leptotrichiaceae*. On the basis of these data we
53 propose the novel taxon *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. with the type strain
54 CCUG 39713^T (= DSM 101949^T) and the reference strain 151011837 (= DSM 101950).

55

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

56 Cervical lymph node abscess formation and granulomatous pneumonia in guinea pigs are
57 historically associated with *Streptobacillus moniliformis*, a neither well-known nor well-
58 recognized microorganism known to cause the bacterial zoonosis rat bite fever and Haverhill
59 fever in humans (Aldred *et al.*, 1974, Boot *et al.*, 2007, Elliott, 2007, Fleming, 1976, Kirchner
60 *et al.*, 1992, Smith, 1941). Abscess formation is a sporadically observed clinical disease entity
61 of *Streptobacillus moniliformis* that is reported for humans, rats and mice (Addidle *et al.*, 2012,
62 Pins *et al.*, 1996, Rohde *et al.*, 2008, Wullenweber *et al.*, 1990). Interestingly, all reports on
63 cervical lymph node abscess formations in guinea pigs state anaerobic growth characteristics
64 for the causative organism, whereas members of the genus *Streptobacillus* depend on
65 capnophilic growth with few exceptions (Eisenberg *et al.*, 2015). Furthermore, Boot *et al.* have
66 even demonstrated resistance of guinea pigs to *Streptobacillus moniliformis* infection with a rat
67 strain (Boot, *et al.*, 2007). Conversely, the 2001 established genus *Sneathia* consists of *Sneathia*
68 *sanguinegens* [formerly '*Leptotrichia sanguinegens*' (Hanff *et al.*, 1995)], a monotypic species
69 (Collins *et al.*, 2001). A second species associated with intrauterine fetal demise that was
70 initially described as '*Leptotrichia amnionii*' (Shukla *et al.*, 2002) has – based on molecular
71 data – been allocated to the genus *Sneathia* (Harwich *et al.*, 2012). However, '*Sneathia amnii*'
72 has – in default of a deposited type strain – not been listed as a valid species. The fastidiously
73 and strictly anaerobically growing *Sneathia* spp. can be part of the normal microbiota in human
74 genital tracts, but have also been found involved as potential pathogens in bacterial vaginosis
75 and obstetric complications like intra-amniotic infections or cases of postpartum and neonatal
76 bacteraemia (De Martino *et al.*, 2004, Kacerovsky *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2013). Likewise, a
77 positive correlation between *Sneathia* spp. and venereal infections like for instance HIV and
78 HPV and thus cervical cancer was postulated (Lee *et al.*, 2013, Mitchell *et al.*, 2013, Nawrot *et*
79 *al.*, 2010, Spear *et al.*, 2008). More recently, it was shown that *Sneathia* spp. have the potential
80 to cause infections outside the reproductive tract by its involvement in a case of septic arthritis
81 (Bachy *et al.*, 2011). *Sneathia* sequences have also occasionally been reported as genital

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

82 microbiota in cows and macaques (Hu *et al.*, 2015, Jeon *et al.*, 2015, Machado *et al.*, 2012,
83 Spear *et al.*, 2012).

84 Different growth characteristics as well as preliminary molecular data casted some doubt if
85 respective microorganisms from guinea pigs are indeed affiliated to *Streptobacillus* or *Sneathia*.
86 Based on remarkable DNA heterogeneity our data suggest that strains CCUG 39713^T and
87 151011837 would be better assigned to a further novel genus of the family *Leptotrichiaceae*
88 and the respective strains are subject of the present description.

89

90 Strain CCUG 39713^T was 1998 originally isolated from the mandibular lymph node of
91 a guinea pig and deposited by V. Båverud, SVA, Uppsala, Sweden as *Streptobacillus*
92 *moniliformis* in the Culture Collection, University of Göteborg, Sweden. Strain 151011837 was
93 isolated as a pure culture from an identical lesion in a guinea pig from Germany in 2015. Strains
94 CCUG 39713^T and 151011837 exclusively grew after 3-5 days of incubation at 37°C under an
95 obligate anaerobic atmosphere (85% N₂, 5% H₂ and 10% CO₂ in evacuation jars [(Anoxomat
96 AN2CTS, Mart); non-pre-reduced growth media] on tryptone soy agar (TSA, Oxoid, Wesel,
97 Germany) supplemented with 20% (v/v) horse serum or Columbia agar with 5% (v/v) sheep
98 blood (SBA; Oxoid) and very weakly on chocolate blood agar supplemented with vitamin K
99 and haemin (Oxoid). On these agars, strains CCUG 39713^T and 151011837 grew also very
100 weakly at 30°C, but not at 15, 43 or 50°C. The strains could also be cultivated on Schaedler
101 agar and SBA supplemented with nalidixic acid and colistin as well as in liquid media (tryptone
102 soy bouillon [TSB], brain-heart infusion and peptone broth, supplemented with 20% (v/v) cattle
103 or horse serum) but not on Gassner and MacConkey agar (all Oxoid). Growth is very fastidious
104 and colonies are tiny, dry and butyraceous. Gram-staining was done according to the Hucker
105 method as described previously (Gerhardt *et al.*, 1994). Cell morphological features were
106 observed under a Leitz Diaplan light microscope at 1000 × magnification, with cells grown for
107 3 days at 37°C on TSA. Gram staining revealed irregular Gram-negative pleomorphic, fusiform

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

108 to filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods which were arranged
109 in chains and clumps, sometimes displaying irregular, lateral bulbar swellings. Single laying
110 rod-shaped cell were approximately $0.47 \pm 0.2 \mu\text{m}$ wide and $0.92 \pm 0.1 \mu\text{m}$ long.

111

112 For phylogenetic analysis genomic DNA was extracted from a bacterial culture with a
113 commercial kit according to the manufacturer's instructions (MasterPure™ Complete DNA and
114 RNA Purification Kit, Epicentre, distributed by Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf,
115 Germany) and subjected to whole genome sequencing. De novo assembly was performed with
116 CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). For automatic
117 annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology (Aziz
118 *et al.*, 2008). Annotated gene sequences were imported into MEGA5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011)
119 and aligned with relevant reference sequences obtained from the GenBank database
120 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the CLUSTALW alignment tool in MEGA5.2.2 with
121 default parameters. For calculation of phylogenetic trees based on nearly full-length 16S rRNA
122 gene sequences, the maximum likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model
123 (Tamura & Nei, 1993) with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories and by
124 assuming that a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I) was used.
125 Correspondingly, maximum-parsimony (MP) algorithms implemented in MEGA5.2.2 with
126 Subtree-Pruning-Regrafting (Nei & Kumar, 2000) were also calculated and assessed. Tree node
127 reliability was examined by bootstrap analysis using 100 re-samplings for each tree.
128 Phylogenetic trees based on 1247 nucleotide (nt) positions (Fig. 1) and 1257 nt (Fig. S1),
129 respectively and 16S rRNA gene sequences between sequence termini 9 and 1566 [numbering
130 according to the *E. coli* rRNA sequence published by (Brosius *et al.*, 1978)].

131 The sequenced 16S rRNA gene fragments of strains CCUG 39713^T and 151011837 represent
132 an almost continuous stretch of 1483 unambiguous nucleotides between sequence positions 8
133 to 1522 [*E. coli* numbering; (Brosius, *et al.*, 1978)].

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

134 16S rRNA gene sequence analysis clearly supports the affiliation of strains CCUG 39713^T and
135 151011837 to the family *Leptotrichiaceae* (Fig. 1, Supplementary Fig. S1). It shares highest
136 16S rRNA gene sequence similarity with an unpublished '*Leptotrichiaceae* bacterium UTK MI
137 14-3285' genome sequence (KR612328; 99.9%) from a cervical abscess in a guinea pig from
138 North America, followed by an uncultured '*Eubacterium* clone E1-K6' from a corneal ulcer
139 (AJ289183; 94.6%) (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002), the type strain of *Sneathia*
140 *sanguinegens* CCUG 41628^T (93.4%), '*Sneathia amnii*' Sn35 (93.2%), *Streptobacillus*
141 *moniliformis* DSM 12112^T (91.3%), *Streptobacillus ratti* OGS16^T (91.2%), *Streptobacillus*
142 *notomytis* AHL370-1^T (91.0%), *Streptobacillus hongkongensis* HKU33^T (90.9%) and
143 *Streptobacillus felis* 131000547^T (90.9%). Sequence similarities to all other taxa are below
144 89%. Independent of the treeing method, strains CCUG 39713^T and 151011837 formed a
145 monophyletic cluster (100% bootstrap support) next to the type strain *Sneathia sanguinegens*
146 CCUG 41628^T and '*Sneathia amnii*' Sn35 (Fig. 1, Supplementary Fig. S1) and are also clearly
147 separated from the genera *Streptobacillus*, *Sebaldella* and *Leptotrichia*.
148 PCR assays designed for the detection of *Streptobacillus moniliformis* and recently found to be
149 rather genus than species specific did expectably not yield an amplicon for strains CCUG
150 39713^T and 151011837 (Eisenberg, *et al.*, 2015, Kimura *et al.*, 2008, Rohde, *et al.*, 2008).
151 Interestingly, an observed interference of an alleged *Streptobacillus moniliformis* specific PCR
152 gave positive results for guinea pig samples and amplicon sequencing revealed a *Leptotrichia*
153 sp. (Boot *et al.*, 2008) whose sequence is indeed clearly different from those of strains CCUG
154 39713^T and 151011837 (Fig. S1).

155 For further clarification of the phylogenetic relationship of strains CCUG 39713^T and
156 151011837 to other members of the *Leptotrichiaceae* phylogenetic analyses based on both
157 partial nucleotide and deduced amino acid sequences of *gyrB*, *groEL*, and *recA* genes were
158 performed to regard also non-synonymous substitutions (Glaeser & Kämpfer, 2015).
159 Respective nucleotide and amino acid sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson *et*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

160 *al.*, 1994) implemented in MEGA5.2.2 (Tamura, *et al.*, 2011) as described above. Pairwise
161 sequence similarities were calculated based on *p*-distances (calculated without an evolutionary
162 model). The Jones-Thornton-Taylor model [JTT; (Jones *et al.*, 1992)] +G +I was employed for
163 amino acid sequences. All trees based on 100 replications (bootstrap analysis).

164 Phylogenetic trees based on partial nucleotide and more conserved deduced amino acid
165 sequences of *gyrB*, *groEL* and *recA* showed in all trees the formation of monophyletic clusters
166 for strains CCUG 39713^T and 151011837. Both strains clustered (with high bootstrap support)
167 closest but in a distinct branch to *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and ‘*Sneathia amnii*’
168 Sn35, and also separated from all *Streptobacillus* species (Supplementary Fig. S2-S4). In
169 addition, nucleotide and deduced amino acid sequence similarities were always considerably
170 lower between strains CCUG 39713^T and 151011837 and strains of the species of *Sneathia*,
171 *Streptobacillus*, *Sebaldella* and *Leptotrichia* (Table S2), thereby clearly indicating the genetic
172 distinction of strains CCUG 39713^T and 151011837.

173 The evaluation of average nucleotide identity (ANI) analyses has proven to be expressive for
174 species delineation in *Streptobacillus* species (Eisenberg *et al.*, in press, Eisenberg *et al.*, in
175 press) and superior to DNA-DNA hybridization (DDH) (Eisenberg, *et al.*, 2015). It was carried
176 out according to the method described by (Goris *et al.*, 2007). ANI analysis between strain
177 CCUG 39713^T compared to *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T (SAMN04320708) and
178 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T (CP001779) was 72.05% and 70.42%, respectively
179 and thereby significantly deceeding the proposed cut-off for species boundary of 95-96% ANI
180 (Richter & Rossello-Mora, 2009). The same was true for a comparison of strain CCUG 39713^T
181 with the genomes of further selected type strains of *Streptobacillus*, *Leptotrichia* and
182 *Sebaldella*, in that ANI values between CCUG 39713^T and “*Sneathia amnii*” Sn35 (CP011280),
183 *Streptobacillus felis* 131000547^T [BioProject PRJNA304683 (BioSample SAMN04306665)],
184 *Streptobacillus ratti* OGS16^T [LKKW00000000 (SAMN04099675)], *Streptobacillus notomytis*
185 AHL 370-1^T [LJRV00000000 (SAMN04038436)], *Streptobacillus hongkongensis* DSM

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

186 26322^T [PRJNA304683 (SAMN04306666)], *Leptotrichia buccalis* DSM 1135^T (CP001685)
187 and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T (CP001739) were 71.42%, 70.28%, 70.15%, 70.08%,
188 70.08%, 69.01% and 67.14%, respectively. Contrarily, genomes of CCUG 39713^T and
189 151011837 shared 99.57% ANI thereby underlining conspecificity (Richter & Rossello-Mora,
190 2009). As a countercheck and to avoid statistical uncertainty we could confirm these results
191 also by using the *in-silico* genome-to-genome comparison tool (GGDC 2.0;
192 <http://ggdc.dsmz.de/>) that is independently working from ANI and was found to yield higher
193 correlations with conventional DDH (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Strain CCUG 39713^T and
194 151011837 constantly displayed DDH estimate levels of <22.10% to *Sneathia sanguinegens*
195 CCUG 41628^T and all other *Streptobacillus* species using formula 2 [identities/high-scoring
196 pair (HSP) length] (data not shown).

197 Strains CCUG 39713^T and 151011837 displayed three conserved signature indels in the amino
198 acid sequences of an MreB/MrI family protein (MreB/MrI; 2 aa deletion), alanine-tRNA ligase
199 (AlaS; 5 aa insertion) and RecA (2 aa insertion) that were recently found to be specific for the
200 *Leptotrichiaceae* (data not shown)(Gupta & Sethi, 2014).

201

202 From the results of the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL* and *recA* gene sequence analysis and ANI
203 analysis it is evident, that strains CCUG 39713^T and 151011837 are conspecific and different
204 from the genera *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Leptotrichia* and *Sebaldella* and therefore should be
205 placed into a novel genus.

206 Results from the physiological characterization are given in the species description and in Table
207 1. Biochemical profiling was carried out in triplicate according to the manufacturer's
208 instructions using commercial test systems, i.e. VITEK2-compact with the NHI card and API-
209 Zym (both bioMérieux, Nürtingen, Germany). Vitek NHI identified strain CCUG 39713^T as
210 *Neisseria cinerea* (bio profile [bp] 0231000000) and strain 151011837 as *Neisseria cinerea*/
211 *Neisseria elongata* (bp 0233000002), *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T as *Neisseria*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

212 *cinerea* with 98% confidence (bp 0232000000), *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T as
213 *Haemophilus influenzae/ Kingella kingae/ Branhamella catarrhalis* (bp 4210000040/
214 4610000040), respectively. Strains CCUG 39713^T and 151011837 cannot be differentiated
215 from type strains of *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and *Streptobacillus moniliformis*
216 DSM 12112^T by physiological characteristics alone. The antimicrobial susceptibility pattern
217 was determined using minimal inhibitory concentrations (MIC) obtained by broth microdilution
218 test (Merlin Diagnostika) and revealed the following MIC values (in µg mL⁻¹): colistin (>4),
219 enrofloxacin (>1), tetracycline (<0.5), spectinomycin (>16), erythromycin (>2), gentamicin
220 (>2), florfenicol (>1) and trimethoprim/sulfamethoxazole (>4/76). This pattern is clearly
221 deviant from MIC values that are typical for members of *Sneathia* and *Streptobacillus* (data not
222 shown).

223 For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF
224 MS), strains CCUG 39713^T and 151011837, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T,
225 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T,
226 *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus notomytis* AHL370-1^T, *Streptobacillus ratti*
227 OGS16^T and *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T were incubated for 3-5 d and subsequently
228 selected from the SBA plates and then transferred to steel targets according to manufacturer's
229 instructions (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). Strains were prepared
230 using the direct transfer protocol provided by the manufacturer. Analysis was performed on a
231 MALDI-TOF MS Biotyper Version V3.3.1.0 with database (DB 5627, BrukerDaltonics). A
232 dendrogram including selected main spectra peak lists (msp) of the family *Leptotrichiaceae*
233 from the Bruker database as well as manual entries of strains CCUG 39713^T and 151011837,
234 *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T,
235 *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus notomytis* AHL370-1^T, *Streptobacillus ratti*
236 OGS16^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T is depicted in Fig. S5 and shows, however, a

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

237 clear differentiation of strains CCUG 39713^T and 151011837 with obvious score levels above
238 2.2 from the other taxa.

239 Fatty acid composition data were compared as depicted on the CCUG web site for strain CCUG
240 39713^T and other members of the *Leptotrichiaceae* (Table 2). The major fatty acids C_{16:0}, C_{18:0},
241 C_{18:1 ω 9c} and C_{18:2 ω 6,9c/18:0 ANTE} as described by (Pins, *et al.*, 1996, Rowbotham, 1983, Rygg
242 & Bruun, 1992) were also detected in our investigations.

243 Both, the molecular differences obtained by ANI and phylogenetic analyses (Figs. 1 and
244 Supplementary Fig. S1-S4), the differences based on MALDI-TOF MS (Supplementary Fig.
245 S5) and antimicrobial susceptibility pattern support the separate position of strains CCUG
246 39713^T and 151011837 as a separate genus of the family *Leptotrichiaceae*. The dependence of
247 strains CCUG 39713^T and 151011837 to grow very fastidiously exclusively in an anaerobic
248 environment in the presence of blood or serum, its negative reactivity for cytochrome oxidase,
249 catalase, nitrate and indole, the production of cotton ball-like appearance in liquid media, its
250 inducible L-forms beside “normal” small butyraceous colonies, its Gram-negative filamentous
251 rod-shaped phenotype arranged in chains and clumps with irregular bulbar swellings (Table 1)
252 support the placement of the isolate in the family *Leptotrichiaceae* and distinguish it from
253 *Sneathia sanguinegens* and “*Sneathia amni*” and members of the genus *Streptobacillus*.

254 Moreover, genotypical and phenotypical differences prove strains CCUG 39713^T and
255 151011837 as a novel genus different from the genera *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Leptotrichia*
256 and *Sebaldella*. For this reason, we are here proposing the novel taxon *Caviibacter abscessus*
257 gen. nov. sp. nov. with the type strain CCUG 39713^T (= DSM 101949^T) and the reference strain
258 151011837 (=DSM 101950).

259

260 **Description of *Caviibacter* gen. nov.**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

261 *Caviibacter* (Ca.vi.i.bac'ter N.L. fem. n. *Cavia* generic latin name for the guinea pig *Cavia*
262 *porcellus*; N.L. neut. n. *bacter* rod; N.L. masc. n. *Caviibacter* a rod that is isolated from a guinea
263 pig).

264 Rods with rounded or pointed ends or pleomorphic bacilli with coccobacillary, bacillary and
265 filamentous forms. Occur singly or form long, wavy chains. Gram-stain-negative. Non motile.
266 Non-spore-forming. Obligate dependence on an anaerobic atmosphere. Capable to grow
267 without haemolysis on blood agar and serum containing agars and weakly on chocolate agar
268 but not on MacConkey agar; require blood, serum or ascitic fluid for growth. Optimum
269 temperature for growth is 35-37°C. The major fatty acids are C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1ω9c} and
270 C_{18:2ω6,9c/18:0} ANTE. DNA G+C content is 26.5-27.0 mol%, genome size is 1.22-1.30 Mbp.
271 The type species is *Caviibacter abscessus*.

272

273 **Description of *Caviibacter abscessus* sp. nov.**

274 *abscessus* (abs.ces'sus. L. gen. masc. n. *abscessus* of or derived from an abscess, referring to
275 the typical clinical state where the organism was isolated from)

276

277 Growth occurs after 3-5 days at 37°C in an anaerobic atmosphere on SBA, Schaedler agar, TSA
278 or TSB with 20% horse serum, but only weak growth is observed on chocolate agar and no
279 growth on Gassner and MacConkey agar. Colonies are very tiny, dry, butyraceous and slightly
280 opaque, measuring 0.1-0.4 mm in diameter. Colonies are non-haemolytic on SBA. In liquid
281 media (e.g. TSB with 20% horse serum), growth can be detected after 2-5 days as "cotton ball"
282 or "bread crumb"-like appearance.

283 Microscopic morphological features are indicative of Gram-negative, pleomorphic, fusiform to
284 filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods with a size of 0.47 +/-
285 0.2 μm (width) and 0.92 +/- 0.1 (length) that are arranged in chains and clumps, also sometimes
286 displaying irregular, lateral bulbar swellings. Positive for esterase C4, esterase lipase C8,

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

287 phenylalanine arylamidase, prolin arylamidase, tyrosin arylamidase. Negative for motility, acid
288 phosphatase, alkaline phosphatase, lipase (C14), lysin arylamidase, valine arylamidase, cystine
289 arylamidase, α -chymotrypsin, trypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase α -galactosidase, β -
290 galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -
291 mannosidase, α -fucosidase, cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole.

292 The type strain CCUG 39713^T (= DSM 101949^T) and the reference strain 151011837 were
293 isolated each from a mandibular lymph node abscess in a guinea pig (*Cavia porcellus*) in
294 Sweden and Germany, respectively. The G+C content of the DNA of the type strain is 26.5
295 mol%, genome size is 1.22 Mbp. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the
296 complete genome sequences of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T and
297 151011837 are SAMN04320709 and SAMN04320710, respectively (BioProject
298 PRJNA305231).

299

300 Acknowledgement

301 We thank Anna Mohr, Ulrike Kling, Katharina Engel, Mersiha Curić, Jens Heinbächer, Ursula
302 Leidner, Maria Sowinsky and Gundula Will for excellent technical assistance and Barbara
303 Gamb for making even the most exotic manuscripts available. Dr. Svenja Rödel is
304 acknowledged for helpful advice during sample acquisition.

305

306 References

307 **Addidle, M., Pynn, J., Grimwade, K. & Giola, M. (2012).** Epidural abscess caused by
308 *Streptobacillus moniliformis*. *J Clin Microbiol* **50**, 3122-3124.

309 **Aldred, P., Hill, A. C. & Young, C. (1974).** The isolation of *Streptobacillus moniliformis* from
310 cervical abscesses of guinea-pigs. *Lab Anim* **8**, 275-277.

311 **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & 23 other authors (2008).** The RAST Server: rapid
312 annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 313 **Bachy, B., Bemer, P., Tortellier, L., Giraudeau, C., Reynaud, A. & Corvec, S. (2011).**
314 Septic arthritis due to a *Sneathia* species most closely related to *Sneathia sanguinegens*. *J Med*
315 *Microbiol* **60**, 1693-1696.
- 316 **Boot, R., Van de Berg, L., Koedam, M. A., Veenema, J. L. & Vlemminx, M. J. (2007).**
317 Resistance to infection of guinea pigs with a rat *Streptobacillus moniliformis*. *Scand J Lab Anim*
318 *Sci* **34**, 1-5.
- 319 **Boot, R., Van de Berg, L., Reubsaet, F. A. & Vlemminx, M. J. (2008).** Positive
320 *Streptobacillus moniliformis* PCR in guinea pigs likely due to *Leptotrichia* spp. *Vet Microbiol*
321 **128**, 395-399.
- 322 **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide
323 sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**,
324 4801-4805.
- 325 **Collins, M. D., Hoyles, L., Tornqvist, E., von Essen, R. & Falsen, E. (2001).** Characterization
326 of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*":
327 description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **24**, 358-361.
- 328 **De Martino, S. J., Mahoudeau, I., Brettes, J. P., Piemont, Y., Monteil, H. & Jaulhac, B.**
329 **(2004).** Peripartum bacteremias due to *Leptotrichia amnionii* and *Sneathia sanguinegens*, rare
330 causes of fever during and after delivery. *J Clin Microbiol* **42**, 5940-5943.
- 331 **Eisenberg, T., Nicklas, W., Mauder, N., Rau, J., Contzen, M., Semmler, T., Hofmann, N.,**
332 **Aledelbi, K. & Ewers, C. (2015).** Phenotypic and genotypic characteristics of members of the
333 genus *Streptobacillus*. *PLoS One* **10**, e0134312.
- 334 **Eisenberg, T., Imaoka, K., Kimura, M., Glaeser, S. P., Ewers, C., Semmler, T., Rau, J.,**
335 **Nicklas, W. & Kämpfer, P. in press.** *Streptobacillus ratti* sp. nov. isolated from a black rat
336 (*Rattus rattus*) *Int J Syst Evol Microbiol*. DOI: 10.1099/ijsem.0.000869.
- 337 **Eisenberg, T., Glaeser, S. P., Ewers, C. & 8 other authors (in press).** *Streptobacillus*
338 *notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 339 and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend.
340 *Int J Syst Evol Microbiol*. DOI: 10.1099/ijsem.0.000654.
- 341 **Elliott, S. P. (2007)**. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin Microbiol Rev* **20**,
342 13-22.
- 343 **Fleming, M. P. (1976)**. *Streptobacillus moniliformis* isolations from cervical abscesses of
344 guinea-pigs. *Vet Rec* **99**, 256.
- 345 **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994)**. *Methods for general*
346 *and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 347 **Glaeser, S. P. & Kämpfer, P. (2015)**. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
348 taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **38**, 237-245.
- 349 **Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje,**
350 **J. M. (2007)**. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome
351 sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- 352 **Gupta, R. S. & Sethi, M. (2014)**. Phylogeny and molecular signatures for the phylum
353 Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe* **28**, 182-198.
- 354 **Hanff, P. A., Rosol-Donoghue, J. A., Spiegel, C. A., Wilson, K. H. & Moore, L. H. (1995)**.
355 *Leptotrichia sanguinegens* sp. nov., a new agent of postpartum and neonatal bacteremia. *Clin*
356 *Infect Dis* **20 Suppl 2**, S237-239.
- 357 **Harwich, M. D., Jr., Serrano, M. G., Fettweis, J. M., Alves, J. M., Reimers, M. A., Vaginal**
358 **Microbiome, C., Buck, G. A. & Jefferson, K. K. (2012)**. Genomic sequence analysis and
359 characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. *BMC Genomics* **13 Suppl 8**, S4.
- 360 **Hu, K. T., Zheng, J. X., Yu, Z. J., Chen, Z., Cheng, H., Pan, W. G., Yang, W. Z., Wang,**
361 **H. Y., Deng, Q. W. & Zeng, Z. M. (2015)**. Directed shift of vaginal microbiota induced by
362 vaginal application of sucrose gel in rhesus macaques. *Int J Infect Dis* **33**, 32-36.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 363 **Jeon, S. J., Vieira-Neto, A., Gobikrushanth, M. & 9 other authors (2015).** Uterine
364 microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Appl Environ*
365 *Microbiol* **81**, 6324-6332.
- 366 **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation data
367 matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**, 275-
368 282.
- 369 **Kaceroovsky, M., Vrbacky, F., Kutova, R., Pliskova, L., Andrys, C., Musilova, I., Menon,**
370 **R., Lamont, R. & Nekvindova, J. (2015).** Cervical microbiota in women with preterm
371 prelabor rupture of membranes. *PLoS One* **10**, e0126884.
- 372 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of
373 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- 374 **Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. &**
375 **Yamada, A. (2008).** Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain
376 reaction. *Microbiol Immunol* **52**, 9-15.
- 377 **Kirchner, B. K., Lake, S. G. & Wightman, S. R. (1992).** Isolation of *Streptobacillus*
378 *moniliformis* from a guinea pig with granulomatous pneumonia. *Lab Anim Sci* **42**, 519-521.
- 379 **Lee, J. E., Lee, S., Lee, H., Song, Y. M., Lee, K., Han, M. J., Sung, J. & Ko, G. (2013).**
380 Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin
381 cohort. *PLoS One* **8**, e63514.
- 382 **Machado, V. S., Oikonomou, G., Bicalho, M. L., Knauer, W. A., Gilbert, R. & Bicalho, R.**
383 **C. (2012).** Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using
384 metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol* **159**, 460-469.
- 385 **Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P. & Goker, M. (2013).** Genome sequence-
386 based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC*
387 *Bioinformatics* **14**, 60.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 388 **Mitchell, C., Balkus, J. E., Fredricks, D. & 9 other authors (2013).** Interaction between
389 lactobacilli, bacterial vaginosis-associated bacteria, and HIV Type 1 RNA and DNA genital
390 shedding in U.S. and Kenyan women. *AIDS research and human retroviruses* **29**, 13-19.
- 391 **Nawrot, R., Kamieniarz, K., Malinowska, M., Jozefiak, A., Kedzia, W., Kwasniewska, A.,**
392 **Kuzma, D. & Gozdzicka-Jozefiak, A. (2010).** The prevalence of *Leptotrichia amnionii* in
393 cervical swabs of HPV positive and negative women. *Eur J Gynaecol Oncol* **31**, 425-428.
- 394 **Nei, M. & Kumar, S. (2000).** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford
395 University Press.
- 396 **Pins, M. R., Holden, J. M., Yang, J. M., Madoff, S. & Ferraro, M. J. (1996).** Isolation of
397 presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital
398 tract. *Clin Infect Dis* **22**, 471-476.
- 399 **Richter, M. & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the
400 prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19126-19131.
- 401 **Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008).** Case report: Abscessation due to *Streptobacillus*
402 *moniliformis* in a rat [in German]. *Prakt Tierarzt* **89**, 466-473.
- 403 **Rowbotham, T. J. (1983).** Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. *Lancet* **2**, 567.
- 404 **Rygg, M. & Bruun, C. F. (1992).** Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia
405 in a child. *Scand J Infect Dis* **24**, 535-540.
- 406 **Schabereiter-Gurtner, C., Maca, S., Kaminsky, S., Rolleke, S., Lubitz, W. & Barisani-**
407 **Asenbauer, T. (2002).** Investigation of an anaerobic microbial community associated with a
408 corneal ulcer by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis.
409 *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**, 193-199.
- 410 **Shukla, S. K., Meier, P. R., Mitchell, P. D., Frank, D. N. & Reed, K. D. (2002).** *Leptotrichia*
411 *amnionii* sp. nov., a novel bacterium isolated from the amniotic fluid of a woman after
412 intrauterine fetal demise. *J Clin Microbiol* **40**, 3346-3349.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 413 **Smith, W. (1941).** Cervical abscesses of guinea-pigs. *Journal of Pathology and Bacteriology*
414 **37**, 29-37.
- 415 **Spear, G. T., Sikaroodi, M., Zariffard, M. R., Landay, A. L., French, A. L. & Gillevet, P.**
416 **M. (2008).** Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-
417 uninfected women with or without bacterial vaginosis. *J Infect Dis* **198**, 1131-1140.
- 418 **Spear, G. T., Kersh, E., Guenther, P., Vishwanathan, S. A., Gilbert, D., Zariffard, M. R.,**
419 **Mirmonsef, P., Landay, A., Zheng, L. & Gillevet, P. (2012).** Longitudinal assessment of
420 pigtailed macaque lower genital tract microbiota by pyrosequencing reveals dissimilarity to the
421 genital microbiota of healthy humans. *AIDS research and human retroviruses* **28**, 1244-1249.
- 422 **Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the
423 control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512-526.
- 424 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5:
425 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance,
426 and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- 427 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the
428 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
429 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- 430 **Wang, X., Buhimschi, C. S., Temoin, S., Bhandari, V., Han, Y. W. & Buhimschi, I. A.**
431 **(2013).** Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from
432 pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS One* **8**, e56131.
- 433 **Wullenweber, M., Kaspareit-Rittinghausen, J. & Farouq, M. (1990).** *Streptobacillus*
434 *moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of
435 different strains of mice. *Lab Anim Sci* **40**, 608-612.
- 436
- 437

- 438 **Table 1.** Physiological characteristics of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. 151011837
 439 and the type species strains of *Sneathia sanguinegens* and *Streptobacillus moniliformis* as obtained by VITEK2-compact with the NHI card[†], API-
 440 Zym[#] (both bioMérieux) and classical reactions[§]; Taxa: 1, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T; 2, *Caviibacter abscessus* gen.
 441 nov. sp. nov. 151011837; 3, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T; 4, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; +, positive; -, negative; +/- variable.
 442 Congruent results are solely presented in the species description.

Compound	1	2	3	4
Haemolysis on SBA [§]	-	-	-	-
Phosphatase (unspecified) [†]	-	-	+	-
Phenylalanine arylamidase [†]	+	+	+	+
Ala-phe-pro arylamidase [†]	-	+	-	+
L-Lysin arylamidase [†]	-	-	+	-
Tyrosin arylamidase [†]	+	+	-	+
Phenylphosphonat [†]	-	+	-	-
L-Prolin arylamidase [†]	+	+	-	+
Alkaline phosphatase [†]	-	-	+	+
Esterase (C4) [†]	w	w	w	+

Esterase lipase (C8) [†]	w	w	-	+
Leucine arylamidase [†]	-	w	w	-
α -Chymotrypsin [†]	-	-	-	+
Acid phosphatase [†]	-	-	+	+
β -Glucuronidase [†]	-	-	+	-

443 # score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0-2: negative [-], 3: weak [w], 4-5: positive [+])

444

- 445 **Table 2.** Cellular fatty acid pattern of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov., *Sneathia sanguineus*, “*Sneathia amnii*” and *Streptobacillus*
- 446 *moniliformis*. Taxa: 1, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T; 2, *Sneathia sanguineus* CCUG 41628^T; 3, *Sneathia sanguineus*
- 447 CCUG 38322; 4, CCUG 52888 “*Sneathia amnii*”; 5, CCUG 52976 “*Sneathia amnii*”; 6, *Streptobacillus moniliformis* CCUG 2469^T. Biomass for fatty
- 448 acid analysis was harvested after growth in anaerobic environment on chocolate blood agar. Data are derived from the CCUG website
- 449 (<http://www.ccug.se>). Taxa 1a, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T; 1b, *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. 151011837
- 450 represent repeats according to the method by (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996), for which bacteria were cultivated on tryptone soy agar supplemented
- 451 with 20% (v/v) horse serum.

Fatty acid	1	1a	1b	2	3	4	5	6
C _{10:0}	-	-	-	-	-	-	-	0.8
C _{12:0}	0.2	-	-	-	-	-	-	-
C _{14:0}	0.9	1.0	0.9	0.5	0.6	0.6	0.6	0.8
C _{15:0}	0.3	-	0.3	-	0.3	-	-	-
C_{16:0}	22.3	28.6	26.6	18.5	16.1	19.1	17.2	23.3
C _{16:0<i>iso</i>}	0.2	-	-	-	0.3	-	-	-
C _{16:1<i>ω</i>7<i>c</i>}	1.3	-	-	1.8	1.6	1.6	1.6	1.1

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

summed feature 3 (C _{16:1ω7c/15iso0H})	-	1.1	1.3	-	-	-	-	-	-
C _{16:1ω9c}	0.3	-	-	0.4	-	0.3	-	-	-
C _{17:0}	0.8	1.2	1.0	0.6	0.6	0.5	0.8	-	0.8
C _{17:0} ANTE _{iso}	0.3	-	-	0.2	-	-	-	-	-
C _{17:1iso} I/16:0DMA	1.3	-	-	0.9	-	0.7	-	-	-
C _{17:1ω5ciso}	-	-	-	-	0.6	0.8	1.0	-	1.0
summed feature 4	-	1.6	1.3	-	-	-	-	-	-
(C _{17:1iso} I/ANTE _{iso} B/I)									
C _{17:1ω8c}	0.4	-	0.4	0.5	0.4	0.4	-	0.4	-
C_{18:0}	22.5	36.9	34.5	14.2	14.7	12.3	27.5	16.3	12.3
C _{18:0iso}	0.3	-	0.4	-	-	-	-	-	-
C _{18:0} 3OH	0.4	-	-	-	-	0.5	-	0.5	-
C _{18:1ω7c} DMA	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-
C_{18:1ω9c}	15.1	13.3	14.7	21.0	17.8	17.2	14.3	16.8	14.3
C_{18:2ω6,9c/18:0} ANTE	30.0	14.1	17.0	41.7	42.6	47.5	30.2	41.8	30.2

C _{19:0} or C _{20:0} aldehyde	0.2	-	0.4	-	-	-	-
C _{19:1} iso I/18:0 DMA	0.3	-	-	-	0.4	-	-
C _{20:0}	0.5	1.0	0.8	-	0.3	-	-
C _{20:1} ω9c	0.6	-	0.3	-	-	-	-
C _{20:2} ω6,9c	0.3	-	-	-	0.3	-	-
C _{20:4} ω6,9,12,15c	0.6	-	-	0.6	1.4	-	0.8
unidentified	1.5	0.8	0.3	-	1.3	1.3	0.6

452

453

454 **Fig. 1.** Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. within the family *Leptotrichiaceae*.

455 The tree was generated in MEGA5.2.2 based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate

456 categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I). The tree is based on 1247 nucleotide positions and 16S

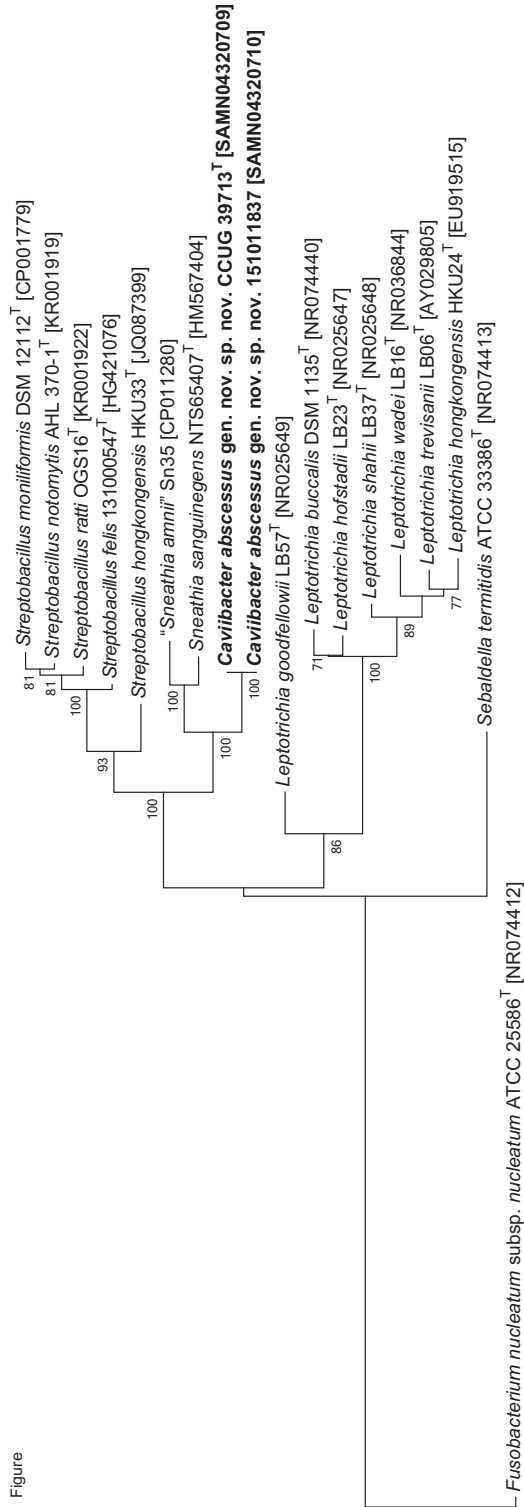
457 rRNA gene sequences between sequence termini 9 and 1566 [numbering according to the *E. coli* rRNA gene sequence published by (Brosius, *et al.*,

458 1978)]. GenBank/EMBL/DBJ accession numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates).

459 Bar, 0.05 nucleotide substitutions per site. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Figure



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S1. Overview of gene sequences of *Cavibacter abscessus* gen. nov. sp. nov., *Sneathia sanguinegens*, *Streptobacillus ratti*, *Streptobacillus notomytis* and *Streptobacillus felis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes. All other sequences were obtained from GeneBank. The accession numbers for the genome sequences of *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T, *Cavibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T and 151011837 all belong to BioProject PRJNA305231 and are SAMN04320708, SAMN04320709 and SAMN04320710, respectively.

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA	gyrB	groEL	recA
<i>Cavibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov.	CCUG 39713 ^T	guinea pig (<i>Cavia porcellus</i>), mandibular lymph node abscess, Sweden	BioProject PRJNA305231 (Acc.No. SAMN04320709)			
<i>Cavibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov.	151011837	guinea pig (<i>Cavia porcellus</i>), mandibular lymph node abscess, Germany	BioProject PRJNA305231 (Acc.No. SAMN04320710)			
<i>Sneathia sanguinegens</i>	CCUG 41628 ^T	human blood, complicated delivery, Sweden	BioProject PRJNA305231 (Acc.No. SAMN04320708)			
<i>Streptobacillus ratti</i>	OGS16 ^T	black rat (<i>Rattus rattus</i>), oral cavity, Japan	KR001922	KR001960	KR001941	KR001979
<i>Streptobacillus notomytis</i>	AHL 370-1 ^T	spinifex hopping mouse (<i>Notomys alexis</i>) with septicaemia, Australia	KR001919	KR001957	KR001938	KR001976
<i>Streptobacillus felis</i>	131000547 ^T	cat with pneumonia, Germany	HG421076	KP676101	KP657496	KP657504

Cavibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@hlt.hessen.de

Table S2. Sequence similarities of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. (n=2) compared to the type species of *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Sebadella* and *Leptotrichia*. Sequence similarities were calculated based on p-distances determined in MEGA5.2.2. 16S rRNA gene sequence similarities, *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence similarities. n: number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the phylogenetic trees (Fig S1-S3).

	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. (n=2)	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. (n=2)	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. (n=2)	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. (n=2)	<i>Caviibacter abscessus</i> gen. nov. sp. nov. (n=2)
<i>Sneathia sanguinegens</i> (n=1)	93.4	91.3	86.2	85.7	100
<i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=1)	93.4	91.2	85.7	82.9	100
<i>Sebadella termitidis</i> (n=1)	93.4	90.9	88.5	82.9	100
<i>Leptotrichia buccalis</i> (n=1)	93.4	91.2	88.5	82.9	100
<i>groEL</i> (1596 nt)	93.4	91.3	86.2	85.7	100
GroEL (529 aa)	93.4	91.2	85.7	82.9	100
<i>recA</i> (1013 nt)	93.4	90.9	88.5	82.9	100
RecA (307 aa)	93.4	91.2	88.5	82.9	100
<i>gyrB</i> (1884 nt)	93.4	91.2	85.7	86.2	100
GyrB (620 aa)	93.4	91.2	85.7	86.2	100
16S rRNA gene (1247 nt)	93.4	91.3	88.5	87.2	100

Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

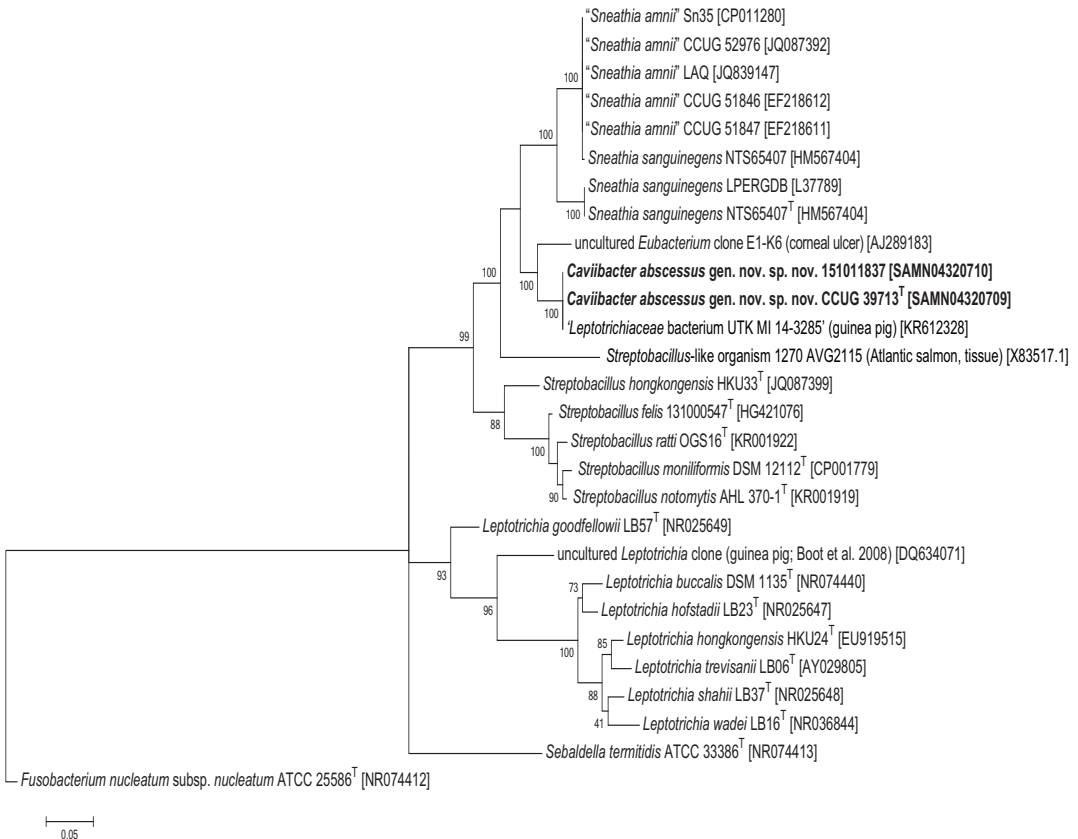
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler¹, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer⁶

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhi.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S1. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. within the family *Leptotrichiaceae*. generated with MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) with the maximum-likelihood method based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) and rapid bootstrap analysis and is based on a 16S rRNA gene sequence alignment of 1257 nt. GenBank accession numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide substitutions per nucleotide.



Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*)
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

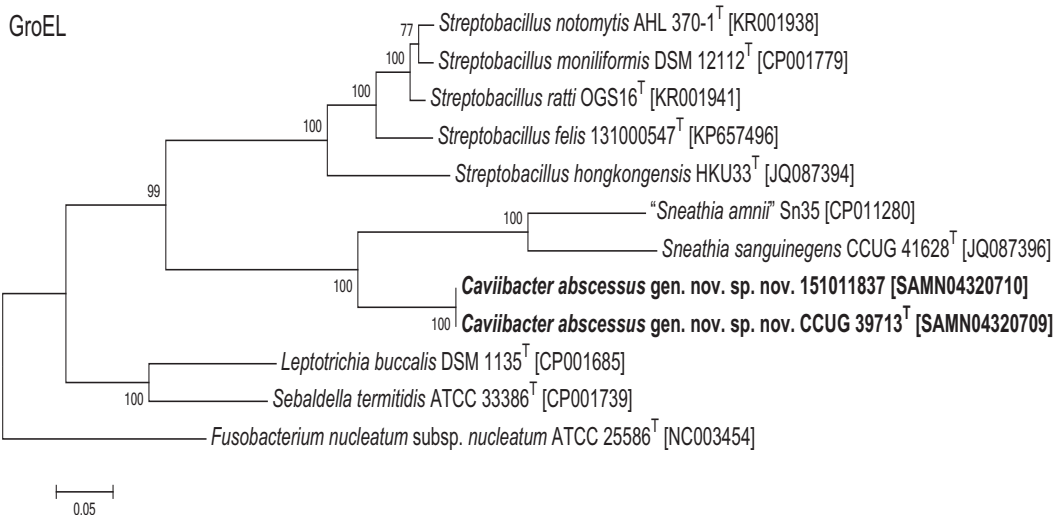
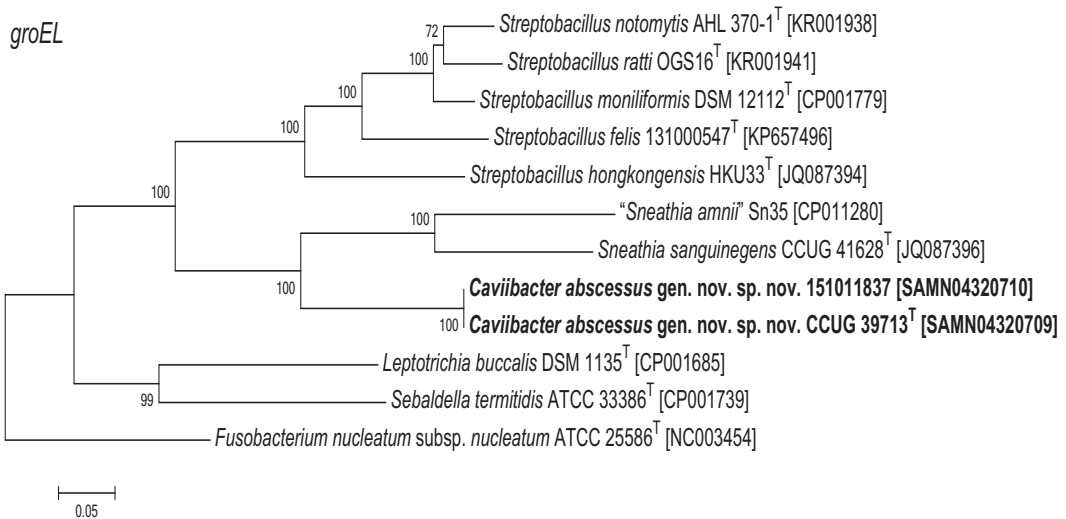
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@ihl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S2. Phylogenetic trees based on partial *groEL* (1596 nt) and GroEL (529 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

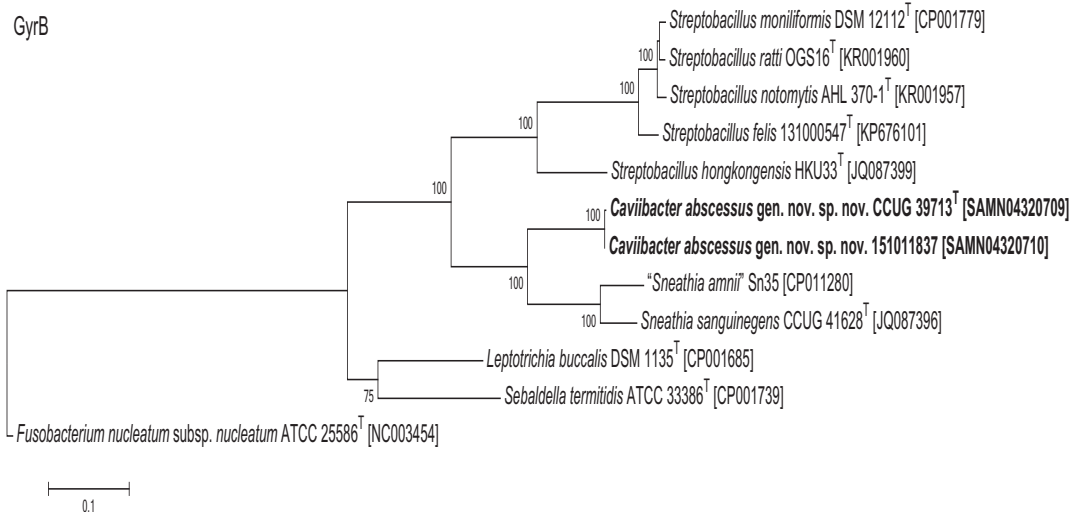
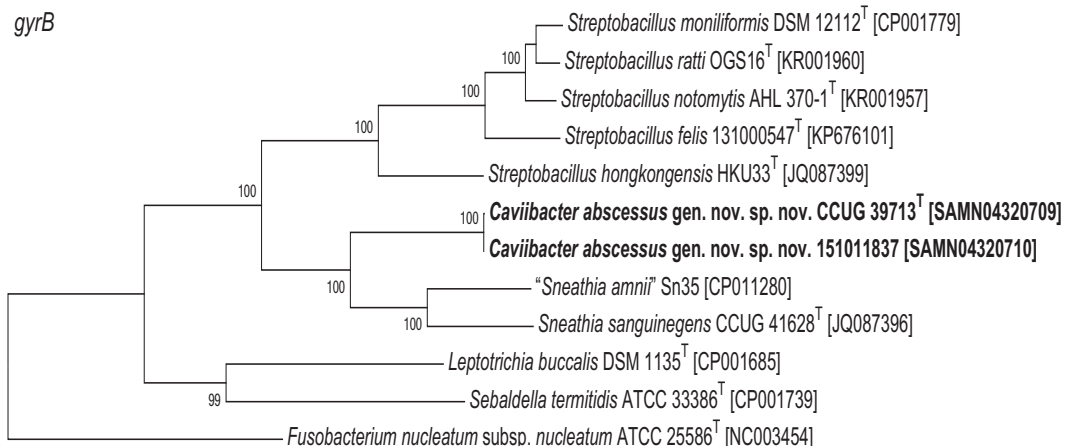
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@ihl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S3. Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (1884 nt) and *GyrB* (620 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide and 0.1 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*)
 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

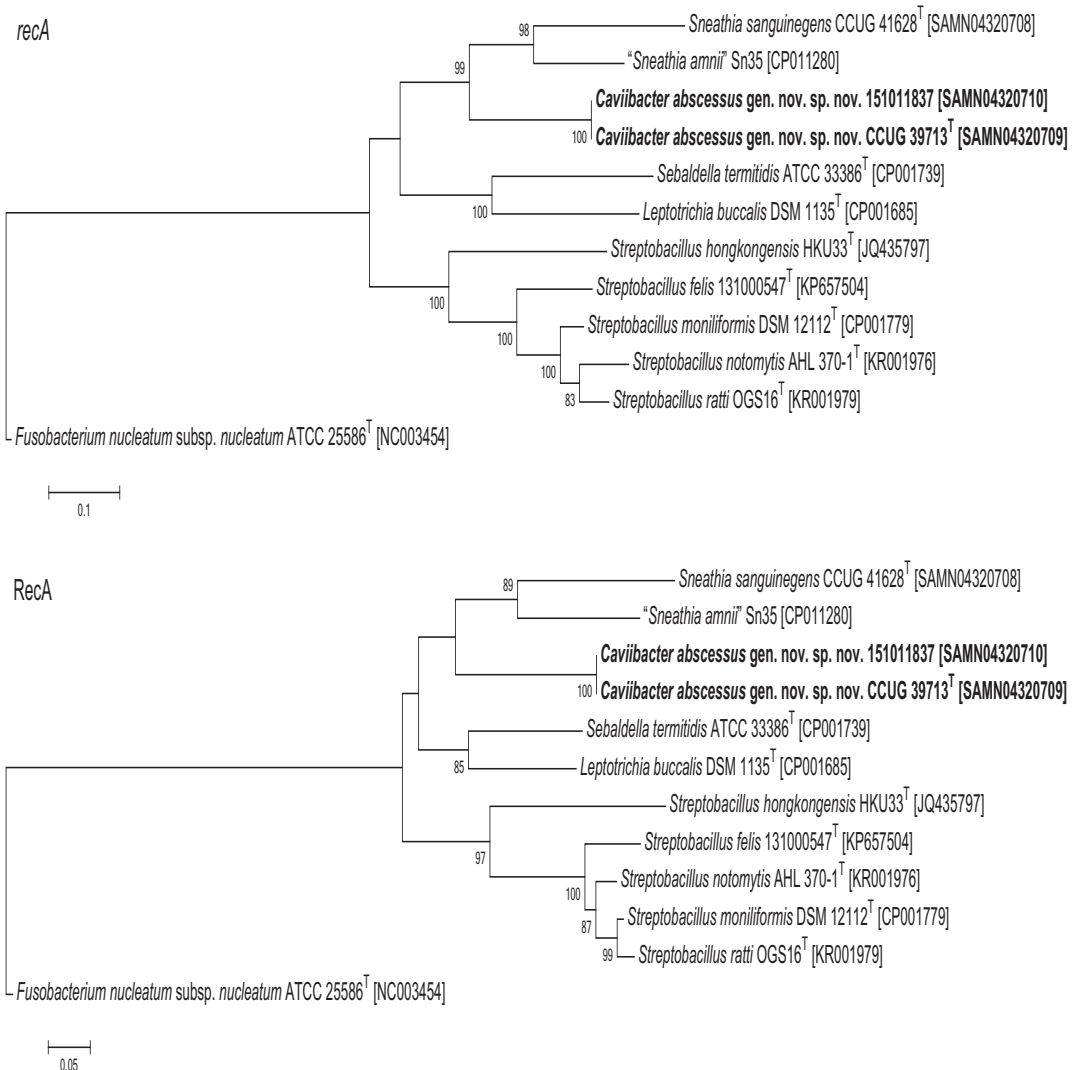
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@ihl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S4. Phylogenetic trees based on partial *recA* (1013 nt) and RecA (307 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in brackets. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*)
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

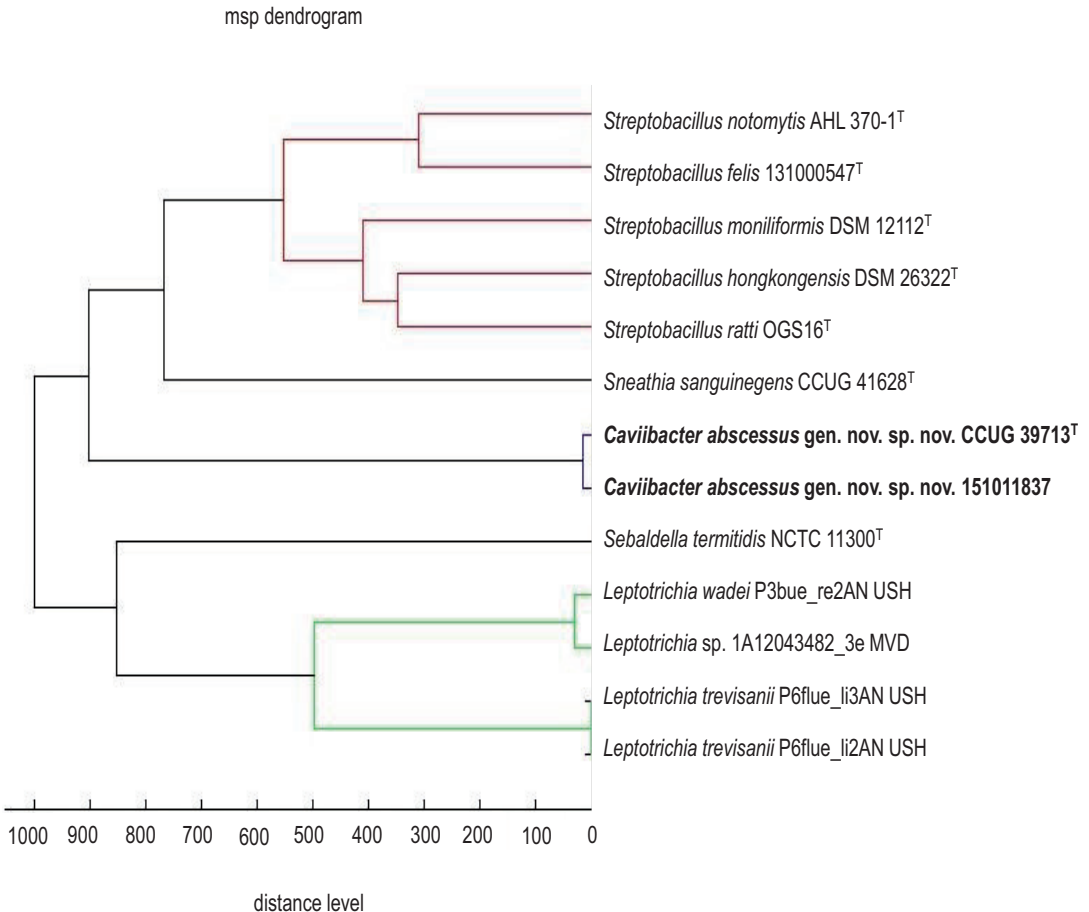
Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@ihl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S5. Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T and 151011837, *Streptobacillus rattii* sp. nov. OGS16^T, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T reference strains were recorded using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper msp Dendrogram Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra of *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T.



Caviibacter abscessus gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*)
 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Stefanie P. Glaeser², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Birgit Drescher⁵ and Peter Kämpfer²

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Kleintierpraxis Dr. Drescher, D-70599 Stuttgart, Germany

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.8 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov., sp. nov., a member of the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Eisenberg, T.*, P. Kämpfer, C. Ewers, T. Semmler, S. P. Glaeser, E. Collins, M. Rutledge & R. Palmer

Int J Syst Evol Microbiol 66(6): 2429-2437.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001050>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Manuscript Including References (Word document)

1 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov., a novel member of the *Leptotrichiaceae* isolated
2 from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

3

4 Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser²,
5 Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

6

7 ¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany

8 ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392
9 Giessen, Germany

10 ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen,
11 D-35392 Giessen, Germany

12 ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany

13 ⁵ Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland

14 ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland

15 ⁷ Maribio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

16

17 **Corresponding author:**

18 Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ H13; D-
19 35392 Giessen, Germany, Phone: +49 641 4800 5219; Fax: +49 641 4800 5268. Dr. Tobias
20 Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de

21

22 **Running title:** Description of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov.

23 **Content category:** New Taxa

24 **Subsection:** Other Bacteria/ Fusobacteriia

25 **Keywords:** *Oceanivirga*; *salmonicida*; Fusobacteriales; novel; Atlantic salmon; *Salmo salar*

26

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

27

28 The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the complete genome sequence of
29 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. NCIMB 703044^T is BioProject PRJNA305231
30 (Accession No. SAMN04320974). Other gene sequences generated within this study are
31 summarized in Table S1.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

32 SUMMARY

33 A pleomorphic, Gram-negative, rod-shaped, indole-, oxidase- and catalase-
34 negative, non-spore-forming, non-motile bacterium was originally isolated in 1992 from
35 moribund, seawater farmed Atlantic salmon with multifocal tissue necrosis. Strain AVG
36 2115^T displayed considerable similarities with *Streptobacillus moniliformis*, one of the
37 two etiological agents of rat bite fever, and has been stored as *Streptobacillus* sp. NCIMB
38 703044^T. On the basis of 16S rRNA gene sequence analyses, this strain displayed >99%
39 sequence similarities with uncultured bacterial clones from the digestive tracts of
40 marine mammals, followed by *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T (92.7%), '*Sneathia*
41 *amni*' Sn35 (92.5%), *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T (92.2%), *Streptobacillus ratti*
42 OGS16^T (91.3%), *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T (91.2%), *Streptobacillus*
43 *moniliformis* DSM 12112^T (91.0%), *Streptobacillus felis* 131000547^T (90.9%) and
44 *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T (89.7%). Sequence similarities to all other
45 taxa were below 89%. Phylogenetic analysis for strain NCIMB 703044^T revealed highly
46 similar results for *gyrB*, *groEL* and *recA* nucleotide and deduced amino acid sequence
47 analyses independent of the employed treeing method. Average nucleotide identities
48 (ANI) for complete genomes ranged from 66.00% to 72.08% between strain NCIMB
49 703044^T and the type strains of *Sebaldella termitidis*, *Leptotrichia buccalis*, *Streptobacillus*
50 *moniliformis*, *Sneathia sanguinegens* and *Caviibacter abscessus*.

51 Chemotaxonomic and physiological data of strain NCIMB 703044^T were in congruence
52 with other closely related members of the family *Leptotrichiaceae*, represented by highly
53 similar enzyme profiles and fatty acid patterns. MALDI-TOF MS analysis was able to
54 clearly discriminate strain NCIMB 703044^T from all currently described taxa of the
55 family *Leptotrichiaceae*. On the basis of these data we propose the novel taxon
56 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. with the type strain AVG 2115^T (= NCIMB
57 703044^T) (= DSM 101867^T). The G+C content of the DNA of the type strain is 25.4%,

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

58 **genome size is 1.77 Mbp.**

59

60 In 1992 and 1993 an unknown bacterial disease occurred on an Atlantic salmon seawater farm
61 in Ireland, causing high mortalities (Palmer *et al.*, 1994). The disease exhibited remarkable
62 pathology, with extensive intra-cellular bacterial growth, particularly in the kidney endothelial
63 cells. Intra- and extracellular viability of bacteria was indicated by specific histological
64 staining. Bacterial isolates, with consistent growth characteristics, were obtained from
65 kidneys, spleens and livers of a total of 19 fish during the 1992 disease occurrence, and from
66 16 fish during the 1993 occurrence. However, only one isolate was maintained for further
67 studies (strain AVG 2115^T, from 1992). The main pathological features of the disease were
68 reproduced in laboratory held naïve fish, with intraperitoneal injections of strain AVG 2115^T.
69 Unfortunately, the origin of the farmed salmon infection could not be determined. Despite
70 close monitoring, the bacterium was not found on the farm in subsequent years and, to the
71 best of our knowledge, the disease has never re-occurred in Ireland or elsewhere.

72 Strain AVG 2115^T was subsequently 16S rRNA gene sequenced (GenBank: X83517.1), and
73 the highest similarity to published 16S rRNA gene sequences, at that time, was to
74 *Streptobacillus moniliformis* (Maher *et al.*, 1995). Indeed, some of the growth characteristics
75 of the isolate resembled those of *Streptobacillus*, such as the flocculent or "cotton ball"
76 growth in broth and the presence of L-forms (max. colony size of 0.1 mm; glistening, entire,
77 "fried egg" colony appearance). However, some striking physiological differences, e.g.
78 optimum growth temperatures of 15-22°C and preferred halophilic growth conditions, gave
79 some doubt to any affiliation with the well-known rat bite fever agent. These authors came to
80 the conclusion that strain AVG 2115^T possibly represents a novel species or genus within a
81 group of closely related species that now form the family *Leptotrichiaceae* (Maher, *et al.*,
82 1995). Strain AVG 2115^T was deposited by Roy Palmer, Aquatic Veterinary Group, National
83 University of Ireland, Galway, Ireland as *Streptobacillus* sp. in the NCIMB Culture

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

84 Collection, Aberdeen, UK (NCIMB 703044^T). However, the current study suggests that,
85 based on remarkable DNA heterogeneity with known *Leptotrichiaceae* species, strain NCIMB
86 703044^T should be assigned to a novel genus of the *Leptotrichiaceae* family.

87 Referring to Palmer, *et al.* (1994), strain AVG 2115^T initially grew on brain heart infusion
88 agar/broth with 10% foetal calf serum (BHIA-FCS, BHIB-FCS, Difco Laboratories and
89 Oxoid Ltd, UK) and 7% horse blood agar (HBA, Difco Laboratories and Oxoid Ltd), both
90 supplemented with 1% sodium chloride (NaCl). Initial isolation succeeded aerobically at
91 22°C after a 4- to 14-day incubation period, with a maximum colony size of 0.3 mm.
92 Anaerobic incubation on these media generally produced a larger maximum colony size of 0.6
93 mm (Palmer, *et al.*, 1994).

94 In the present study, good growth of strain NCIMB 703044^T was observed on tryptone soy
95 agar (TSA, Oxoid, Wesel, Germany) supplemented with 20% horse serum without additional
96 supplementation of NaCl, and weak growth on Columbia agar with 5% sheep blood (SBA;
97 Oxoid) at 15, 20 and 37°C under a microaerophilic atmosphere, but not at 43 or 50°C. A very
98 faint incomplete (α)-haemolysis could be observed on HBA and SBA, that turned into
99 complete (β) haemolysis after seven to 14 days of incubation. Strain NCIMB 703044^T could
100 also be cultivated on SBA supplemented with nalidixic acid and colistin as well as in liquid
101 media (tryptone soy broth [TSB], supplemented with 20% cattle or horse serum), but not on
102 Schaedler, Gassner, MacConkey and chocolate blood agar supplemented with vitamin K and
103 haemin (all Oxoid). Growth is fastidious and colonies are tiny, dry, and butyraceous and
104 slightly opaque, measuring 0.1-0.6 mm in diameter; older colonies may adopt a concave
105 "molar-tooth" appearance (Fig. 1). Gram-staining was done according to the Hucker method
106 as described previously (Gerhardt *et al.*, 1994). Cell morphological features were observed
107 under a Leitz Diaplan light microscope at x1,000, with cells grown for 3 days at 37°C on TSA
108 supplemented with 20% horse serum. Staining revealed small Gram-negative cocco-bacilli
109 $0.40 \pm 0.05 \mu\text{m}$ (width) and $0.60 \pm 0.05 \mu\text{m}$ (length) on solid media; pleomorphic, fusiform to

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

110 filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, weakly acid-fast rods with a size of $0.40 \pm$
111 $0.05 \mu\text{m}$ (width) and $<5.00 \mu\text{m}$ (length) in broth that are arranged in chains and clumps.
112 Electron microscopy was conducted on spleen and kidney samples from the 1992 disease
113 occurrence. Wax embedded tissues were dewaxed, rehydrated, postfixed in 1% osmium
114 tetroxide and embedded in Spurr's resin. Sections (470 nm) were stained with lead citrate and
115 uranyl acetate and were viewed with a Hitachi 7000 transmission electron microscope.
116 Tissues showed extracellular and intracellular bacteria, of a size consistent with the light
117 microscopy description of cultured cells. The bacteria had triple-membraned cell walls, which
118 lacked the membranous folds or scale-like protrusions described for *Leptotrichia* spp. [(Eribe
119 *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 1994); Fig. 2]. In particular, glomerular endothelial cells contained
120 densely packed bacterial cells, within a membrane-bound cytoplasmic vacuole.

121

122 For phylogenetic analysis genomic DNA was extracted from a bacterial culture with a
123 commercial kit according to the manufacturer's instructions (MasterPure™ Complete DNA
124 and RNA Purification Kit, Epicentre, distributed by Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf,
125 Germany) and subjected to whole genome sequencing. De novo assembly was performed
126 with CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). For automatic
127 annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology (Aziz
128 *et al.*, 2008). Gene sequences from annotated genomes were imported into MEGA5.2.2
129 (Tamura *et al.*, 2011) and aligned with relevant reference sequences obtained from the NCBI
130 database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the CLUSTALW alignment tool in MEGA5.2.2
131 with default parameters. For calculation of phylogenetic trees based on nearly full-length 16S
132 rRNA gene sequences, the maximum likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei
133 model (Tamura & Nei, 1993) with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories
134 and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I) was used.
135 Correspondingly, maximum-parsimony (MP) algorithms implemented in MEGA5.2.2 with

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

136 Subtree-Pruning-Regrafting (Nei & Kumar, 2000) were also calculated and assessed. Tree
137 node reliability was examined by bootstrap analysis using 100 re-samplings for each tree. The
138 sequenced 16S rRNA gene fragment of strain NCIMB 703044^T represents an almost
139 continuous stretch of 1515 unambiguous nucleotides between sequence positions 5 to 1548
140 (*E. coli* numbering; (Brosius *et al.*, 1978). The phylogenetic trees based on 1572 nucleotide
141 (nt) positions (Fig. 3) and 16S rRNA gene sequences between sequence termini 91 and 1402
142 [numbering according to the *E. coli* rRNA sequence published by (Brosius, *et al.*, 1978)]. For
143 Supplementary Figure S1, phylogenetic trees were calculated in ARB release 5.2 (Ludwig *et*
144 *al.*, 2004) using the “all species living tree project” [LTPs; (Yarza *et al.*, 2008)] database
145 release (LTPs123, September 2015). For this purpose, 16S rRNA gene sequences not included
146 in the database were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), aligned using
147 the SILVA Incremental Aligner [SINA; v1.2.11; (Pruesse *et al.*, 2012)] and implemented into
148 the LTP database tree. Alignments were checked manually considering information of the
149 secondary structure of the 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic trees were calculated with
150 the maximum-likelihood method using RAxML version 7.04 (Stamatakis, 2006) with GTR-
151 GAMMA and rapid bootstrap analysis, the maximum-parsimony method using DNAPARS v
152 3.6 (Felsenstein, 2005), and the neighbor-joining methods using ARB Neighbor-joining and
153 the Jukes-Cantor correction (Jukes & Cantor, 1969). All phylogenetic trees based on 100 re-
154 samplings [bootstrap analysis; (Felsenstein, 1985)]. Only sequence spanning 16S rRNA gene
155 termini 97 to 1356 according to the *E. coli rrmB* numbering, Brosius *et al.*, 1978) were
156 included in tree calculations. Shorter sequences were not included but added after tree
157 construction into the phylogenetic trees by using the ARB Parsimony quick add option
158 without changing the overall tree topology.

159 16S rRNA gene sequence analysis clearly supports the affiliation of strain NCIMB 703044^T to
160 the family *Leptotrichiaceae* (Fig. 3, Suppl. Fig. S1). It shares highest similarity with an
161 ‘uncultured bacterium clone WDoral10E04’ (99%; KC260719.1) from the mouth of a wild

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

162 common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and a series of unpublished sequences from
163 the digestive tracts of wild and captive common bottlenose dolphins and wild California sea
164 lions (*Zalophus californianus*) (94-99% similarity) (Bik *et al.*, 2008, Bik *et al.*, 2010, Bik *et*
165 *al.*, 2016), followed by uncultured genome sequences of ‘*Sneathia* sp. clone 123-f 47’ from a
166 human vagina (95%; AY738659.1), ‘*Leptotrichia* sp. ES2714_GLU’ from unknown source
167 (94%; JN644765.1), ‘*Streptobacillus* sp. clone Xi_SPA10’ from cape ground squirrel semen
168 (94%; HM590423.1), ‘*Leptotrichia* sp. clone 123-b 6’ from a human vagina (94%;
169 AY724742), the type strain of *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T (92.7%), ‘*Sneathia*
170 *amni*’ Sn35 (92.5%), *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T (92.2%), *Streptobacillus ratti*
171 OGS16^T (91.3%), *Streptobacillus notomytis* AHL370-1^T (91.2%), *Streptobacillus*
172 *moniliformis* DSM 12112^T (91.0%), *Streptobacillus felis* 131000547^T (90.9%) and
173 *Streptobacillus hongkongensis* HKU33^T (89.7%). Sequence similarities to all other taxa are
174 below 89%. For further clarification of the phylogenetic relationship of strain NCIMB
175 703044^T to other members of the *Leptotrichiaceae* phylogenetic analyses based on both
176 partial nucleotide and deduced amino acid sequences of *gyrB*, *groEL*, and *recA* genes were
177 performed to regard also non-synonymous substitutions (Glaeser & Kämpfer, 2015).
178 Respective nucleotide and deduced amino acid sequences were aligned using CLUSTALW
179 (Thompson *et al.*, 1994) implemented in MEGA5.2.2 (Tamura, *et al.*, 2011) as described
180 above. Pairwise sequence similarities were calculated based on *p*-distances (calculated
181 without an evolutionary model). The Jones-Thornton-Taylor model (JTT; (Jones *et al.*, 1992))
182 +G +I was employed for deduced amino acid sequences. All trees are based on 100
183 replications (bootstrap analysis).

184 Using all of the employed phylogenetic methodologies, strain NCIMB 703044^T formed a
185 monophyletic cluster (100% bootstrap support) to the type strains of *Sneathia sanguinegens*
186 CCUG 41628^T and *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T and also to ‘*Sneathia amni*’ Sn35
187 (Fig. 3) and is also clearly separated from the genera *Streptobacillus*, *Leptotrichia* and

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

188 *Sebaldella*. Briefly, phylogenetic trees based on partial nucleotide and more conserved
189 deduced amino acid sequences of *gyrB*, *groEL* and *recA* showed in all trees the formation of a
190 monophyletic cluster for strain NCIMB 703044^T. This strain clustered (with high bootstrap
191 support) closest but in a distinct branch to the *Sneathia* (*Sneathia sanguinegens* CCUG
192 41628^T and ‘*Sneathia amnii*’ Sn35) and *Caviibacter* clades and always also clearly separated
193 from all *Streptobacillus* species (Suppl. Figs. S2-S4). Solely in the *recA* nucleotide and amino
194 acid tree bootstrap support was low and strain NCIMB 703044^T clustered, albeit in a separate
195 clade, more closely with *Leptotrichia* and *Sebaldella* than with *Sneathia* type species. In
196 addition, nucleotide and deduced amino acid sequence similarities were always considerably
197 lower between strain NCIMB 703044^T and type strains of the genera of *Caviibacter*,
198 *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Sebaldella* and *Leptotrichia* (Suppl. Table S2), thereby clearly
199 indicating the genetic distinction of strain NCIMB 703044^T.

200 The evaluation of average nucleotide identity (ANI) analyses has proven to be well-suited for
201 species delineation in *Streptobacillus* species (Eisenberg *et al.*, 2015a, Eisenberg *et al.*, 2016b,
202 Eisenberg *et al.*, 2016c) and superior to DNA-DNA hybridization [DDH; (Eisenberg *et al.*,
203 2015b)]. It was carried out according to the method described by Goris, *et al.* (2007). ANI
204 analysis between strain NCIMB 703044^T compared to *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T
205 [BioProject PRJNA305231 (BioSample SAMN04320709)], *Sneathia sanguinegens* CCUG
206 41628^T [PRJNA305231 (SAMN04320708)], *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T
207 (CP001779), *Leptotrichia buccalis* DSM 1135^T (CP001685) and *Sebaldella termitidis* ATCC
208 33386^T (CP001739) was 72.08%, 71.94%, 69.22%, 68.11% and 66.00%, respectively and
209 therefore significantly below the proposed cut-off for species boundary of 95-96% DNA
210 heterogeneity (Richter & Rossello-Mora, 2009). The same was true for a comparison of strain
211 NCIMB 703044^T with the genomes of further selected type strains, in that ANI values
212 between NCIMB 703044^T and ‘*Sneathia amnii*’ Sn35 (CP011280), *Streptobacillus felis*
213 131000547^T [PRJNA304683 (SAMN04306665)], *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

214 [LJRV00000000 (SAMN04038436)], *Streptobacillus ratti* OGS16^T [LKKW00000000
215 (SAMN04099675)] and *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T [PRJNA304683
216 (SAMN04306666)] were calculated with 71.49%, 70.17%, 70.27%, 69.96% and 69.91%,
217 respectively, which is clearly indicative for heterospecificity (Richter & Rossello-Mora,
218 2009). As a countercheck and to avoid statistical uncertainty, we confirmed these results also
219 by using the *in-silico* genome-to-genome comparison tool (GGDC 2.0; <http://ggdc.dsmz.de/>)
220 that is independently working from ANI and was found to yield higher correlations with
221 conventional DDH (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Strain NCIMB 703044^T constantly
222 displayed DDH estimate levels of 19.2 ± 2.29 to 26.2 ± 2.42 to all type species of the
223 *Leptotrichiaceae* genera using formula 2 [identities/high-scoring pair (HSP) length], thereby
224 clearly falling below the cut-off for species boundary of 70% DNA heterogeneity (Johnson,
225 1984) (data not shown). However, since ANI was found to be not suitable for genus
226 delimitation (Qin *et al.*, 2014), the percentage of conserved proteins (POCP) was assessed to
227 support the designation of a novel genus. POCP calculations for strain NCIMB 703044^T
228 versus *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and
229 *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T were 46.25, 41.03 and 32.87, respectively, thereby
230 confirming the proposed intergenera POCP boundary of below 50% for prokaryotic lineages
231 (Qin, *et al.*, 2014).

232 PCR assays, that were originally designed for the detection of *Streptobacillus moniliformis*,
233 were recently found to be rather genus than species specific (Eisenberg, *et al.*, 2015b).
234 Interestingly, one of these assays even yielded an amplicon for strain NCIMB 703044^T in the
235 PCR according to Rohde, *et al.* (2008), but not in the PCR according to Kimura, *et al.* (2008).
236 Strain NCIMB 703044^T displayed three conserved signature indels (CSIs) in amino acid
237 sequences of MreB/MrI family protein (MreB/MrI; 2 aa deletion), Alanine-tRNA ligase
238 (AlaS; 5 aa insertion) and RecA (2 aa insertion) that were recently found to be specific for the
239 *Leptotrichiaceae* (data not shown) (Gupta & Sethi, 2014).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

240

241 From the results of the sequence analysis of the 16S rRNA, *gyrB*, *groEL* and *recA* genes as
242 well as from ANI and POCP analyses it is evident, that strain NCIMB 703044^T is different
243 from the genera *Caviibacter*, *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Leptotrichia* and *Sebaldella* and
244 therefore should be placed into a novel genus.

245 Results from the physiological characterization are given in the species description and in
246 Table 1, which includes some of the biochemical and enzymatic results from the case
247 description study of Palmer *et al.* (1994). Biochemical profiling for this study was carried out
248 according to the manufacturer's instructions using commercial test systems, i.e. Vitek2-
249 compact with the NHI card (for *Neisseria*/*Haemophilus* identifications) and API-ZYM (both
250 bioMérieux, Nürtingen, Germany). Vitek NHI did not yield an identification of strain NCIMB
251 703044^T (bio profile [bp] 5273000002). Contrarily, the following identifications were found
252 for other selected species of the *Leptotrichiceae*: *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T as
253 *Neisseria cinerea* with 98% confidence (bp 0232000000), *Sneathia sanguinegens* CCUG
254 41628^T as *Haemophilus influenza*/ *Kingella kingae*/ *Branhamella catarrhalis* (bp
255 4210000040/ 4610000040). Strain NCIMB 703044^T cannot reliably be differentiated from
256 type strains of *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and *Streptobacillus moniliformis* DSM
257 12112^T by physiological characteristics alone (Table 1). The antimicrobial susceptibility
258 testing (AST) pattern was determined for this study using minimal inhibitory concentrations
259 (MIC) obtained by broth microdilution test (Merlin Diagnostika, Bornheim, Germany).
260 Briefly, strain NCIMB 703044^T was incubated for 5 days at 15°C in TSB supplemented with
261 20% horse serum and pipetted into commercial microtiter plates for AST. Plates were
262 incubated for four days under identical conditions and AST results revealed the following
263 MIC values (in µg/ml⁻¹): amoxicillin/clavulanic acid (≤0.125/0.0625), ampicillin (<0.125),
264 cefovecin (≥0.5), ceftiofur (<0.125), cephalothin (<1), chloramphenicol (≥16), clindamycin
265 (≤0.03125), colistin (≥4), enrofloxacin (≥2), erythromycin (≤1), florfenicol (≥8), gentamicin

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

266 (≥ 8), oxacillin (≥ 2), penicillin G (< 0.0625), pradofloxacin (≥ 1), spectinomycin (≥ 64),
267 tetracycline (< 0.0625), tiamulin (< 8), tilmicosin (< 1), trimethoprim/sulfamethoxazole ($\geq 4/76$)
268 and tulathromycin (< 2). This pattern is clearly deviant from MIC values that are typical for
269 members of *Sneathia* and *Streptobacillus* (data not shown).

270 For matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-
271 TOF MS), strain NCIMB 703044^T, *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T, *Sneathia*
272 *sanguinegens* CCUG 41628^T, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, *Streptobacillus*
273 *hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus notomytis*
274 AHL 370-1^T, *Streptobacillus ratti* OGS16^T and *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T were
275 incubated for 3-5 d and subsequently selected from the TSA plates supplemented with 20%
276 horse serum and then transferred to steel targets according to manufacturer's instructions
277 (BrukerBiotyper, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). Strains were prepared using the direct
278 transfer protocol provided by the manufacturer. Analysis was performed on a MALDI-TOF
279 MS Biotyper Version V3.3.1.0. The database used (DB 5627, Bruker Daltonics) comprised
280 only one entry from *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T. With this database alone,
281 strain NCIMB 703044^T could not be identified yielding only score levels between 1.3 and 1.5.
282 Following the manual inclusion of respective spectra from strain NCIMB 703044^T as well as
283 other *Streptobacillus* and *Sneathia* type strains to the database all these taxa could be
284 differentiated based on spectral differences. Furthermore, MALDI spectra of strain NCIMB
285 703044^T turned out to be most closely related to *Caviibacter abscessus*. A dendrogram
286 including selected main spectra peak lists (msp) of the family *Leptotrichiaceae* from the
287 Bruker database as well as manual entries of strains NCIMB 703044^T, *Caviibacter abscessus*
288 CCUG 39713^T, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM
289 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus notomytis* AHL370-1^T,
290 *Streptobacillus ratti* OGS16^T and *Sebaldella termitidis* ATCC 33386^T is depicted in Suppl.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

291 Fig. S5 and shows, however, a clear differentiation of strain NCIMB 703044^T with obvious
292 score levels above 2.2 from the other taxa.

293 Fatty acid composition analysis was carried out for all reference strains according to Table 2
294 (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996). The major fatty acids C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} and
295 C_{18:2 ω 6,9c/18:0 ANTE} were in accordance with those found for other members of the same
296 family before (Eisenberg *et al.*, 2016a, Eisenberg, *et al.*, 2016b, Pins *et al.*, 1996, Rowbotham,
297 1983, Rygg & Bruun, 1992).

298 Both, the molecular differences obtained by ANI, *in-silico* DDH, POCP and phylogenetic
299 analyses (Fig. 3 and Suppl. Figs. S1-S4) and the differences based on MALDI-TOF MS
300 (Suppl. Fig. S5) and antimicrobial susceptibility pattern support the separate position of strain
301 NCIMB 703044^T as a separate genus of the family *Leptotrichiaceae*. The dependence of
302 strain NCIMB 703044^T to grow exclusively in the presence of blood or serum, its preference
303 for salinity and colder temperatures, its fastidious growth, its negative reactivity for
304 cytochrome oxidase, catalase, nitrate and indole, the production of cotton ball-like appearance
305 in liquid media, its inducible L-forms beside “normal” small butyraceous colonies, its Gram-
306 negative rod-shaped phenotype support the placement of the isolate in the family
307 *Leptotrichiaceae*, but distinguish it from *Caviibacter abscessus*, *Sneathia sanguinegens* and
308 “*Sneathia amni*” and members of the genus *Streptobacillus*. Moreover, genotypical and
309 phenotypical differences prove strain NCIMB 703044^T as a novel genus different from the
310 genera *Caviibacter*, *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Leptotrichia* and *Sebaldella*. For these reasons,
311 we are here proposing the novel taxon *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. with the
312 type strain AVG 2115^T (=NCIMB 703044^T) (= DSM 101867^T).

313

314 **Description of *Oceanivirga* gen. nov.**

315 *Oceanivirga* (O.ce.a.ni.vir’ga L. n. oceanus, the ocean; L. fem. n.; virga, a slender branch, a
316 rod; N.L. fem. n. Oceanivirga, rod shaped bacterium from sea water (ocean) animals). Rods

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

317 with cocco-bacillary forms. Gram-stain-negative. Non-motile. Non-spore-forming. Growth is
318 principally aerobic, microaerophilic and anaerobic, but optimum growth can be achieved
319 under microaerophilic and anaerobic conditions. Capable to grow with fine α/β -haemolysis on
320 blood agar; requires blood or serum for growth. Optimum temperature for growth is 15-22°C.
321 The major fatty acids are C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1 ω 9c} and C_{18:2 ω 6,9c/18:0} ANTE. The type species is
322 *Oceanivirga salmonicida*.

323

324 **Description of *Oceanivirga salmonicida* sp. nov.**

325 *Oceanivirga salmonicida* (L. n. *salmo* -nis, salmon; L. suff. -cida (from L. v. *caedo*, to cut or
326 kill), murderer, killer; N.L. n. *salmonicida*, salmon-killer). Growth occurs after 4-14 days at
327 15-22°C in an aerobic, microaerophilic or anaerobic atmosphere on BHIA-FCS, BHIB-FCS,
328 HBA (all former supplemented with 1% NaCl, but growth can be observed in 1-4% NaCl
329 [w/v]), SBA, TSA or TSB with 20% horse serum, but no growth is observed on Schaedler,
330 chocolate, Gassner and MacConkey agar. Colonies are tiny, dry, butyraceous and slightly
331 opaque, measuring 0.1-0.6 mm in diameter; older colonies may adopt a concave "molar-
332 tooth" appearance. Colonies are α/β -haemolytic on HBA and SBA. An L-form also occurs,
333 with colonies of 0.1 mm; glistening, entire, "fried egg" appearance; the cells from these
334 colonies are rounded. In liquid media (e.g. TSB with 20% horse serum), growth can be
335 detected after 2-5 days as "cotton ball" appearance. With many passages, it was possible to
336 also grow NCIMB 703044^T at 37°C on solid agars and without addition of NaCl to the
337 medium. Microscopic morphological features are indicative of Gram-negative cocco-bacilli
338 (0.40 +/- 0.05 μ m width and 0.60 +/- 0.05 μ m length) on solid media. In broth media, the
339 morphology is pleomorphic with fusiform to filamentous, non-spore forming, non-
340 encapsulated, weakly acid-fast, non-motile rods (0.40 +/- 0.05 μ m width and <5.00 μ m
341 length), that are arranged in chains and clumps and with filaments showing occasional
342 terminal swellings. Positive for phenylalanine arylamidase, alanine-phenylalanine-proline

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

343 arylamidase, arginine arylamidase, prolin arylamidase, lysin arylamidase, leucine
344 arylamidase, tyrosin arylamidase, pyrrolidonyl arylamidase, phenylphosphonat, acid
345 phosphatase, arginine dihydrolase and fermentation of glucose, fructose and maltose.
346 Negative for motility, growth in NaCl (5% [w/v]), V and X factor dependency, alkaline
347 phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), valine arylamidase, cystine
348 arylamidase, α -chymotrypsin, trypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -
349 galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -
350 mannosidase, α -fucosidase, gelatine hydrolysis, Tween 80 hydrolysis, citrate utilization,
351 Voges Proskauer reaction, urease, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, γ -glutamyl
352 transferase, pyraninamidase, cytochrome oxidase, catalase, nitrate reduction and fermentation
353 of sucrose, ribose, xylose, mannose, mannitol, lactose and glycogen.
354 The type strain AVG 2115^T (=NCIMB 703044^T) (= DSM 101867^T) was isolated from
355 multifocal necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Ireland. The G+C content of the DNA
356 of the type strain is 25.4%, genome size is 1.77 Mbp.

357

358 **Acknowledgement**

359 We thank Anna Mohr, Ulrike Kling, Katharina Engel, Mersiha Curic, Jens Heinbächer, Ursula
360 Leidner, Maria Sowinsky and Gundula Will for excellent technical assistance and Barbara
361 Gamb for making even the most exotic manuscripts available.

362

363 **References**

364 **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & 23 other authors (2008).** The RAST Server: rapid
365 annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75.
366 **Bik, E. M., Chow, E., Carlin, K. P., Jensen, E. D., Venn-Watson, S. & Relman, D. A.**
367 **(2008).** Indigenous microbiota of the bottlenose dolphin. In 2nd ASM Conference on
368 beneficial microbes: beneficial host-microbial interactions. San Diego, California.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 369 **Bik, E. M., Rohlik, C. M., Chow, E., Carlin, K. P., Jensen, E. D., Venn-Watson, S. &**
370 **Relman, D. A. (2010).** Indigenous microbiota of marine mammals. In 13th International
371 Symposium on Microbial Ecology. Seattle, Washington.
- 372 **Bik, E. M., Costello, E. K., Switzer, A. D., Callahan, B. J., Holmes, S. P., Wells, R. S.,**
373 **Carlin, K. P., Jensen, E. D., Venn-Watson, S. & Relman, D. A. (2016).** Marine mammals
374 harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature communications* **7**,
375 10516.
- 376 **Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide
377 sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**,
378 4801-4805.
- 379 **Eisenberg, T., Glaeser, S., Nicklas, W., Mauder, N., Contzen, M., Aledelbi, K. &**
380 **Kämpfer, P. (2015a).** *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. *Int J*
381 *Syst Evol Microbiol* **65**, 2172-2178.
- 382 **Eisenberg, T., Nicklas, W., Mauder, N., Rau, J., Contzen, M., Semmler, T., Hofmann,**
383 **N., Aledelbi, K. & Ewers, C. (2015b).** Phenotypic and genotypic characteristics of members
384 of the genus *Streptobacillus*. *PLoS One* **10**, e0134312.
- 385 **Eisenberg, T., Glaeser, S. P., Ewers, C., Semmler, T., Drescher, B. & Kämpfer, P.**
386 **(2016a).** *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae*
387 isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Int J Syst Evol Microbiol* - **in press**.
- 388 **Eisenberg, T., Glaeser, S. P., Ewers, C. & 8 other authors (2016b).** *Streptobacillus*
389 *notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922
390 and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend.
391 *Int J Syst Evol Microbiol* - **in press**.
- 392 **Eisenberg, T., Imaoka, K., Kimura, M., Glaeser, S. P., Ewers, C., Semmler, T., Rau, J.,**
393 **Nicklas, W. & Kämpfer, P. (2016c).** *Streptobacillus ratti* sp. nov. isolated from a black rat
394 (*Rattus rattus*) *Int J Syst Evol Microbiol* - **in press**.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 395 **Eribe, E. R., Paster, B. J., Caugant, D. A., Dewhirst, F. E., Stromberg, V. K., Lacy, G. H.**
396 **& Olsen, I. (2004).** Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia*
397 *goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and
398 *Leptotrichia wadei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 583-592.
- 399 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap.
400 *Evolution* **39**, 783-791.
- 401 **Felsenstein, J. (2005).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6. Distributed by
402 the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- 403 **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. R. (1994).** *Methods for general*
404 *and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 405 **Glaeser, S. P. & Kämpfer, P. (2015).** Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
406 taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **38**, 237-245.
- 407 **Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. &**
408 **Tiedje, J. M. (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-
409 genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- 410 **Gupta, R. S. & Sethi, M. (2014).** Phylogeny and molecular signatures for the phylum
411 Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe* **28**, 182-198.
- 412 **Johnson, J. L. (1984).** Bacterial Classification III. Nucleic acids in bacterial classification. In
413 Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 8-11. Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt.
414 Baltimore, London: The Williams & Wilkins Co.
- 415 **Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1992).** The rapid generation of mutation
416 data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**,
417 275-282.
- 418 **Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of the protein molecules. In Mammalian
419 protein metabolism, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 420 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid patterns of
421 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- 422 **Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. &**
423 **Yamada, A. (2008).** Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase
424 chain reaction. *Microbiol Immunol* **52**, 9-15.
- 425 **Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R. & 29 other authors (2004).** ARB: a software
426 environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363-1371.
- 427 **Maher, M., Palmer, R., Gannon, F. & Smith, T. J. (1995).** Relationship of a novel bacterial
428 fish pathogen to *Streptobacillus moniliformis* and the Fusobacteria group, based on 16S
429 ribosomal RNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 79-84.
- 430 **Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P. & Goker, M. (2013).** Genome sequence-
431 based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC*
432 *Bioinformatics* **14**, 60.
- 433 **Nei, M. & Kumar, S. (2000).** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford
434 University Press.
- 435 **Palmer, R., Drinan, E. & Murphy, T. (1994).** A previously unknown disease of farmed
436 Atlantic salmon: pathology and establishment of bacterial aetiology. *Dis Aquat Org* **19**, 7-14.
- 437 **Pins, M. R., Holden, J. M., Yang, J. M., Madoff, S. & Ferraro, M. J. (1996).** Isolation of
438 presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital
439 tract. *Clin Infect Dis* **22**, 471-476.
- 440 **Pruesse, E., Peplies, J. & Glockner, F. O. (2012).** SINA: accurate high-throughput multiple
441 sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**, 1823-1829.
- 442 **Qin, Q. L., Xie, B. B., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhou, J., Oren, A. &**
443 **Zhang, Y. Z. (2014).** A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic
444 insights. *J Bacteriol* **196**, 2210-2215.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 445 **Richter, M. & Rossello-Mora, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the
446 prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19126-19131.
- 447 **Rohde, J., Rapsch, C. & Fehr, M. (2008).** Case report: Abscessation due to *Streptobacillus*
448 *moniliformis* in a rat [in German]. *Prakt Tierarzt* **89**, 466-473.
- 449 **Rowbotham, T. J. (1983).** Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. *Lancet* **2**,
450 567.
- 451 **Rygg, M. & Bruun, C. F. (1992).** Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with
452 septicemia in a child. *Scand J Infect Dis* **24**, 535-540.
- 453 **Smith, S. H., Murray, R. G. & Hall, M. (1994).** The surface structure of *Leptotrichia*
454 *buccalis*. *Can J Microbiol* **40**, 90-98.
- 455 **Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses
456 with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
- 457 **Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the
458 control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512-
459 526.
- 460 **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).**
461 MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary
462 distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- 463 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the
464 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-
465 specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- 466 **Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Ludwig, W.,
467 Glockner, F. O. & Rossello-Mora, R. (2008).** The all-species living tree project: a 16S
468 rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**, 241-250.
- 469
- 470

Table 1. Physiological characteristics of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. NCIMB 703044^T, and the type species strains of *Streptobacillus moniliformis*, *Sneathia sanguinegens* and *Caviibacter abscessus* as obtained by VITEK2-compact with the NHI card[†], API-ZYM^{‡#} (both bioMérieux) and classical reactions[§]; * data obtained from Palmer, *et al.* (1994). Taxa: 1, *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. NCIMB 703044^T; 2, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 3, results from six *Streptobacillus moniliformis* reference strains (ATCC 27747, ATCC 49567, ATCC 49940, NCTC 11194, CIP 55-48 and CIP 81-99); 4, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 5, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 6, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T; 7, *Streptobacillus rattii* OGS16^T; 8, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T; 9, *Caviibacter abscessus* CCUG 39713^T; +, positive; -, negative; +/- variable; n.d., not determined. Congruent results are solely presented in the species description.

Character	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<u>Growth</u>									
Haemolysis on SBA [§]	(+)	-	+/-	+	+	-	+	-	-
10°C, 15°C, 22°C [§]	+, +, +*	-, -, +	-, -, +	-, -, +	-, -, +	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -
37°C [§]	-*	+	+	+	+	+	+	+	+

Biochemical tests

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Indole production[§]

+/-*

-

-

-

-

-

-

-

-

score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0-2: negative [-], 3: weak [w], 4-5: positive [+])

Table 2. Cellular fatty acid pattern of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. NCIMB 703044^T and type strains of the five *Streptobacillus* species. Taxa: 1, *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. NCIMB 703044^T; 2, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 3, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 4, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 5, *Streptobacillus notomysis* AHL 370-1^T; 6, *Streptobacillus ratti* OGS16^T; Biomass for fatty acid analysis was harvested after 3 days of growth in capnophilic environment with 10% CO₂ on Columbia sheep blood agar at 36°C.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
C _{14:0}	-	1.5	-	1.5	1.6	1.5
C _{15:0<i>iso</i>}	-	3.9	3.0	2.1	-	-
C _{16:0}	25.8	27.8	26.5	28.2	29.4	28.7

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

C _{17:0}	-	1.5	-	1.5	-	1.5
summed feature 5 C _{18:0} ANTE/C _{18:2} ω6,9c	11.6	13.3	5.6	12.1	13.0	8.5
C _{18:1} ω6c	-	2.2	-	2.0	26.6	5.9
C _{18:1} ω9c	38.2	25.1	30.2	24.1	29.4	23.6
C _{18:0}	13.7	23.5	34.7	21.6	-	26.3
C _{20:4} ω6,9,12,15c	-	1.2	-	1.1	-	-
unidentified	10.7	-	-	-	-	-

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

For unsaturated fatty acids, the position of the double bond is located by counting from the methyl (ω) end of the carbon chain. *cis* isomers are indicated by the suffix *c*.

Fig. 1. *Oceanivirga salmonicida* colonies with "molar tooth" appearance. Growth for 14 d at 22 °C, on supplemented brain heart infusion agar.

Scale bar = 0.25 mm

Fig. 2. Transmission electron micrographs of moribund *Salmo salar* kidney tissue. Large arrows indicate intracellular *Oceanivirga salmonicida*.

Small arrows indicate cytoplasmic vacuole membranes, of the host cells. A. Scale bar = 20 µm. B. Scale bar = 0.5 µm.

Fig. 3. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. within the family

Leptotrichiaceae. The tree was generated in MEGA5.2.2 based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) with a discrete Gamma-distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionary invariable (+I). The tree is based on 1572 nucleotide positions and 16S rRNA gene sequences between sequence termini 91 and 1402 (numbering according to the *E. coli* rRNA sequence published by (Brosius, et al., 1978). GenBank accession numbers are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates). Bar, 0.05 nucleotide substitutions per site. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586T was used as outgroup.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

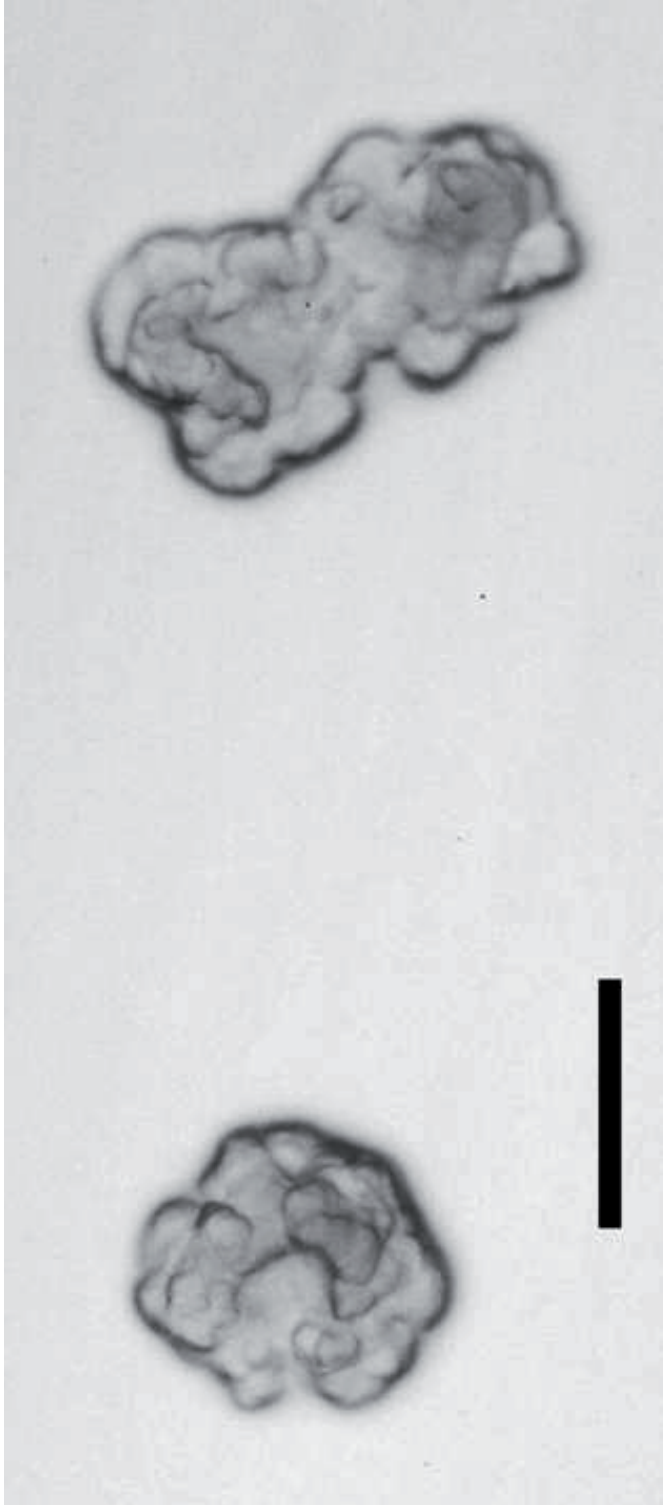


Figure 1 grayscale

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

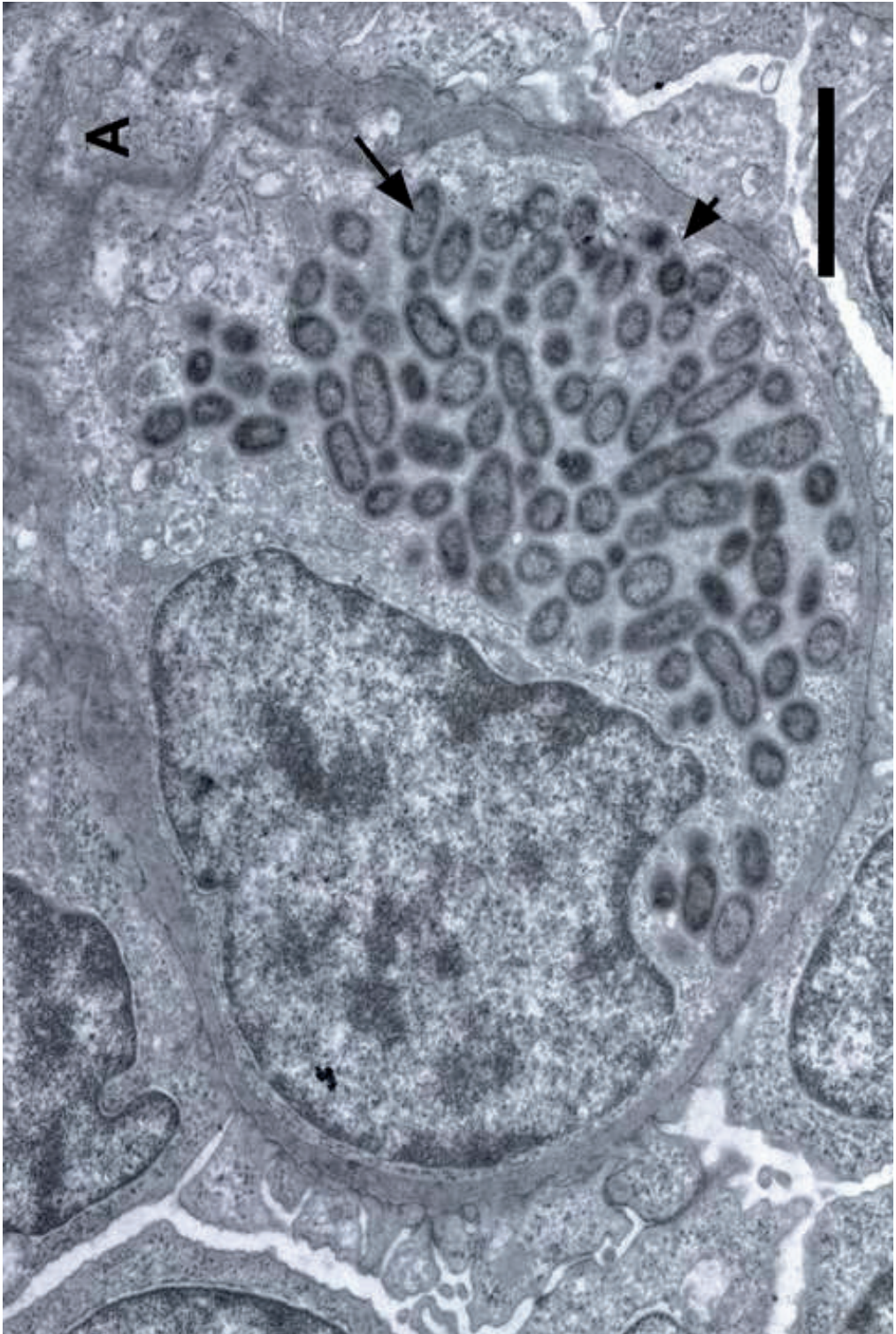


Figure 2A

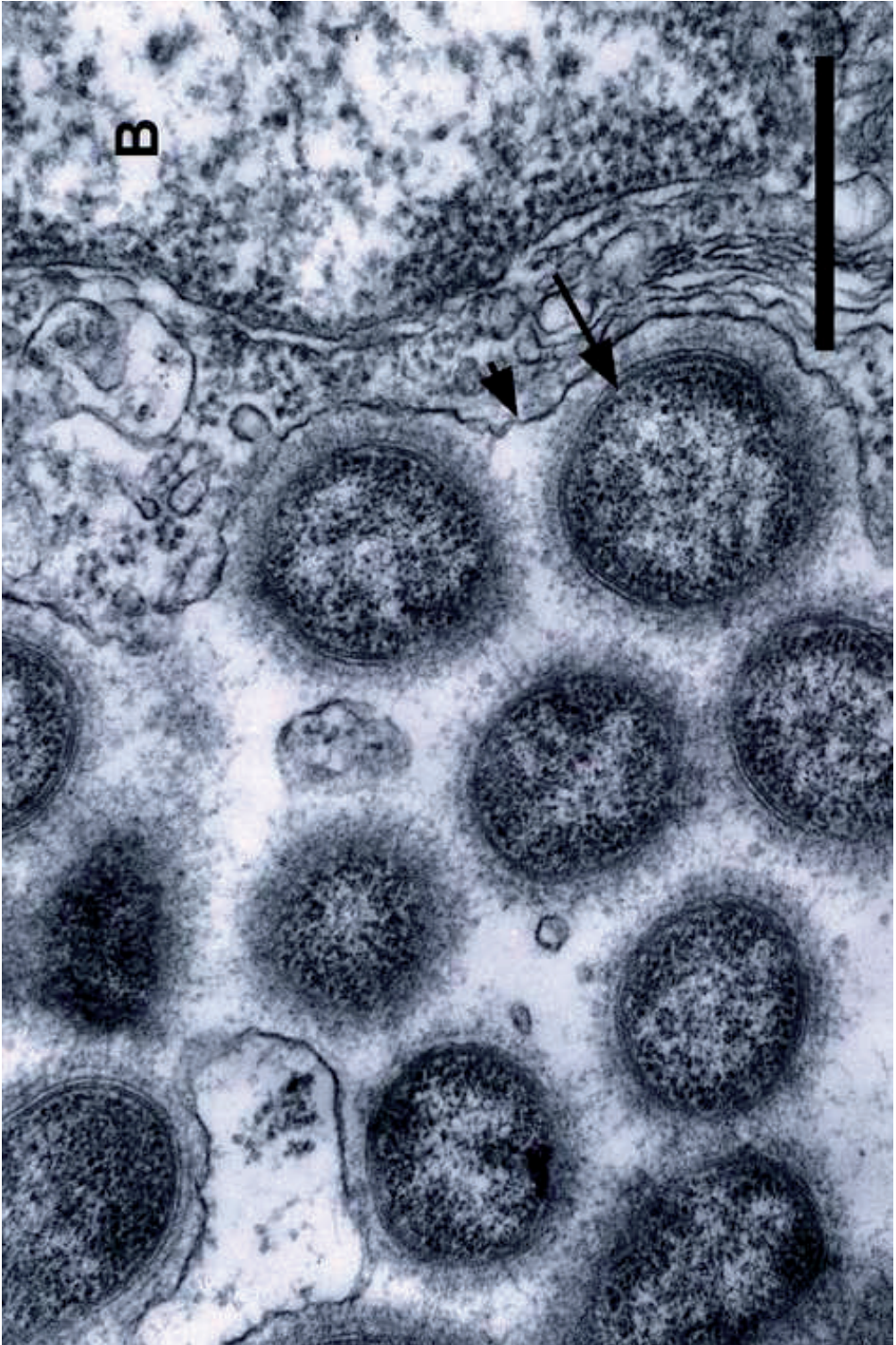
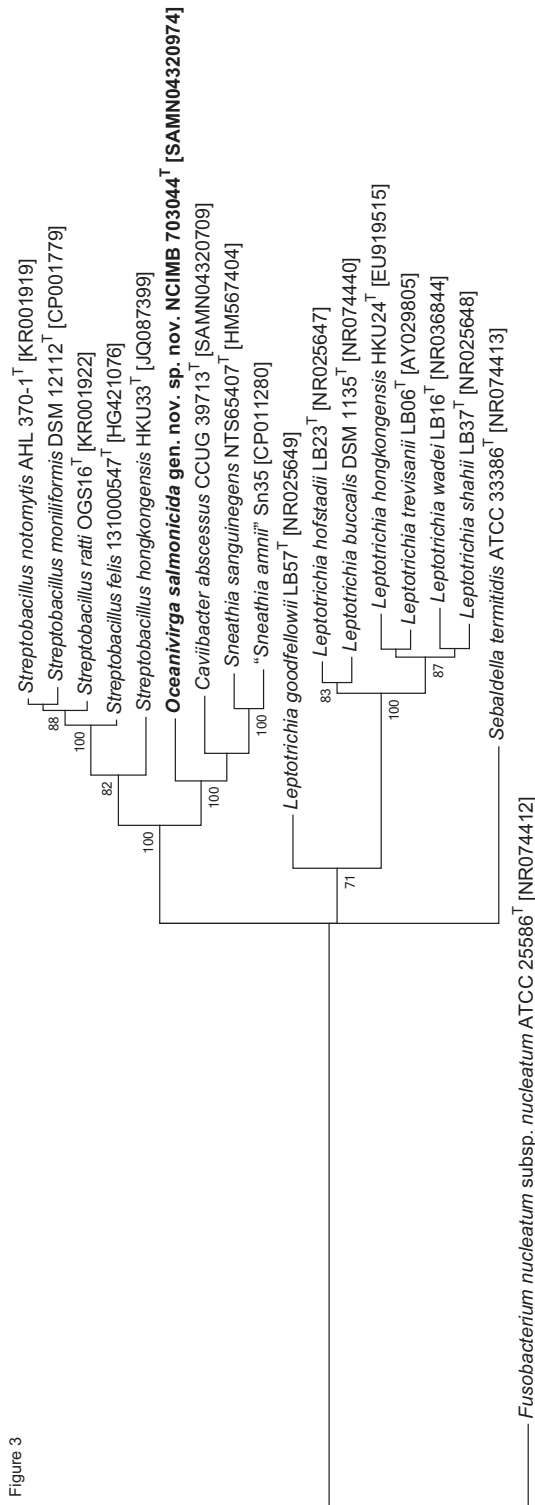


Figure 2B

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table S1. Overview of gene sequences of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov., *Caviibacter abscessus*, *Sneathia sanguinegens*, *Streptobacillus ratti*, *Streptobacillus notomytis* and *Streptobacillus felis* strains analyzed within this study. Gene sequences were obtained from non-published genomes. All other sequences were obtained from GeneBank. The accession number for the genome sequence of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. is BioProject PRJNA305231 (Accession No. SAMN04320974).

Species	Strain	Isolation source	16S rRNA	gyrB	groEL	recA
<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov.	NC:IMB 703044 ^T	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>), multifocal tissue necrosis, Ireland		SAMN04320974		
<i>Caviibacter abscessus</i>	CCUG 39713 ^T	guinea pig (<i>Cavia porcellus</i>), mandibular lymph node abscess, Sweden		SAMN04320709		
<i>Sneathia sanguinegens</i>	CCUG 41628 ^T	human blood, complicated delivery, Sweden		SAMN04320708		
<i>Streptobacillus ratti</i>	OGS16 ^T	black rat (<i>Rattus rattus</i>), oral cavity, Japan	KR001922	KR001960	KR001941	KR001979
<i>Streptobacillus notomytis</i>	AHL 370-1 ^T	spinifex hopping mouse (<i>Notomys alexis</i>) with septicaemia, Australia	KR001919	KR001957	KR001938	KR001976
<i>Streptobacillus felis</i>	131000547 ^T	cat with pneumonia, Germany	HG421076	KP676101	KP657496	KP657504

Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Marine Institute, Rinvilla, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷ Marbio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg, E-mail: tobias.eisenberg@h1.hessen.de

Table S2. Sequence similarities of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. compared to the type species strains of *Caviibacter*, *Sneathia*, *Streptobacillus*, *Sebatdella* and *Leptotrichia*. Sequence similarities were calculated based on p-distances determined in MEGA5.2.2. 16S rRNA gene sequence similarities, *rpoB*, *groEL*, and *recA* nucleotide and amino acid sequence similarities. n: number of investigated isolates. The strains included in this analysis are those shown in the phylogenetic trees (Fig S1–S3).

	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)	<i>Oceanivirga salmonicida</i> gen. nov. sp. nov. (n=1)
	<i>Caviibacter abscessus</i> (n=1)	<i>Sneathia sanguinegens</i> (n=1)	<i>Streptobacillus moniliformis</i> (n=1)	<i>Sebatdella termitidis</i> (n=1)	<i>Leptotrichia buccalis</i> (n=1)	
<i>groEL</i> (1626 nt)	92.7	92.5	84.5	83.4	84.3	
<i>GroEL</i> (539 aa)	92.7	92.5	83.4	84.5	84.3	
<i>recA</i> (1156 nt)	92.5	92.2	83.4	84.3	84.5	
<i>RecA</i> (392 aa)	91.1	92.2	89.7	84.3	84.5	
<i>gyrB</i> (2034 nt)	92.5	92.2	89.7	84.3	84.5	
<i>GyrB</i> (677 aa)	92.5	92.2	89.7	84.3	84.5	
16S rRNA gene (1572 nt)	92.2	92.7	91.0	87.4	85.2	

Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

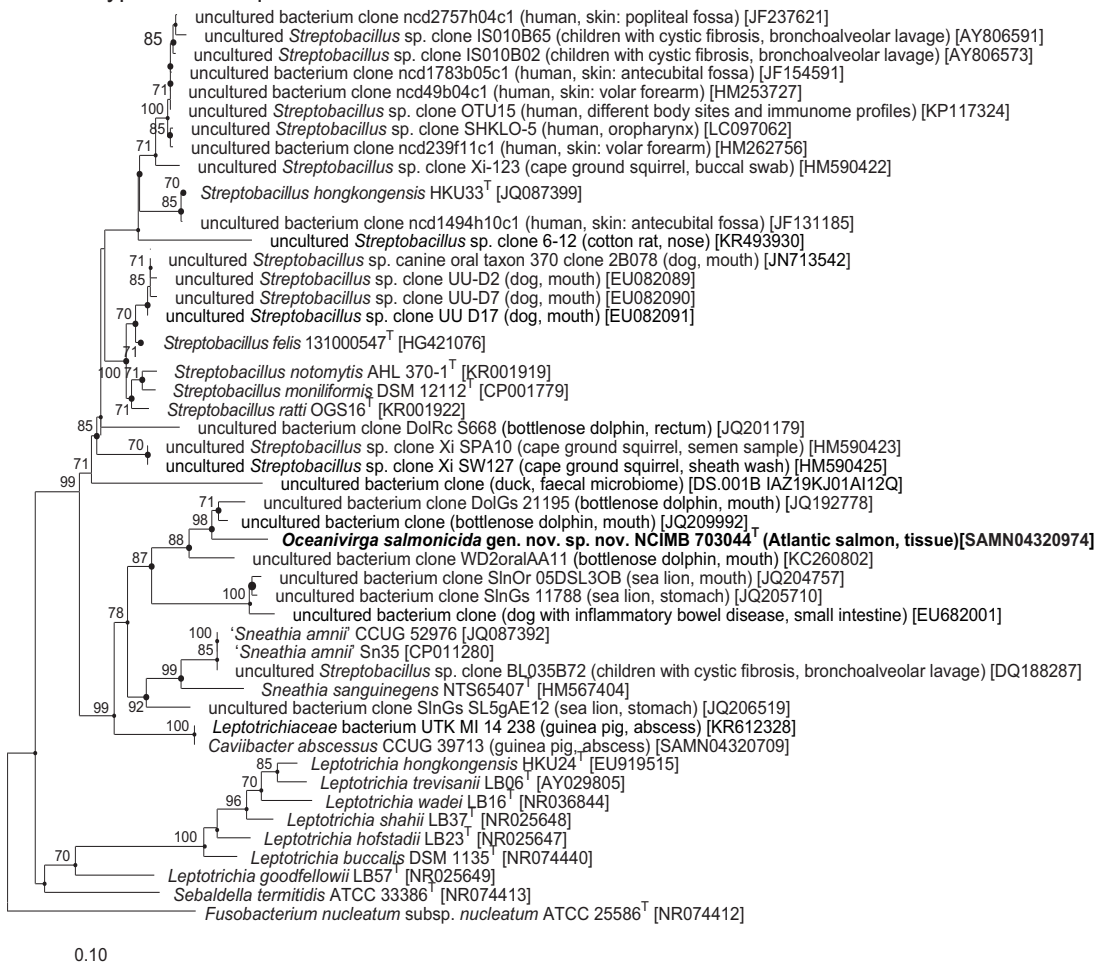
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer¹, Christa Ewers², Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins², Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷
¹Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ²Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵Marine Institute, Rinville, Orammore, Co. Galway, Ireland; ⁶Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷Marbio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg, E-mail: tobias.eisenberg@hhi.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S1. Maximum parsimony (MP) tree showing the phylogenetic relationship of cultured *Leptotrichiaceae* species and those only represented by environmental 16S rRNA gene sequences. The tree was calculated in ARB using DNAPARS and based on 16S rRNA gene sequences spanning at least gene termini 97 to 1356 (Brosius, *et al.* 1978). Shorter sequences were added after tree construction without changing the overall tree topologies. Large circles represent nodes that were at least also present with high bootstrap support in the Maximum likelihood (ML) tree. Small circles mark nodes that were also present in the MP and neighbor joining tree, but in the ML tree only supported by bootstrap values <70%. GenBank/EMBL/DBJ accession numbers of the sequences are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values >70% (100 replicates). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide substitutions per nucleotide position. ^T marks type strain sequences.



Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

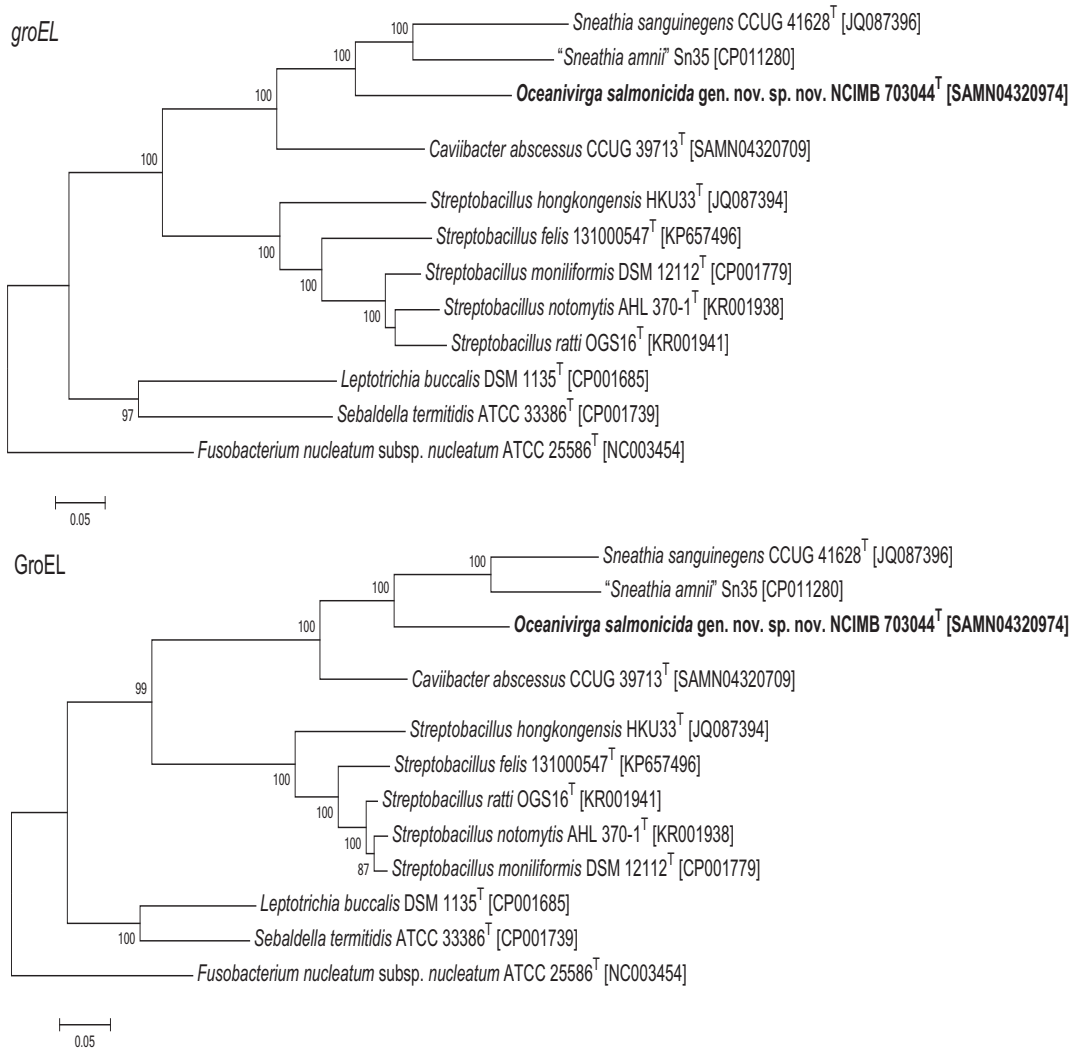
Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷ Maribio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@hl.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S2. Phylogenetic trees based on partial *groEL* (1626 nt) and GroEL (539 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in parentheses. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.05 nucleotide and 0.05 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

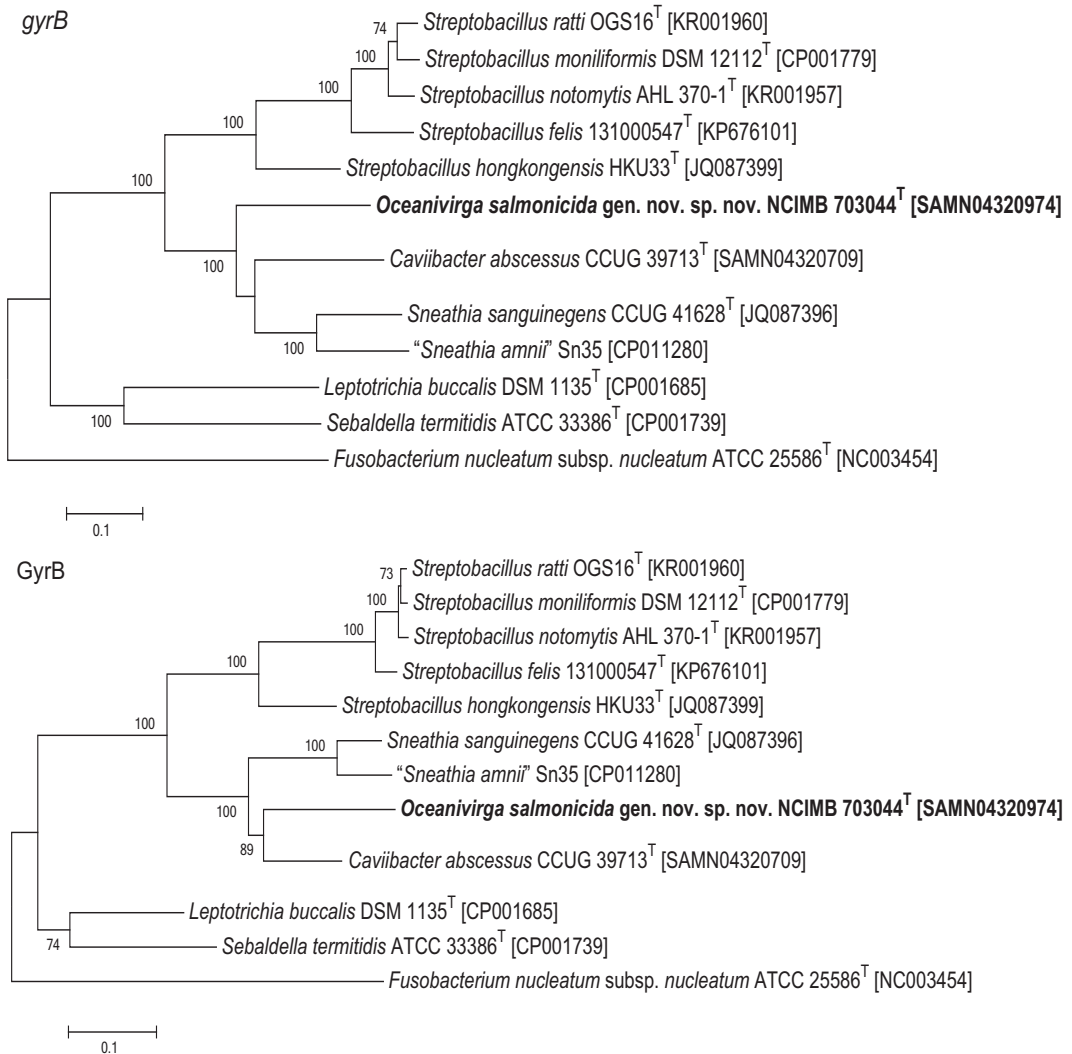
Tobias Eisenberg¹, Christa Ewers², Torsten Semmler³, Peter Kämpfer⁴, Stefanie P. Glaeser⁴ and Roy Palmer⁵

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁴ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁵ National Diagnostics Centre, BioResearch Ireland, University College Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@h1.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S3. Phylogenetic trees based on partial *gyrB* (2034 nt) and *GyrB* (677 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in parentheses. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide and 0.1 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

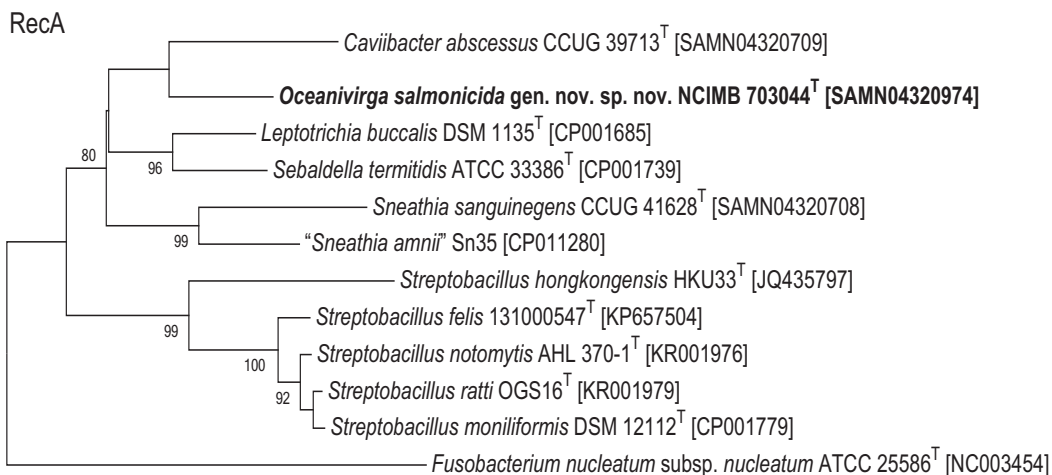
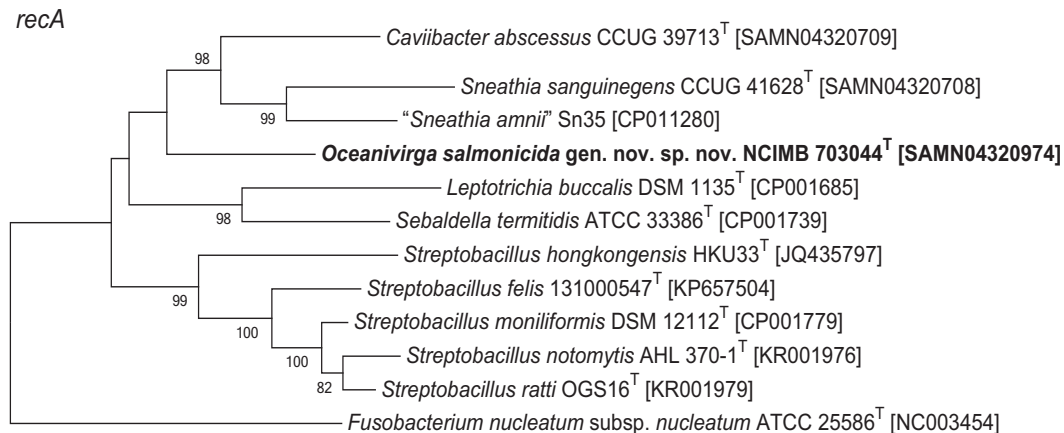
Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷ Maribio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@h1.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S4. Phylogenetic trees based on partial *recA* (1156 nt) and *RecA* (392 aa) sequences including type strains of all genera of the family *Leptotrichiaceae*, showing the phylogenetic relationship of *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov. to other taxa. The trees were generated in MEGA5.2.2 (Tamura, et al., 2011) using the maximum-likelihood method with the GTR+G+I model (nucleotide sequences) or the JTT+G+I model (amino acid sequences) and 100 bootstraps. Numbers at nodes represent bootstrap values >70%. Acc. numbers are given in parentheses. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide and 0.1 amino acid substitutions per nucleotide or amino side, respectively.



Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

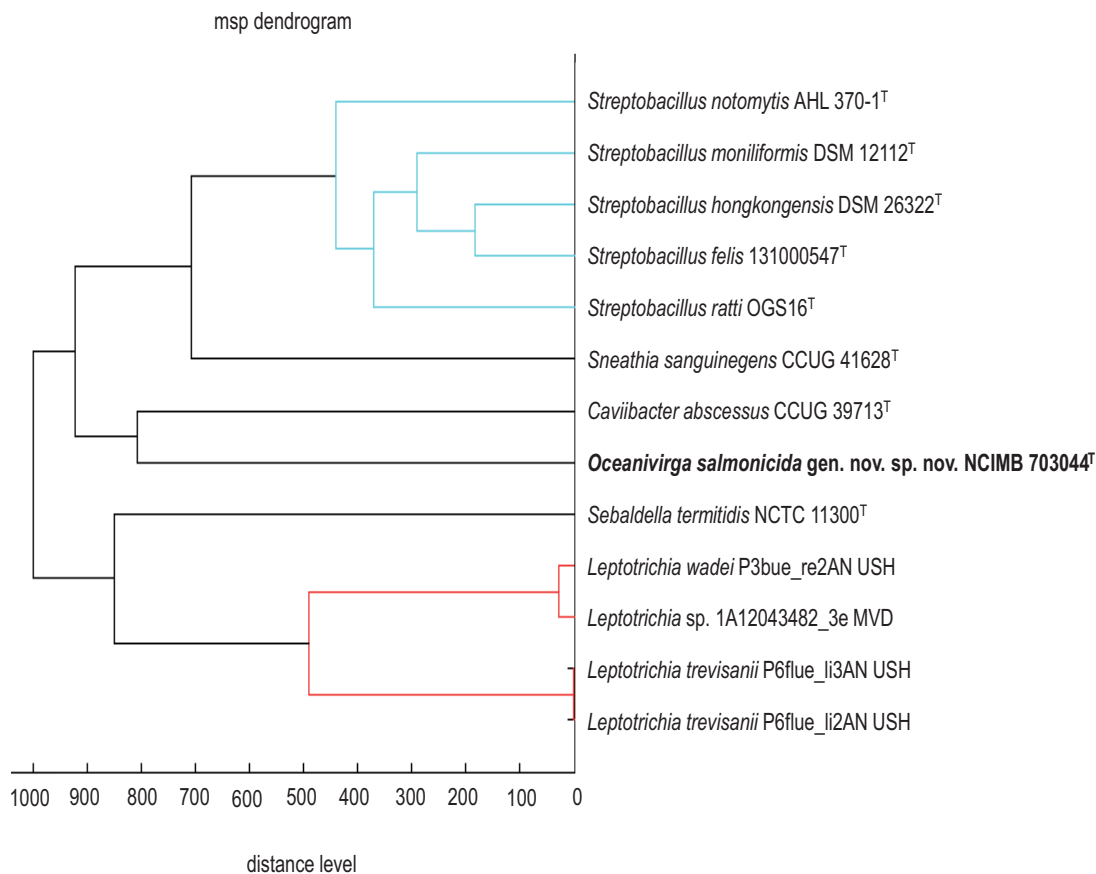
Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷ Maribio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@h1.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Fig. S5. Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Caviibacter abscessus* gen. nov. sp. nov. CCUG 39713^T and 151011837, *Streptobacillus ratti* sp. nov. OGS16^T, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Sneathia sanguinegens* CCUG 41628^T and *Sebaldella termitidis* NCTC 11300^T reference strains were recorded using the direct transfer protocol. The dendrogram was generated using the BioTyper msp Dendrogram Creation Standard Method (v1.4) of the MALDI Biotyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB 5627, BrukerDaltonics) comprised 24 spectra of *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T.



Oceanivirga salmonicida gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Tobias Eisenberg¹, Peter Kämpfer², Christa Ewers³, Torsten Semmler⁴, Stefanie P. Glaeser², Evelyn Collins⁵, Margaret Rutledge⁶ and Roy Palmer⁷

¹ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, D-35392 Giessen, Germany; ² Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ³ Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany; ⁴ Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany; ⁵ Marine Institute, Rinville, Oranmore, Co. Galway, Ireland; ⁶ Enterprise Ireland, Mervue Business Park, Galway, Ireland; ⁷ Maribio Consultants, Moycullen, Co. Galway, Ireland

Corresponding author: Tobias Eisenberg. E-mail: tobias.eisenberg@h1.hessen.de

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.9 Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other *Streptobacillus* infections in humans and animals.

Eisenberg, T.*, C. Ewers, J. Rau, V. Akimkin & W. Nicklas

Virulence, 7(6): 630-648.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| • Initiative | weitestgehend eigenständig |
| • Projektplanung | weitestgehend eigenständig |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | weitestgehend eigenständig |

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

1 **Title**

2 Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other *Streptobacillus*
3 infections in humans and animals

4

5 **Authors**

6 Eisenberg, Tobias^{1*}, Christa Ewers², Jörg Rau³, Valerij Akimkin³ & Werner Nicklas⁴

7

8 **Affiliations:**

9 ¹ Hessisches Landeslabor, Schubertstr. 60, D-35392 Gießen, Germany

10 ² Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen,
11 Frankfurter Str. 85-89, D-35392 Giessen, Germany

12 ³ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstraße 3/2, D-70736
13 Fellbach, Germany

14 ⁴ Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg,
15 Germany

16

17 * corresponding author, mailing address: Hessisches Landeslabor, Abteilung
18 Veterinärmedizin, Schubertstr. 60/ Haus 13, 35392 Gießen, Germany. Phone: 49-641-4800
19 5219. Fax: 49-641-4800 5268. E-mail: tobias.eisenberg@lhl.hessen.de.

20

21 **Keywords**

22 rat bite fever, 16S rRNA gene sequencing, housekeeping genes, next generation sequencing,
23 antimicrobial sensitivity testing, MALDI-TOF MS, Fourier transformation infrared
24 spectroscopy, electron microscopy, serology

25

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

26 **Running title:**

27 Rat bite fever – diagnostics of *Streptobacillus* infections in humans and animals

28

29 **Conflict-of-interest and financial disclosure statement:**

30 We state that we do not have a conflict of interests or did receive any funding for this work.

31

32 **List of abbreviations and acronyms**

33 ANI: average nucleotide identity

34 API: analytical profile index

35 ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

36 BHI: brain heart infusion

37 bp: base pair

38 CIP: Collection of Institute Pasteur, Paris, France

39 DDH: DNA-DNA homology

40 DIN: Deutsche Industrienorm (German standard)

41 DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany

42 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

43 FISH: fluorescence *in situ* hybridization

44 FT-IR: Fourier transform-infrared spectroscopy

45 G/C: guanine/cytosine (contents)

46 HF: Haverhill fever

47 IB: immunoblotting

48 IFA: immunofluorescence assay

49 IU: international units

50 kDa: kilo Dalton

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 51 L-form: cell wall deficient variant, derived from Lister (L) institute
- 52 MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass
53 spectrometry
- 54 MLSA: multilocus sequence analysis
- 55 MLST: multilocus sequence typing
- 56 MIC: minimum inhibitory concentration
- 57 NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK
- 58 OD: optical density
- 59 PCR: polymerase chain reaction
- 60 RBF: Rat bite fever
- 61 *S.*: *Streptobacillus*
- 62 SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- 63 SPS: sodium polyanethol sulfonate
- 64 ^T: type strain
- 65 TLR: Toll-like receptor
- 66 w/v: mass/volume
- 67

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

68 **Abstract**

69 Rat bite fever (RBF), a worldwide occurring and most likely under-diagnosed zoonosis
70 caused by *Streptobacillus moniliformis*, represents the most prominent disease of
71 *Streptobacillus* infections. Recently, novel members have been described, from which a
72 reservoir in rats and other animal species and a zoonotic potential can be assumed. Despite
73 regularly published case reports, diagnostics of RBF continues to represent a ‘diagnostic
74 dilemma’, because the mostly applied 16S rRNA sequence analysis may be uncertain for
75 proper pathogen identification. Virtually nothing is known regarding prevalence in humans
76 and animal reservoirs. For a realistic assessment of the pathogen’s spread, epidemiology and
77 virulence traits, future studies should focus on the genomic background of *Streptobacillus*.
78 Full genome sequence analyses of a representative collection of strains might facilitate to
79 unequivocally identify and type isolates. Prevalence studies using selective enrichment
80 mechanisms may also enable the isolation of novel strains and candidate species of this
81 neglected group of microorganisms.

82

83 **Introduction**

84 For almost a century, *Streptobacillus moniliformis* represented a monotypic species within the
85 genus *Streptobacillus*¹ (*Streptobacillus*, *Fusobacteriales*) causing streptobacillary rat bite
86 fever (RBF) and Haverhill fever (HF).² RBF was first noted by Wagabhatt some 2,300 years
87 ago in India³ and describes two similar yet distinct syndromes, from which the other – albeit
88 less often – is caused by *Spirillum minus* (due to lack of a type strain not listed in the
89 Approved List of Bacterial Names).^{2,4} *Spirillum minus* infection, also known as sudoku, has
90 been reported in Asia and is not further discussed here. The acute disease symptoms of the
91 bacterial zoonosis streptobacillary RBF or food-borne HF include fever, malaise, muscle pain,
92 arthritis and abscess formation, endocarditis, bacteremia, and maculopapular, petechial or

4

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

93 pustular rash as well as vomiting and pharyngitis. ⁴ Most likely under-reported worldwide,
94 streptobacillary RBF is predominantly transmitted through rat bites and scratches ⁴, whereas
95 HF is transmitted directly or indirectly by contact with rat urine. ^{5, 6} In untreated cases RBF
96 mortality ranges from 7 to 13%. ⁷⁻⁹ Approximately 50-100% of wild rats usually
97 asymptotically carry *S. moniliformis* in their oro- or nasopharynx and shed the organism
98 with saliva and urine, ^{2, 10} but abscess formation has also been described in rats and mice. ^{11, 12}
99 Other rodents as well as companion and exotic animal species and livestock are principally
100 reported to be susceptible to clinical infection besides rats and mice, but mice may strain-
101 dependently develop disease. ^{4, 11, 13-22}
102 Detection of streptobacillosis due to *S. moniliformis* is referred to as a ‘diagnostic dilemma’ ²³
103 because reasons for under-diagnosing in susceptible host species are missing notice of a
104 rodent bite or contact, non-specific clinical symptoms, ⁶ fastidious growth of the widely
105 unknown microorganism and a lack of reliable diagnostics, non-notifiable disease and broad
106 chemotherapeutic susceptibility. With respect to known diagnostic difficulties with this
107 microorganism this review summarizes diagnostic approaches to detect streptobacillary
108 infection in humans and animals.

109

110 **Properties of the agent**

111 **Host spectrum**

112 *S. moniliformis* has been isolated from various animal species. It is frequently found in wild
113 rats (*Rattus norvegicus*), ¹⁰ but also in rats housed as pets, ^{12, 24} and has also been found in
114 laboratory rats. ²⁵⁻²⁷ Isolates exist also from laboratory mice (*Mus musculus*) ^{11, 28-30} and from
115 turkeys (*Meleagris gallopavo*). ^{13, 16, 18, 22} Isolates from rats, mice, turkeys and humans were
116 shown to belong to the same species. ³¹ Reports on possible infections in other livestock
117 species date decades back into the last century. ^{17, 20} However, as these strains are physically

5

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

118 not available, reports are not fully in congruence with the genotypic and phenotypic properties
119 of *S. moniliformis*. Moreover, as recent studies have even found large quantities also in
120 genital tracts from cows and ewes,³² there is some doubt if streptobacilli in livestock are
121 identical with the RBF organism. Anecdotaly, streptobacilli have been described from exotic
122 host species like gerbils and squirrels that were occasionally named “*Streptothrix paraxeri*
123 *cepapi*” after Smith’s bush squirrel (*Paraxerus cepapi*),³³⁻³⁵ partially with involvement of
124 human infection resembling RBF,^{33, 36} but these isolates have also not been stored. Based on
125 metagenomics data from cotton rats³⁷ it may be possible that streptobacilli in other rodent
126 species might in fact represent separate species (Fig. 1). Further proof of *S. moniliformis* in
127 exotic species was recorded from a koala and macaques.^{19, 21, 38} Carnivores like dogs, cats,
128 weasels and ferrets were occasionally found to be colonized or even suffer from
129 *Streptobacillus* infection.^{14, 15, 39} It remains unclear whether such findings really represent *S.*
130 *moniliformis*, although identified after mouthing wild rats, or if *Streptobacillus* species other
131 than *S. moniliformis* may be involved that belong to the mouth microbiota and occasionally
132 cause also disease in dogs and cats. *S. moniliformis* is an important zoonotic agent and is
133 usually transmitted to humans by direct contact with rats (rat bite fever), but infection of
134 humans is also possible through contaminated food (HF).⁴⁰⁻⁴² Contact with carnivorous
135 animals is, however, only rarely believed to lead to human RBF.⁴³⁻⁴⁸

136 After the genus *Streptobacillus* was held monotypic for almost a century, a second species, *S.*
137 *hongkongensis*, has been isolated from two humans with peritonsillar abscess and septic
138 arthritis.⁴⁹ Recently, a third species was isolated from the lungs of a cat with pneumonia⁵⁰
139 which has been described as *S. felis*.⁵¹ Some other isolates formerly assigned to *S.*
140 *moniliformis* exist, from which *S. notomytis* from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*)
141 and from black rats (*Rattus rattus*) and *S. ratti* from an asymptotically colonized black rat
142 were recently described.^{52, 53} Contrarily to Nolan et al.,⁵⁴ various potentially novel
143 *Streptobacillus* species and phylotypes consistent with operational taxonomic units have been

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

144 identified in the last few years from Atlantic salmon⁵⁵ and microbiomes of digestive tracts in
145 dolphins and sea lions,⁵⁶⁻⁵⁸ upper respiratory tracts in cotton rats,³⁷ digestive tracts in dogs,
146^{39, 59, 60} intestinal tract of a ducks,⁶¹ genital tracts in livestock,³² and skin and gut
147 microbiomes in humans (Fig. 1).^{62, 63} This fuels the assumption that *Streptobacillus* species
148 are far more distributed in the environment aside from their natural hosts than previously
149 thought. Contrarily, former *Streptobacillus*-like organisms from fish⁵⁵ and guinea pigs⁶⁴⁻⁶⁷
150 are even more distantly related to classical *Streptobacillus* species and indeed represent novel
151 genera, that have been recently described.^{68, 69}

152

153 **Virulence factors**

154 Despite recent advances in decoding the complete genome of *S. moniliformis* and further
155 *Streptobacillus* species no designated virulence associated genes have been described.⁵⁴
156 Concerning pathogenicity one might refer to possible virulence properties in an α -hemolytic
157 strain.²⁷ Indeed, hemolytic strains of *S. moniliformis*, *S. hongkongensis*, and *S. felis* were
158 involved in clinical disease in a rat,⁷⁰ a dog,¹⁵ a cat,⁵⁰ and a human,⁵¹ but other clinical
159 isolates, especially those causing severe or even fatal disease turned out to be non-hemolytic
160 so that other virulence factors apparently play a more important role. These might include the
161 extraordinary high amount of DNase in all strains, which is released independently from
162 bacterial growth.⁷¹ Further reflections on virulence regard the lipopolysaccharide²⁷ and the
163 agglutination of erythrocytes. However, as depicted in the chapter on hemagglutination the
164 experiments unequivocally suggest the presence of adhesins, a mechanism involved in
165 bacterial pathogenicity which is a prerequisite for the ‘successful’ infection of a host. Indeed,
166 there appear to remain other factors besides adhesins as can be concluded from the fact that
167 hemagglutination could principally also be observed in non-host species for *S. moniliformis*.
168 These might include not yet identified genetic factors at the host side which can be concluded
169 from differences in susceptibility to infection like for instance the genetically diverse, highly

7

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

170 susceptible C57BL/6J mice compared to BALB/c mice.^{11, 30} C57BL/6J mice are known to
171 show an exacerbated release of IL-12 compared to BALB/c mice, if Toll-like receptor (TLR)
172 2 agonists on the surface of *Listeria monocytogenes* are stimulated.⁷² This could also explain
173 a more severe pro-inflammatory response in C57BL/6J mice by TLR-mediated recognition of
174 *S. moniliformis*.⁷³ However, although neutrophils seem to represent the predominating
175 leukocyte cell fraction in RBF patients, mouse macrophages are known to be killed earlier in
176 the presence of engulfed *S. moniliformis*.⁷⁴
177

178 **Diagnostics**

179 **Direct techniques for detection of infection**

180 **Phenotypic identification**

181 **Bacterial cultivation from clinical samples**

182 *Streptobacillus* infection is mostly diagnosed by isolation of the organism from blood,
183 synovia, pus or other fluids, nevertheless the organism is difficult to grow in culture and
184 requires specific media and incubation conditions. An anticoagulant in blood cultures, sodium
185 polyanethol sulfonate (SPS; trade name "Liquoid"), used to grow bacteria from blood samples
186 from patients suspected of bacteremia inhibits growth of the organism in concentrations as
187 low as 0.0125%.⁷⁵ Therefore, other additives are necessary for isolation of *S. moniliformis*.⁷⁶
188 Good growth of all species can be achieved on Columbia agar supplemented with 5% sheep
189 blood after 2-5 days of incubation at 37°C in the presence of 5-10% CO₂, but initial culture of
190 the organism from clinical specimens can be difficult due to overgrowth by faster growing
191 and less fastidious bacteria. We had the best culturing results using tryptone soy agar or broth
192 (containing 30g tryptone soy (Oxoid), 5g yeast extract (Merck, Darmstadt, Germany), 800 ml
193 Aqua dest., optionally 12 g agar and the addition of 200 ml decomplexed horse serum

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

194 (Oxoid) after autoclaving). Growth of streptobacilli can further be improved by a 5-20%
195 supplementation of common media with serum or ascitic fluid.⁷⁰ Some authors have used
196 media supplemented with colistin, sulfamethoxazole-trimethoprim and nalidixic acid for
197 primary isolation from colonized mucosal sites by suppressing Gram-negative contaminating
198 flora.^{10, 11, 24} However, work in our lab revealed that *S. hongkongensis* DSM 26322^T is the
199 only member of the genus that is trimethoprim/sulfamethoxazol-sensitive as well as nalidixic
200 acid-sensitive *Streptobacillus* strains occurred.^{31, 51} In liquid media (e.g. tryptone soy broth)
201 with addition of serum, streptobacillary growth can be detected after 2-7 days as typical
202 “puff-ball” or “bread crumb-like” appearance.^{2, 4}
203 Suboptimal growth at least for some strains of *S. moniliformis* and *S. hongkongensis* can still
204 be detected in an aerobic and anaerobic atmosphere.^{26, 49, 70} Isolates from guinea pigs were
205 historically associated with *S. moniliformis* and reported to grow under strictly anaerobic
206 conditions.⁶⁴ Investigations in our lab have now shown that these strains from guinea pigs are
207 indeed obligate anaerobes and now form a novel taxon, *Caviibacter abscessus*, within the
208 family *Leptotrichiaceae*.⁶⁹

209

210 **Growth characteristics**

211 Colonies of *Streptobacillus* are tiny, drop-like, shiny, slightly convex, 0.1-0.4 mm in diameter
212 after 48-72 h of incubation in a capnophilic atmosphere. Some of the colonies show a “fried-
213 egg” appearance indicating the presence of L-forms.² Whereas L-form variants arise
214 spontaneously on agar media, the formation of cell wall deficient bacteria is thought to be a
215 consequence of specific immunity *in vivo* and thus are responsible for clinical relapses and
216 resistance to antimicrobial agents that interfere with cell wall synthesis.⁷⁷ The L-forms,
217 which are sometimes regarded as non-pathogenic variants *in vivo*⁷⁸ and which can be induced
218 *in vitro* on sheep blood agar by addition of 2 IU/ml penicillin,⁷⁹ spontaneously revert into
219 bacillary forms after subculturing.

9

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

220 The vast majority of strains are non-hemolytic, but strains with slightly α -hemolytic colonies
221 are known to occur^{15, 27} and the type strains of *S. felis* 131000547^T, *S. rattii* OGS16^T and *S.*
222 *hongkongensis* DSM 26322^T all typically demonstrate α -hemolysis on sheep blood agar.^{31, 50,}
223 ^{51, 53}

224

225 **Morphologic features**

226 The microscopic features are consistent with Gram-negative, pleomorphic, fusiform to
227 filamentous, non-spore forming, non-encapsulated, non-acid-fast rods which are arranged in
228 chains and clumps. Sometimes, especially in aged cultures, irregular, lateral bulbar swellings
229 can be seen, that resemble a ‘string of beads’ or a necklace, which is the translation of the
230 Latin word *moniliformis*. The 0.1-0.7 x 1-5 μm sized bacteria tend to pleomorphism and
231 might form up to 150 μm unbranched filaments in stains from cultures compared to stains
232 from infection sites (Fig. 2).⁴

233 Electron microscopy was carried out with one strain of a ‘*S. moniliformis*-like organism’
234 isolated from a calve suffering from interstitial pneumonia.¹⁷ The “bread crumb-like”
235 floccules from liquid media appeared as “densely staining filaments and swollen bodies”
236 which could also be appreciated by light microscopy. This isolate was not subjected to
237 molecular analysis or sequencing and other key characteristics were missing, e.g. being
238 dependent on a capnophilic atmosphere or pathogenicity for mice.

239 Own transmission electron micrographs (JEM-1011; JEOL, Freising, Germany) of cells of *S.*
240 *moniliformis* DSM 12112^T after growth on sheep blood agar at 37°C for 7 days show oval to
241 elongated cells in a diameter range of 0.3-0.7 μm and lengths from 0.9 to 5.2 μm , without any
242 flagella, but with a recognizable cell envelope, and partly an arrangement in chains (Fig. 3 a).

243 The comparison of electron micrographs from the recently described species *S.*
244 *hongkongensis* DSM 26322^T, *S. felis* 131000547^T, *S. notomytis* AHL307-1^T, and *S. rattii*

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

245 OGS16^T grown under the same conditions and incubation times do not show discernible
246 differences (Fig. 3 b-e).

247

248 **Biochemical properties**

249 For a review of biochemical tests that need to contain the addition of serum to the respective
250 media see refs.^{2, 4, 31} In our opinion the best conventional biochemical results were obtained
251 with phenol red broth base (Difco, distributed by Becton Dickinson [Heidelberg, Germany])
252 supplemented with carbohydrates to be tested. The original recipe from Difco gives better
253 results than the later modification by Becton Dickinson. All tests should be read after
254 prolonged incubation at 37°C for up to 7 days. Some authors suggested to obtain biochemical
255 profiles with commercially available systems, e.g. API-E (bioMérieux, Nürtingen, Germany),
256¹⁰ but use of those commercial biochemical platforms remains controversial.⁷⁰ However, a set
257 of *S. moniliformis* field and reference strains in our laboratory was mostly in accordance with
258 known patterns.^{2, 4, 10, 11, 26, 27, 70, 80} In contrast to biochemical assays, enzymatic pattern testing
259 does not require proliferating bacteria. Most studies assessing enzymatic profiles of
260 streptobacilli were using the API-ZYM system (bioMérieux).^{24, 27, 80} Positive reactions were
261 recorded for alkaline phosphatase, butyrate esterase, caprylate esterase, myristate lipase,
262 leucine arylamidase, chymotrypsin, acid phosphatase, and glucuronidase activities.²⁴ We
263 have recently employed another commercially available biochemical system (Merlin
264 Micronaut, Bornheim, Germany) that was specifically adapted to the growth of
265 *Streptobacillus*.³¹ A choice of suitable biochemical tests is given in Table 1. In summary,
266 *Streptobacillus* species can be indicated by a combination of growth and micro-morphological
267 characteristics together with some important, congruently negative resulting key reactions like
268 cytochrome oxidase, catalase, urease, and nitrate reduction, Voges-Proskauer-reaction and
269 indole production. Further biochemistry might be variable between strains of the same species
270 and is not adequate to differentiate different *Streptobacillus* species.

11

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

271

272 **Chemotaxonomic pattern**

273 Fatty acid profiles obtained by gas-liquid chromatography, together with characteristic
274 growth, have been used for rapid identification of *S. moniliformis*.⁸⁰⁻⁸⁶ The major cellular
275 fatty acid peaks are tetradecanoic acid (14:0), palmitic acid (16:0), octadecanoic acid with
276 linoleic acid (18:2) and oleic acid (18:1), and stearic acid (18:0).^{84, 85} Fatty acid profiles
277 obtained with use of gas chromatography coupled with mass spectrometry showed major
278 peaks for C16:0, C18:2, C18:1, and C18:0 fatty acids, a profile characteristic of *S.*
279 *moniliformis*.⁸² In light of additional species of *Streptobacillus* this must be scrutinized,
280 because these species cannot be differentiated by their fatty acid patterns alone. A
281 comprehensive comparison of fatty acid profiles from all *Streptobacillus* species known to
282 date is presented in Table 2.⁵³

283 Polar lipids are poorly understood in *Streptobacillus* species. A lack of quinones and a
284 specific polyamine pattern different from those of the α -, β - and γ -subclasses of the
285 proteobacteria was proposed by Hofmann and Wullenweber et al.^{70, 71} The protein profiling
286 from whole cell preparations displayed a species specific pattern of 40-50 proteins ranging
287 from 18 to 100 kDa. Four major protein bands in the region 60-67 kDa were formed that
288 accounted for 20-30% of the total protein.⁸⁷ Earlier assumptions of protein-based strain
289 differences between human and murine isolates as well as between Haverhill and rat bite
290 fever strains⁸⁷ were not confirmed by other authors.^{80, 88} On the other hand, especially
291 differences of HF- versus RBF-strains are unlikely because rats represent the source of
292 infection in both cases and disparities could better be explained by different gene expression
293 following oral or parenteral infection⁴ or simply by too few HF-strains under study.
294 Additionally, the time between infection and strain isolation from the host following rat
295 exposure is usually too short to facilitate adaptation of strains and expression of a different
296 phenotype.

12

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

297

298 **Experimental infection**

299 Historically, the classical foot pad test was performed for confirmation of *S. moniliformis*
300 infection by injection into mice, which led to septic arthritis within few days.⁷⁰ This painful
301 procedure is now obsolete as better *in vitro* diagnostics are available. A number of studies
302 have, nevertheless, proven that *S. moniliformis* strains isolated from susceptible host species
303 were able to cause infection in rodents, thereby partially fulfilling Koch's postulates.^{11,22}

304

305 **Hemagglutination**

306 Screening for adhesive properties was performed for 14 *S. moniliformis* strains and for *S.*
307 *notomytis* AHL370-1^T by hemagglutination experiments using erythrocytes from eleven
308 different host donor species, i.e. red blood cells from humans, BALB/c and C57B1/6J mice,
309 rats, turkeys, guinea-pigs, hamsters, chicken, sheep, horses, pigs and cattle were included.^{31,}
310 ⁷¹ Adhesive properties were detected in all *S. moniliformis* strains tested. Erythrocytes of the
311 different vertebrate species were agglutinated with varying intensity. The strongest reactions
312 could be observed in erythrocytes from turkeys, humans, guinea-pigs and pigs, followed by
313 rats and chickens. C57BL/6J mice, known to represent a highly susceptible mouse strain
314 towards streptobacillosis,¹¹ were less strongly agglutinated compared to erythrocytes from
315 the more resistant BALB/c mice. By adding mannose, a known agonist of a common adhesin
316 receptor, no significant differences could be observed indicating mannose-resistant
317 agglutination in all cases. No differences were observed between agglutination of erythrocytes
318 from 'original' host species (from which respective strains were originally isolated) and other
319 host red blood cells, but susceptibility was generally highest in species of potential hosts
320 compared to non-host species. There were no differences in the hemagglutinating behavior
321 between RBF and HF strains of *S. moniliformis*.⁷¹

322

13

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

323 **Serum agglutination**

324 For direct identification of *S. moniliformis* agglutination reactions with specific serum have
325 been used in the past.⁸⁹ Direct immunofluorescence was also employed to achieve
326 identification by staining *S. moniliformis* bacteria with a polyclonal antiserum.⁷ None of
327 these tests is commercially available and specificity of such assays remains to be reviewed.

328

329 **Mass spectrometry**

330 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF
331 MS) was found to be a fast and reliable tool for species identification of *S. moniliformis*.⁵⁰ In
332 the meantime, this technique has proven to contain enough discriminatory information to
333 differentiate all currently known species of *Streptobacillus*.^{31, 53} Likewise, commercial
334 databases do not contain spectra of all members, but respective spectra can be obtained via
335 MALDI-UP, a user-to-user dedicated database platform.⁹⁰ A representative cluster analysis
336 of MALDI-TOF spectra is depicted in Figure 5. In a repeatedly culture-negative clinical case
337 of RBF, employment of PCR and electrospray ionization followed by mass spectrometry
338 (PCR/ESI-MS) proved to be a useful tool in detection of *S. moniliformis* from a synovial fluid
339 but not from the patient's serum. The authors highlight that this technique was culture-
340 independent and even successful in specimens obtained following initiation of antimicrobial
341 therapy.⁹¹

342

343 **Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)**

344 As a vibration-spectroscopic technique, FT-IR is using the mid-infrared region of the
345 electromagnetic spectrum to analyze the total composition of dried films of microorganism
346 cells. In comparison with the protein-fingerprints obtained by MALDI-TOF MS, FT-infrared-
347 spectra mirror information about the sum of biomolecules, like carbohydrates, lipids, proteins
348 and other cell components.⁹² This method had already been used as a fingerprint-based tool

14

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

349 for rapid and reliable classification of a large number of clinically relevant pathogens⁹³⁻⁹⁵
350 including recently described *Streptobacillus* species (Fig. 6).^{31, 51} However, at present, the
351 lack of enough strains from the novel species makes it difficult to validate and test the
352 performance of the species identifying methods.

353

354 **Antimicrobial properties**

355 Despite its good response to various antimicrobial treatments one should attempt
356 susceptibility testing for every isolate. Most studies employed disk diffusion testing where
357 diameters of zones with growth inhibition are recorded according to a norm (e.g. according to
358 the German standard DIN 58940).^{11, 85, 96} Some authors have used minimum inhibitory
359 concentration (MIC) testing with the agar incorporation test⁸⁰ or a breakpoint method,^{70, 71}
360 that gave mostly congruent results compared with the disk diffusion method.⁷⁰ With respect
361 to MIC testing with automatic systems the slow growth of *Streptobacillus* hinders a reliable
362 end point measurement and can only be read by visual interpretation during off-label use. One
363 has to take into account, that no official breakpoints specific for *Streptobacillus* have been
364 published to date. Therapeutics of choice are generally penicillin, streptomycin and
365 tetracycline.⁷⁰ Therapy in mice was successfully initiated with 1 g ampicillin/L drinking
366 water given for 2 weeks, followed by chlortetracycline for 1 week.¹¹ Expectably, MIC testing
367 results are too vague and – like biochemistry – not appropriate to differentiate species.

368

369 **Storage of bacteria**

370 To keep *Streptobacillus* in strain collections, freezing of fresh bacterial biomass and
371 supplementation of respective medium with 20% serum or in pure cattle serum with 6%
372 glucose at -70°C works well for re-cultivation even after several years. Deep freezing in brain
373 heart infusion (BHI) broth supplemented with 10-20% (w/v) of glycerol can also be advised
374 (own observations).⁸⁸ Lyophilization in fetal calf serum with 6% glucose is also a good

15

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

375 option for long-term storage in our laboratory. Resuscitation of sub-lethally damaged strains
376 was successfully achieved by centrifuging the previously frozen organism onto a human
377 endothelial cell culture where regular growth could be initiated. ⁹⁷

378

379 **Molecular identification**

380 **Molecular properties**

381 Determinations of guanine/cytosine (G/C) contents of 23 *S. moniliformis* as well as the novel
382 species revealed a nearly identical G/C content of 25.7-28.9 mol% in all investigated
383 *Streptobacillus* strains. ³¹

384 A high level of DNA-DNA-homology (DDH) between 14 strains of *S. moniliformis* could be
385 shown by Hofmann. ⁷¹ As concluded from an earlier definition all of the investigated *S.*
386 *moniliformis* had DDH levels above 70% thus indicating them as members of a single species.
387 ^{98, 99} According to this definition *S. notomytis* AHL370-1^T revealed 68% homology to the *S.*
388 *moniliformis* type strain, thereby at best justifying a separate subspecies. ⁹⁸ We therefore
389 believe that DDH of *Streptobacillus* species gives weak results. ³¹ Instead, average nucleotide
390 identity (ANI) was carried out according to the method described by Goris et al., ¹⁰⁰ with
391 which analogous results could be confirmed. They could demonstrate a close relationship
392 between DDH values and ANI in that the recommended cut-off point of 70% for species
393 discrimination corresponded to 95% ANI. The 95-96% species boundary is also supported by
394 Richter & Rosselló-Móra, ¹⁰¹ who have developed an alignment free interface to calculate
395 ANI also used in this study. In contrast to the highly homologous group of *S. moniliformis*
396 strains all novel members could be unequivocally discriminated.

397

398 **Species specific PCR for *S. moniliformis***

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

399 PCR protocols published to date for the detection of *S. moniliformis* in clinical samples and
400 for identification focus on respective partial gene sequences of the 16S rRNA gene.^{10, 12, 97,}
401¹⁰²⁻¹⁰⁴ The method by Boot et al.¹⁰² amplified a 296 bp fragment and showed considerable
402 sensitivity but also some flaws in specificity due to amplicon sequence similarities with
403 *Leptotrichia* sp., *Fusobacterium necrogenes* and *Sebaldella termitidis*.^{102, 103} Although these
404 non-specificities could be solved by macro restriction with the endonuclease *BfaI*, Kimura et
405 al.¹⁰ advanced this PCR with respect to specificity by improving oligonucleotide primers
406 according to Table 3. Thus, a 269 bp fragment was amplified and cross reactivity with the
407 above mentioned bacterial species was no longer detected. We have further modified the
408 method by Kimura et al.¹⁰ slightly by changing the annealing temperature to 53°C for 1 min.
409 We have calculated a diagnostic sensitivity of 2×10^2 bacteria with this PCR by detecting as
410 few as 10 pg of serially diluted purified DNA lysate of *S. moniliformis* DSM 12112^T endowed
411 in homogenized rat lung tissue. Details on our PCR have been previously described.⁵⁰ A
412 different PCR protocol employing primer pair SbmF/SbmR (Table 3) yielded a significantly
413 longer amplicon (1,222 bp),¹² thereby further improving specificity. Both PCR protocols
414 were suitable to detect all *S. moniliformis* strains from humans, rats, mice and turkeys and
415 also *S. felis*, *S. notomytis* and *S. ratti*, but *S. hongkongensis* was not detected in the PCR by
416 Rohde et al.^{12, 51-53}. Summarizing, all the mentioned PCR systems must presently be regarded
417 rather genus than species specific. In an era of easy access to sequencing techniques it is
418 always desirable to sequence amplicons. *S. moniliformis* and *Leptotrichia* sp. turned out to
419 non-specifically cross-react in a fluorescence *in situ* hybridization assay (FISH) for rapid
420 identification of *Fusobacterium* spp.¹⁰⁵ which in turn suggests its use also for the direct
421 detection of *S. moniliformis*.

422

423 **Marker gene sequencing**

424 **16S rRNA gene**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

425 A number of studies have used full length or partial 16S rRNA gene sequencing as a
426 diagnostic tool for species determination of *S. moniliformis* in clinical samples^{10, 39, 97, 106-109}
427 as well as for laboratory confirmation of suspicious isolates.²⁴ Because of the extraordinary
428 role of 16S rRNA gene sequencing in bacterial taxonomy this gene enables to compare
429 isolates and phylotypes obtained in microbiome studies. On the other hand, 16S rRNA gene
430 sequencing can be insufficient for definite species resolution.¹¹⁰ For unequivocal
431 identification of *Streptobacillus* species in particular, this gene should always – especially in
432 the highly homologous species *S. moniliformis*, *S. felis*, *S. notomytis* and *S. ratti* – be
433 confirmed by another gene locus or method such as those described above. Contrarily, in *S.*
434 *moniliformis* with a sufficient choice of strains, intraspecies heterogeneity was too low to
435 distinguish strains from different origins and hosts (Fig. 1).³¹

436

437 **Other housekeeping genes**

438 Species specific *gyrB* primers were designed to amplify a 514 bp fragment of the gene for
439 gyrase B in order to identify *S. moniliformis*.²⁴ Within the phylum Fusobacteria sequencing
440 of 16S rRNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer, *gyrB*, *groEL*, *recA*, *rpoB*, conserved
441 indels and genes for group-specific proteins, 43 kDa outer membrane protein and zinc
442 protease have been proposed for species identification or phylogenetic analysis¹¹¹⁻¹²⁰ and
443 more than 31 whole genome sequences have been released in GenBank. On the basis of next
444 generation sequencing a number of functional genes was tested for their phylogenetic
445 potential.³¹ To overcome the above mentioned uncertainties, we have used *groEL*, *recA* and
446 *gyrB* in addition to 16S rRNA, which unequivocally could discriminate *Streptobacillus* strains
447 to species level.

448

449 **Indirect techniques for detection of infection**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

450 Although the authors are unaware of any seroprevalence surveillance studies in humans to
451 assess the number of atypical or subclinical cases with the potentially lethal RBF
452 microorganism, various serologic approaches exist to detect antibodies against *S. moniliformis*
453 in serum. Among these are direct slide agglutination and complement fixation techniques with
454 human or naturally or experimentally infected animal sera.^{15, 40, 74, 121-128} Compared to modern
455 methods, these tests show a flaw in sensitivity and specificity. Nevertheless, agglutinating
456 antibodies were also used early in taxonomic studies to type *S. moniliformis* strains.¹²⁵ A
457 complement fixation test^{74, 129, 130} and an indirect immunofluorescence assay (IFA)^{11, 27, 75}
458 have been employed in intravenously infected mice. The latter was prepared by using air-
459 dried and heat fixed bacterial suspensions with an OD of 0.2 on IFA slides as antigen.
460 Alternatively, antigen for serology can be prepared by adding a bacterial suspension to cells
461 (e.g., L929, HeLa cells) grown on IFA slides (Fig. 4). This has the advantage that bacteria
462 adhere to the cells so that unspecific reactions can easily be identified.

463 A protocol for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was evaluated^{26, 88} and
464 propagated for testing mouse and rat colonies.⁸⁸ The authors used washed and merthiolate-
465 inactivated bacteria cultured in broth. This test was found superior in detecting significantly
466 more positive animals compared to culture.²⁶ Different immunoglobulin subclasses could be
467 detected with the usual shift from IgM to IgG with duration of infection by using different
468 secondary antibodies.²⁶ Unfortunately, this test failed to unequivocally detect true infection
469 due to lack in specificity and therefore immune blotting (IB) with whole cell antigens was
470 advised to confirm positive or doubtful reactions from ELISA.²⁵ Interestingly, antibodies in
471 sera of guinea pigs were also detected by ELISA, but guinea pigs were resistant to oral or
472 nasal infection with a rat strain of *S. moniliformis*¹³¹ and strains infecting guinea pigs
473 formerly assigned to *S. moniliformis* were found to represent a novel species,⁶⁹ thereby
474 suggesting the possibility of cross reactivity of this ELISA with other species.⁸⁸

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

475 Use of membrane proteins of *S. moniliformis* instead of whole bacterial cells reduces the
476 background reactions in ELISA and increases its specificity (Nicklas, unpublished data).
477 Proteins can easily be prepared as described by Livingston et al.¹³² for *Helicobacter*
478 *hepaticus*. These proteins can also be coupled to polystyrene microspheres (Luminex
479 Corporation distributed by Diamex, Heidelberg, Germany) and applied in bead-based
480 multiplex serology. We use this test as primary test for health surveillance of rodent colonies
481 and IFA with cells grown on IFA slides after infection with *S. moniliformis* as a confirmatory
482 test (Fig. 4).

483 Employing SDS-PAGE of *S. moniliformis* whole cell preparations, a species specific pattern
484 of 40-50 proteins was derived.⁸⁷ By IB, however, a number of approximately ten different
485 antibodies to respective immunogenic antigens of the 18-87 kDa range were demonstrated.²⁵
486 Rodent sera were considered positive if an antibody activity against at least two antigens of
487 the 32-55 kDa range could be detected. With this assumption IB yielded a diagnostic
488 sensitivity of 78% and a diagnostic specificity of 85%.²⁵ Interestingly, though *S. notomysis*
489 AHL370-1^T displayed a unique profile in electrophoretic protein patterns⁸⁷ no antigenic
490 differences could be observed for this species compared to *S. moniliformis*.⁸⁸

491 In contrast to viral serology, there are few publications which emphasize serology for
492 bacterial infections, especially to confirm the microbiological status of laboratory rodent
493 colonies. Serology has the advantage that no animals have to be sacrificed and that serum
494 samples can easily be shipped to external laboratories. On the other hand, the risk of false-
495 positive and false-negative reactions must be considered. None of these serological tests is
496 currently commercially available.

497 However, antibodies can routinely be found in infected rats after two to four weeks post
498 infection.²⁶ Conversely, mice strain-dependently suffered from natural infection and even
499 died before antibodies could be detected.¹¹ Especially susceptible were C57BL/6J mice
500 usually displaying cervical lymphadenitis in contrast to BALB/cJ, C3H/He, CB6F1, B6D2F1

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

501 and DBA/2J mice. Seroconversion following oral infection was only observed in C57BL/6J,
502 C57BL/10, AKR/N, B6D2F1 and DBA/2J and in all of the tested mouse strains after
503 intravenous injection, despite severe clinical symptoms were only observed in all C57BL/6J
504 and some DBA/2J mice.^{11, 70} After intranasal application, that represents the natural way of
505 infection, antibodies were not reliably detected in mice and rats,^{11, 133} but experiments were
506 terminated already 4-6 weeks after infection. We experimentally infected BALB/c
507 intranasally and detected antibodies by ELISA and IFA usually after eight weeks or later
508 (Nicklas, unpublished data). Other authors came to the conclusion that genetic factors as well
509 as individual resistance were responsible for different strain susceptibility in mice.^{11, 70}
510 Intravenous and subcutaneous infection of non-specified mice led to a weak neutrophilia and
511 maximum antibody titers not exceeding 1:640. Despite an effect that homologous antibodies
512 existing prior to infection prolonged the incubation period, the authors concluded that the
513 organism was in some fashion resistant to phagocytosis *in vivo*.⁷⁴
514 With respect to specificity (serological) cross reactions to most other rodent bacteria could be
515 excluded for ELISA and IFA, except for some members of the order Mycoplasmatales.^{70, 88}
516 An age-dependent effect was reported for the ELISA so that routine monitoring of rats should
517 be done up to an age of 16 weeks to prevent false positive reactivity.⁷⁰

518

519 **Discussion**

520 RBF is occurring worldwide and is believed to be under-recognized and under-diagnosed in
521 humans.⁴ The risk of infection with any organism following a rat bite is 1-10%,⁸ but the risk
522 of developing streptobacillary RBF and the infectious dose are unknown. According to
523 another survey 40,000 rat bites are noticed every year¹³⁴ and approximately 2% of rat bites
524 are followed by an infection.¹³⁵ Untreated RBF is associated with a case fatality rate of up to
525 13%.⁷⁰ The reasons for under-diagnosing streptobacillosis in man and animals include

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

526 organism as well as host specific factors like unsuitable diagnostic tools, the fastidious growth
527 and broad chemotherapeutic susceptibility of this microorganism, a non-notifiable disease as
528 well as missing notice of a rodent bite, non-specific clinical symptoms, especially in chronic
529 infections and a broad spectrum of differential diagnoses. Additionally, only very severe
530 clinical causes will be diagnostically worked up and few laboratories and physicians are
531 experienced with RBF or are even aware of the disease. In addition to the natural reservoir of
532 rats, mice and other rodents, streptobacillary infections have also been reported to occur in
533 livestock as well as zoo animals like calves, a pig, turkeys, non-human primates, and a koala.
534 ^{4, 13, 16-22} Recently, various publications suggest that *Streptobacillus* species might be far more
535 common and distributed in the environment or as commensal microbiota than previously
536 thought. ^{32, 37, 59-63} Currently, no information is available about the zoonotic potential of
537 streptobacilli from animal microbiome studies. The rare finding of sequelae of human
538 *Streptobacillus* infection with *S. hongkongensis* suggests, moreover, that these strains were
539 derived from a yet unidentified animal or environmental reservoir. ⁴⁹ Despite a certain amount
540 of annually published case reports, most of which have solely used 16S rRNA sequencing
541 alone for definite diagnosis, there has not been much progress in the diagnosis of acute
542 clinical cases of RBF in the last decades. Moreover, as pointed out earlier, 16S rRNA
543 sequencing alone may be insufficient for unequivocally determining the involved pathogen to
544 species level. In conclusion, the better knowledge of the global spread of *Streptobacillus* and
545 its variability demands both a higher awareness as well as better diagnostic approaches in
546 human as well as in animal diagnostics. Hence, the present review focussed on a large
547 spatiotemporal collection of *S. moniliformis* isolates from different host species and also
548 included all currently known novel members of the genus. We aimed to analyze whether well-
549 established diagnostic tools still fit the demands of an increasing diversity of *Streptobacillus*
550 members and host species and also report our experiences with modern as well as little-known
551 diagnostics.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

552 Primary isolation by culture methods remains difficult as colonies are small and shiny and
553 appear only after incubation for several days in an atmosphere enriched with CO₂. Isolation
554 from clinical samples on blood agar is unlikely in mixed cultures (e.g., oral cavity,
555 nasopharynx, intestinal tract) due to overgrowth by less fastidious organisms but is easily
556 possible from otherwise sterile environments (e.g., blood, joint fluid, abscesses). Colonies
557 may differ in size as L-form variants arise spontaneously. They are usually non-hemolytic but
558 strains with a weak α -hemolysis do occur. In liquid media containing serum or ascitis fluid
559 bacteria show typical “puff-ball” or “bread-crumbs-like” appearance as a sediment and a clear
560 supernatant. The yield can be improved by adding antimicrobial agents like for instance
561 colistin, sulfamethoxazole-trimethoprim and nalidixic acid to the culture medium, but even
562 then the isolation rate can be low. Although Kimura et al.¹⁰ could detect a prevalence of up to
563 92% by PCR they succeeded to culture only seven isolates from more than 1000 suspicious
564 colonies. We have earlier shown that physiological parameters are problematic for typing
565 *Streptobacillus*. In general, carbohydrate fermentation tests and other tests requiring
566 proliferating bacteria may be difficult to read as some strains grow poorly resulting in very
567 weak reactions. Biochemistry is furthermore largely dependent on the test system itself,
568 possible batch-to-batch variation and the person reading the tests and even with commercial
569 test systems it was not unequivocally possible to get identical results for the same species or
570 even the same strains in repeated experiments.³¹ Nevertheless, it is possible to use
571 information from biochemistry together with growth characteristics, when working with
572 suspicious isolates, but the characters are generally too weak to differentiate species. If
573 standardized test systems are employed, one should use tests determining end-point
574 measurements (e.g. API ZYM[®], VITEK2-compact[®] (NHI profile), Merlin Micronaut
575 *Streptobacillus* profile) that are thus independent from bacterial growth compared to tests
576 requiring viable bacteria. Important key reactions for all members of the genus *Streptobacillus*
577 are cytochrome oxidase, catalase, urease, nitrate reduction, Voges-Proskauer and indole

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

578 production (all negative). Chemotaxonomic analysis was slightly deviant from other studies
579 for *S. moniliformis* that have found homologous major fatty acid profiles of tetradecanoic acid
580 (14:0), palmitic acid (16:0), octadecanoic acid with linoleic acid (18:2) and oleic acid (18:1),
581 and stearic acid (18:0).^{82, 84, 85} In contrast, we have detected relatively uniform fatty acid
582 patterns of C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} ω9c, summed feature 5 C_{18:0} ANTE/C_{18:2}ω6,9c and C_{18:1} ω6c for
583 all *Streptobacillus* species.⁵³ Antimicrobial resistance profiles – albeit also not suitable for
584 species or genus discrimination – have revealed that *S. moniliformis* – since no β-lactamase
585 activity could be demonstrated so far⁵⁴ – is susceptible to all β-lactam antibiotics^{31, 80}.
586 Penicillin G was repeatedly reported being the most efficient antimicrobial substance *in vitro*
587 and *in vivo*, which further supports its use as the drug of choice in the treatment of RBF and
588 HF, followed by tetracycline.² The successful use of the combination of clindamycin with
589 rifampin (for enhanced tissue concentration) has been described in a case of abscess
590 formation.¹³⁶ Because of generally low MIC values the strains from our study confirmed a
591 generally good therapeutic basis, but, nevertheless, some isolates were *in vitro* resistant or
592 intermediate resistant to ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid and
593 streptomycin.³¹
594 Hence, these very similar, non-discriminatory physiological results suggest that other traits
595 should be propagated for the identification of *Streptobacillus* species. Based on spectral
596 differences our group could recently show that 23 *S. moniliformis* strains from at least five
597 different host species isolated over the past 90 years from almost all subcontinents as well as
598 the type strains of *S. hongkongensis* and *S. felis* were unequivocally differentiated by
599 MALDI-TOF MS and also by FT-IR, where the spectral information mirrors information
600 from a broad variety of main component biomolecules.^{31, 137} This was also true for the two
601 recently described novel species *S. notomytis* and *S. ratti*.^{52, 53} Together with the ease,
602 expense and availability of these methods in the microbiological laboratory nowadays, at least
603 MALDI-TOF MS should presently be regarded as the new gold standard in species

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

604 discrimination, but – on the other hand – usually requires previous cultivation of the
605 organism. Nevertheless, by the worldwide spread of the MALDI-TOF MS technology in
606 clinical microbiological laboratories, we expect a significantly higher number of reliable
607 diagnoses for *Streptobacillus* sp. This is particularly true, since relevant entries for a specific
608 database extension are available.⁹⁰ The published PCR assays are genus rather than species
609 specific. A diagnostic sensitivity of less than 2×10^2 cfu was calculated for homogenized rat
610 lung tissue. Diagnostic flaws concerning specificity towards other genera were successfully
611 corrected in the meantime. Based on the novel members, a real species specific real-time PCR
612 remains to be developed, thereby further improving also sensitivity. Phylogenetic results
613 largely confirmed the findings with spectroscopy. Molecular data derived from 16S rRNA
614 gene sequencing as well as multiple protein-coding phylogenies of *groEL*, *gyrB* and *recA*
615 resulted – independent of the treeing method – in almost identical phylogenetic trees for
616 respective nucleotide and amino acid alignments (data not shown). Intraspecies homology is
617 high as can be concluded from G/C contents and average nucleotide identities. With respect to
618 epidemiology and virulence factor analysis there is still a great demand for a broader insight
619 into multiple *Streptobacillus* genomes. Studies using selective enrichment steps like for
620 instance antibody enhanced isolations may facilitate the acquisition of novel strains from
621 different host species in order to fill these gaps.

622

623 **Conclusion**

624 Rat bite fever represents a significant public health threat that is under-diagnosed in humans
625 and animal species. Novel species of the genus made it necessary to critically review
626 diagnostic tools with respect to species specificity. We have provided an update in diagnostics
627 to improve detection and isolation of these neglected microorganisms. All members of the
628 recently extended genus can be reliably differentiated from a pure culture by MALDI-TOF

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

629 MS, FT-IR spectroscopy and also by sequence analysis of selected functional genes. 16S
630 rRNA sequencing alone is adequate to allocate the pathogen to the correct genus, but may be
631 insufficient for definite species diagnosis since also other *Streptobacillus* species except *S.*
632 *moniliformis* are adapted to the rat oropharynx. Contrarily, growth characteristics and
633 classical phenotypic methods and also standardized biochemistry are laborious and also only
634 suitable for genus determination, but do not possess enough discriminatory power to
635 sufficiently differentiate *Streptobacillus* on the species level. Based on additional full genome
636 sequences, the detection of further housekeeping genes will enable the development of new
637 tools like multilocus sequence typing (MLST) or multilocus sequence analysis (MLSA) for
638 both, molecular epidemiology as well as in-depth infra-species resolution and the
639 determination of clonality.¹¹⁰ Further genetic studies on *Streptobacillus* should also include
640 investigations on possible virulence determinants and differences in pathogenic mechanisms
641 between strains.

642

643 **Acknowledgement**

644 For excellent technical assistance we thank Ulrike Kling, Anna Mohr, Asmahan Omar,
645 Katharina Engel, Mersiha Curić, Barbara Depner and Jens Heinbächer, Annegret Männig for
646 proof-reading and Barbara Gamb for making even the most exotic manuscripts available.
647 Stefanie P. Glaeser and Norman Mauder are acknowledged for their contribution to one of the
648 figures. The Hessian State Laboratory (Hessisches Landeslabor) is supported by Hessian
649 Ministry for the Environment, Climate Change, Agriculture and Consumer Protection
650 (HMUKLV).

651

652 **Ethical Statements**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

653 The authors state that we complied with all of the legal requirements pertaining to the German
654 Cancer Research Center (Deutsches Krebsforschungszentrum) in which animal experiments
655 were done. The procedures were approved by the Ethics Committee of Animal
656 Experimentation in Germany (notification no. A10-02 [Regierungspräsidium Karlsruhe]).
657

658 **References**

- 659 1. Levaditi C, Nicolau S, Poincloux P. Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus*
660 *moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. C R Acad Sci 1925;
661 180:1188-90.
- 662 2. Elliott SP. Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. Clin Microbiol Rev 2007;
663 20:13-22.
- 664 3. Row R. Cutaneous spirochetosis produced by rat bite in Bombay. Bulletin de la
665 Societe' de Pathologie Exotique 1918; 11:188-95.
- 666 4. Gaastra W, Boot R, Ho HT, Lipman LJ. Rat bite fever. Vet Microbiol 2009; 133:211-
667 28.
- 668 5. Bleich A, Nicklas W. Zoonoses transmitted by mouse and rat maintained as laboratory
669 or pet animals [in German]. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2008; 121:241-55.
- 670 6. Regnath T, Kurb N, Wolf M, Ignatius R. Rat-bite fever – two cases of infection with
671 *Streptobacillus moniliformis* within two months [in German]. Dtsch Med Wochenschr 2015;
672 140:741-3.
- 673 7. Graves MH, Janda JM. Rat-bite fever (*Streptobacillus moniliformis*): a potential
674 emerging disease. Int J Infect Dis 2001; 5:151-5.
- 675 8. Hagelskjaer L, Sorensen I, Randers E. *Streptobacillus moniliformis* infection: 2 cases
676 and a literature review. Scand J Infect Dis 1998; 30:309-11.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 677 9. Washburn RG. *Spirillum minus* (rat bite fever). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R,
678 eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill
679 Livingstone, 2005:2810.
- 680 10. Kimura M, Tanikawa T, Suzuki M, Koizumi N, Kamiyama T, Imaoka K, et al.
681 Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction.
682 Microbiol Immunol 2008; 52:9-15.
- 683 11. Wullenweber M, Kaspareit-Rittinghausen J, Farouq M. *Streptobacillus moniliformis*
684 epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of different
685 strains of mice. Lab Anim Sci 1990; 40:608-12.
- 686 12. Rohde J, Rapsch C, Fehr M. Case report: Abscessation due to *Streptobacillus*
687 *moniliformis* in a rat [in German]. Prakt Tierarzt 2008; 89:466-73.
- 688 13. Boyer CIJ, Bruner DW, Brown JA. A *Streptobacillus*, the cause of tendon-sheath
689 infection in turkeys. Avian Dis 1958; 2:418-27.
- 690 14. Das AM. *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. Ind J Comp
691 Microbiol Immunol Infect Dis 1986; 7:115.
- 692 15. Ditchfield J, Lord LH, McKay KA. *Streptobacillus moniliformis* infection in a dog.
693 Can Vet J 1961; 2:457-9.
- 694 16. Glünder G, Hinz KH, Stiburek B. Joint disease in turkeys caused by *Streptobacillus*
695 *moniliformis* in Germany [in German]. Dtsch Tierärztl Wochenschr 1982; 89:367-70.
- 696 17. Gourlay RN, Flanagan BF, Wyld SG. *Streptobacillus actinoides* (*Bacillus actinoides*):
697 isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in gnotobiotic calves. Res
698 Vet Sci 1982; 32:27-34.
- 699 18. Mohamed YS, Moorhead PD, Bohl EH. Natural *Streptobacillus moniliformis* infection
700 of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. Avian Dis 1969; 13:379-85.
- 701 19. Russell EG, Straube EF. Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos cinereus*).
702 J Wildl Dis 1979; 15:391-4.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 703 20. Smallwood RP. Rat bite fever from the bite of a pig. *Brit Med J* 1929; 29:1159.
- 704 21. Valverde CR, Lowenstine LJ, Young CE, Tarara RP, Roberts JA. Spontaneous rat bite
705 fever in non-human primates: a review of two cases. *J Med Primatol* 2002; 31:345-9.
- 706 22. Yamamoto R, Clark GT. *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet Rec*
707 1966; 79:95-100.
- 708 23. Rumley RL, Patrone NA, White L. Rat-bite fever as a cause of septic arthritis: a
709 diagnostic dilemma. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:793-5.
- 710 24. Hayashimoto N, Yoshida H, Goto K, Takakura A. Isolation of *Streptobacillus*
711 *moniliformis* from a pet rat. *J Vet Med Sci* 2008; 70:493-5.
- 712 25. Boot R, Van de Berg L, Vlemminx MJ. Detection of antibodies to *Streptobacillus*
713 *moniliformis* in rats by an immunoblot procedure. *Lab Anim* 2006; 40:447-55.
- 714 26. Koopman JP, Van den Brink ME, Vennix PP, Kuypers W, Boot R, Bakker RH.
715 Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from the middle ear of rats. *Lab Anim* 1991; 25:35-
716 9.
- 717 27. Wullenweber M, Jonas C, Kunstyr I. *Streptobacillus moniliformis* isolated from otitis
718 media of conventionally kept laboratory rats. *J Exp Anim Sci* 1992; 35:49-57.
- 719 28. Glastonbury JR, Morton JG, Matthews LM. *Streptobacillus moniliformis* infection in
720 Swiss white mice. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8:202-9.
- 721 29. Kaspareit-Rittinghausen J, Wullenweber M, Deerberg F, Farouq M. [Pathological
722 changes in *Streptobacillus moniliformis* infection of C57bl/6J mice]. *Berl Münch Tierärztl*
723 *Wochenschr* 1990; 103:84-7.
- 724 30. Wullenweber M, Hedrich HJ, Reetz IC. Susceptibility to streptobacillosis of mice is
725 highly influenced by genetic factors. *AALAS Bulletin* 1991; 30:43.
- 726 31. Eisenberg T, Nicklas W, Mauder N, Rau J, Contzen M, Semmler T, et al. Phenotypic
727 and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*. *PLoS One* 2015;
728 10:e0134312.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 729 32. Swartz JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Geary T, Kott RW, et al.
730 Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with
731 low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Front Vet Sci* 2014; 1:19.
- 732 33. Wilkins EG, Millar JG, Cockcroft PM, Okubadejo OA. Rat-bite fever in a gerbil
733 breeder. *J Infect* 1988; 16:177-80.
- 734 34. McMillan B, Boulger LR. Squirrel-bite fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968;
735 62:567.
- 736 35. Schottmüller H. On the etiology and clinical cause of the 'bite disease' (rat-, cat-,
737 squirrel-bite disease) [in German]. *Dermatol Wochenschr Ergänzungsh* 1914; 58:77-103.
- 738 36. Gray HH. Squirrel bite fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1967; 61:857.
- 739 37. Chaves-Moreno D, Plumeier I, Kahl S, Krismer B, Peschel A, Oxley AP, et al. The
740 microbial community structure of the cotton rat nose. *Environ Microbiol Rep* 2015.
- 741 38. Iyer MAK. *Spirillum* fever caused by a monkey bite. *Indian Med Gaz* 1936; 71:462.
- 742 39. Wouters EG, Ho HT, Lipman LJ, Gaastra W. Dogs as vectors of *Streptobacillus*
743 *moniliformis* infection? *Vet Microbiol* 2008; 128:419-22.
- 744 40. Parker F, Hudson NP. The etiology of Haverhill fever (Erythema arthriticum
745 epidemicum). *Am J Pathol* 1926; 2:357-80 7.
- 746 41. Shanson DC, Gazzard BG, Midgley J, Dixey J, Gibson GL, Stevenson J, et al.
747 *Streptobacillus moniliformis* isolated from blood in four cases of Haverhill fever. *Lancet*
748 1983; 2:92-4.
- 749 42. Sprecher MH, Copeland JR. Haverhill fever due to *Streptobacillus moniliformis*
750 treated with streptomycin. *J Am Med Assoc* 1947; 134:1014-6.
- 751 43. Faro S, Walker C, Pierson RL. Amnionitis with intact amniotic membranes involving
752 *Streptobacillus moniliformis*. *Obstet Gynecol* 1980; 55:9S-11S.
- 753 44. Peel MM. Dog-associated bacterial infections in humans: isolates submitted to an
754 Australian reference laboratory, 1981-1992. *Pathol* 1993; 25:379-84.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 755 45. Maynard JH, McNaughton WM, Travis T. *Streptobacillus moniliformis* cellulitis and
756 bacteraemia following a dog bite. *Commun Dis Intell* 1986;10.
- 757 46. Nixon JH. "Rat bite fever" caused by a ferret. *Bri Med J* 1914; 2:629.
- 758 47. Dick GE, Tunnicliff R. *Streptothrix* isolated from blood of a patient bitten by weasel. *J*
759 *Infect Dis* 1918; 23:183-7.
- 760 48. Gilbert GL, Cassidy JF, Bennett NM. Rat-bite fever. *Med J Aust* 1971; 2:1131-4.
- 761 49. Woo PC, Wu AK, Tsang CC, Leung KW, Ngan AH, Curreem SO, et al.
762 *Streptobacillus hongkongensis* sp. nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis,
763 and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus*
764 *moniliformis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64:3034-9.
- 765 50. Eisenberg T, Nessler A, Nicklas W, Spamer V, Seeger H, Zschöck M. *Streptobacillus*
766 sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports* 2014; 2014:1-7.
- 767 51. Eisenberg T, Glaeser S, Nicklas W, Mauder N, Contzen M, Aledelbi K, et al.
768 *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol*
769 2015; 65:2172-8.
- 770 52. Eisenberg T, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, Nicklas W, Rau J, et al.
771 *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*)
772 THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg
773 et al. 2015 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* - in press 2016.
- 774 53. Eisenberg T, Imaoka K, Kimura M, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, et al.
775 *Streptobacillus rattii* sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*) *Int J Syst Evol*
776 *Microbiol* - in press 2016.
- 777 54. Nolan M, Gronow S, Lapidus A, Ivanova N, Copeland A, Lucas S, et al. Complete
778 genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901). *Stand Genomic Sci*
779 2009; 1:300-7.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 780 55. Palmer R, Drinan E, Murphy T. A previously unknown disease of farmed Atlantic
781 salmon: pathology and establishment of bacterial aetiology. *Dis Aquat Org* 1994; 19:7-14.
- 782 56. Bik EM, Chow E, Carlin KP, Jensen ED, Venn-Watson S, Relman DA. Indigenous
783 microbiota of the bottlenose dolphin. 2nd ASM Conference on beneficial microbes:
784 beneficial host-microbial interactions. San Diego, California, 2008.
- 785 57. Bik EM, Rohlik CM, Chow E, Carlin KP, Jensen ED, Venn-Watson S, et al.
786 Indigenous microbiota of marine mammals. 13th International Symposium on Microbial
787 Ecology. Seattle, Washington, 2010.
- 788 58. Bik EM, Costello EK, Switzer AD, Callahan BJ, Holmes SP, Wells RS, et al. Marine
789 mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nature*
790 *communications* 2016; 7:10516.
- 791 59. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, et al. The
792 canine oral microbiome. *PLoS One* 2012; 7:e36067.
- 793 60. Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS.
794 Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small
795 intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66:579-89.
- 796 61. Strong T, Dowd S, Gutierrez AF, Coffman J. Amplicon pyrosequencing of wild duck
797 eubacterial microbiome from a fecal sample reveals numerous species linked to human and
798 animal diseases [v1; ref status: awaiting peer review, <http://f1000r.es/1yy>]. *F1000Research*
799 2013; 2:1-7.
- 800 62. Hullar MA, Lancaster SM, Li F, Tseng E, Beer K, Atkinson C, et al. Enterolignan-
801 producing phenotypes are associated with increased gut microbial diversity and altered
802 composition in premenopausal women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers*
803 *Prev* 2015; 24:546-54.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 804 63. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts
805 in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic
806 dermatitis. *Genome Res* 2012; 22:850-9.
- 807 64. Aldred P, Hill AC, Young C. The isolation of *Streptobacillus moniliformis* from
808 cervical abscesses of guinea-pigs. *Lab Anim* 1974; 8:275-7.
- 809 65. Fleming MP. *Streptobacillus moniliformis* isolations from cervical abscesses of
810 guinea-pigs. *Vet Rec* 1976; 99:256.
- 811 66. Kirchner BK, Lake SG, Wightman SR. Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from
812 a guinea pig with granulomatous pneumonia. *Lab Anim Sci* 1992; 42:519-21.
- 813 67. Smith W. Cervical abscesses of guinea-pigs. *Journal of Pathology and Bacteriology*
814 1941; 37:29-37.
- 815 68. Eisenberg T, Kämpfer P, Ewers C, Semmler T, Glaeser SP, Collins E, et al.
816 *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae*
817 isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) *International Journal of Systematic and*
818 *Evolutionary Microbiology* 2016; in press.
- 819 69. Eisenberg T, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, Drescher B, Kämpfer P. *Caviibacter*
820 *abscessus* gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from guinea
821 pigs (*Cavia porcellus*) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*
822 2016; in press.
- 823 70. Wullenweber M. *Streptobacillus moniliformis* - a zoonotic pathogen. Taxonomic
824 considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. *Lab Animal* 1995;
825 29:1-15.
- 826 71. Hofmann N. Phenotypical and molecular taxonomic investigations on the systematic
827 status of *Streptobacillus moniliformis*, the agent of rat-bite-fever [in German]. Faculty of
828 Biology, Leibniz Universität Hannover. Thesis Dr. rer. nat., Faculty of Biology, Leibniz
829 Universität Hannover 1994:105.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 830 72. Liu T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y. Differences in expression of
831 toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect*
832 *Immun* 2002; 70:6638-45.
- 833 73. Irvine L, Wills T. *Streptobacillus moniliformis*: a mouse trying to become a rat. *Clin*
834 *Microbiol Newslett* 2006; 28:118-20.
- 835 74. Savage NL. Host-parasite relationships in experimental *Streptobacillus moniliformis*
836 arthritis in mice. *Infect Immun* 1972; 5:183-90.
- 837 75. Lambe DW, Jr., McPhedran AM, Mertz JA, Stewart P. *Streptobacillus moniliformis*
838 isolated from a case of Haverhill fever: biochemical characterization and inhibitory effect of
839 sodium polyanethol sulfonate. *Am J Clin Pathol* 1973; 60:854-60.
- 840 76. Shanson DC, Pratt J, Greene P. Comparison of media with and without 'Panmede' for
841 the isolation of *Streptobacillus moniliformis* from blood cultures and observations on the
842 inhibitory effect of sodium polyanethol sulphonate. *J Med Microbiol* 1985; 19:181-6.
- 843 77. Domingue GJ, Sr., Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin*
844 *Microbiol Rev* 1997; 10:320-44.
- 845 78. Freundt EA. Experimental investigations into the pathogenicity of the L-phase variant
846 of *Streptobacillus moniliformis*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1956; 38:246-58.
- 847 79. Freundt EA. *Streptobacillus moniliformis* infection in mice. *Acta Pathol Microbiol*
848 *Scand* 1956; 38:231-45.
- 849 80. Edwards R, Finch RG. Characterisation and antibiotic susceptibilities of
850 *Streptobacillus moniliformis*. *J Med Microbiol* 1986; 21:39-42.
- 851 81. Anglada A, Comas L, Euras JM, Sanmarti R, Vilaro J, Brugues J. [Arthritis caused by
852 *Streptobacillus moniliformis*: a case of fever induced by a rat bite]. *Med Clin (Barc)* 1990;
853 94:535-7.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 854 82. Pins MR, Holden JM, Yang JM, Madoff S, Ferraro MJ. Isolation of presumptive
855 *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital tract. Clin
856 Infect Dis 1996; 22:471-6.
- 857 83. Razin S, Boschwitz C. The membrane of the *Streptobacillus moniliformis* L-phase. J
858 Gen Microbiol 1968; 54:21-32.
- 859 84. Rowbotham TJ. Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. Lancet 1983;
860 2:567.
- 861 85. Rygg M, Bruun CF. Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a
862 child. Scand J Infect Dis 1992; 24:535-40.
- 863 86. Torres L, Lopez AI, Escobar S, Marne C, Marco ML, Perez M, et al. Bacteremia by
864 *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis
865 2003; 22:258-60.
- 866 87. Costas M, Owen RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of
867 *Streptobacillus moniliformis* strains from human, murine and avian infections. J Med
868 Microbiol 1987; 23:303-11.
- 869 88. Boot R, Bakker RH, Thuis H, Veenema JL, De Hoog H. An enzyme-linked
870 immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus*
871 *moniliformis* antibodies. Lab Anim 1993; 27:350-7.
- 872 89. Burke WA, Kwong O, Halpern R. Ratbite fever due to *Streptobacillus moniliformis*: a
873 report of two cases. Calif Med 1959; 91:356-8.
- 874 90. Rau J, Eisenberg T, Wind C, Lasch P, Sting R. MALDI-TOF MS user platform
875 (MALDI-UP) @ <http://maldi-up.ua-bw.de/> and <http://maldi-tof-ms-user-platform.ua-bw.de/> –
876 An information-forum for exchange of user-made database extensions 2015.
- 877 91. Mackey JR, Melendez EL, Farrell JJ, Lowery KS, Rounds MA, Sampath R, et al.
878 Direct detection of indirect transmission of *Streptobacillus moniliformis* rat bite fever
879 infection. J Clin Microbiol 2014; 52:2259-61.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 880 92. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification
881 of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 1991; 137:69-79.
- 882 93. Kuhm AE, Suter D, Felleisen R, Rau J. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the
883 species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ*
884 *Microbiol* 2009; 75:5809-13.
- 885 94. Preisner O, Lopes JA, Guiomar R, Machado J, Menezes JC. Fourier transform infrared
886 (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination.
887 *Anal Bioanal Chem* 2007; 387:1739-48.
- 888 95. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy:
889 perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97:7111-20.
- 890 96. Roughgarden JW. Antimicrobial therapy of ratbite fever. A review. *Archives of*
891 *Internal Medicine* 1965:39-54.
- 892 97. Loridant S, Jaffar-Bandjee MC, La Scola B. Shell vial cell culture as a tool for
893 *Streptobacillus moniliformis* "resuscitation". *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84:306-7.
- 894 98. Johnson JL. Bacterial Classification III. Nucleic acids in bacterial classification. In:
895 Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, London: The
896 Williams & Wilkins Co., 1984:8-11.
- 897 99. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al.
898 Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J*
899 *Syst Bacteriol* 1987; 37:463-4.
- 900 100. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.
901 DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence
902 similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57:81-91.
- 903 101. Richter M, Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic
904 species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:19126-31.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 905 102. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. PCR for the detection of *Streptobacillus*
906 *moniliformis*. Lab Anim 2002; 36:200-8.
- 907 103. Boot R, Van de Berg L, Reubsat FA, Vlemminx MJ. Positive *Streptobacillus*
908 *moniliformis* PCR in guinea pigs likely due to *Leptotrichia* spp. Vet Microbiol 2008; 128:395-
909 9.
- 910 104. Dubois D, Robin F, Bouvier D, Delmas J, Bonnet R, Lesens O, et al. *Streptobacillus*
911 *moniliformis* as the causative agent in spondylodiscitis and psoas abscess after rooster
912 scratches. J Clin Microbiol 2008; 46:2820-1.
- 913 105. Sigge A, Essig A, Wirths B, Fickweiler K, Kaestner N, Wellinghausen N, et al. Rapid
914 identification of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* by fluorescence
915 in situ hybridization. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 58:255-9.
- 916 106. Berger C, Altwegg M, Meyer A, Nadal D. Broad range polymerase chain reaction for
917 diagnosis of rat-bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. Pediatr Infect Dis J 2001;
918 20:1181-2.
- 919 107. Glasman PJ, Thuraisingam A. Rat bite fever: a misnomer? BMJ Case Rep 2009; 2009.
- 920 108. Nakagomi D, Deguchi N, Yagasaki A, Harada K, Shibagaki N, Kimura M, et al. Rat-
921 bite fever identified by polymerase chain reaction detection of *Streptobacillus moniliformis*
922 DNA. J Dermatol 2008; 35:667-70.
- 923 109. Wallet F, Savage C, Loiez C, Renaux E, Pishedda P, Courcol RJ. Molecular
924 diagnosis of arthritis due to *Streptobacillus moniliformis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;
925 47:623-4.
- 926 110. Glaeser SP, Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
927 taxonomy. Syst Appl Microbiol 2015; 38:237-45.
- 928 111. Woo PC, Wong SS, Teng JL, Leung KW, Ngan AH, Zhao DQ, et al. *Leptotrichia*
929 *hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural
930 reservoir. J Zhejiang Univ Sci B 2010; 11:391-401.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 931 112. Conrads G, Claros MC, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam V, Goldstein EJ. 16S-23S
932 rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships
933 among species of the genus *Fusobacterium*. Int J Syst Evol Microbiol 2002; 52:493-9.
- 934 113. Sun D, Zhang H, Lv S, Wang H, Guo D. Identification of a 43-kDa outer membrane
935 protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of
936 other *Fusobacterium* species. Res Vet Sci 2013; 95:27-33.
- 937 114. Kim HS, Lee DS, Chang YH, Kim MJ, Koh S, Kim J, et al. Application of *rpoB* and
938 zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum*
939 subspecies. J Clin Microbiol 2010; 48:545-53.
- 940 115. Shah HN, Olsen I, Bernard K, Finegold SM, Gharbia S, Gupta RS. Approaches to the
941 study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status
942 and perspectives. Anaerobe 2009; 15:179-94.
- 943 116. Strauss J, White A, Ambrose C, McDonald J, Allen-Vercoe E. Phenotypic and
944 genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum*
945 isolates from the human gut. Anaerobe 2008; 14:301-9.
- 946 117. Jin J, Haga T, Shinjo T, Goto Y. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium*
947 *necrophorum*, *Fusobacterium varium* and *Fusobacterium nucleatum* based on *gyrB* gene
948 sequences. J Vet Med Sci 2004; 66:1243-5.
- 949 118. Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium*
950 *sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and
951 Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. Int J Syst
952 Bacteriol 1999; 49 Pt 4:1375-9.
- 953 119. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR, Collins MD. Intrageneric relationships
954 of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of
955 small-subunit rRNA. Int J Syst Bacteriol 1991; 41:347-54.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 956 120. Gupta RS, Sethi M. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria
957 and its distinct subclades. *Anaerobe* 2014; 28:182-98.
- 958 121. Anonym. From the Centers for Disease Control and Prevention. Rat-bite fever--New
959 Mexico, 1996. *JAMA* 1998; 279:740-1.
- 960 122. Brown TMP, Nunemaker JC. Rat-bite fever. A review of the American cases with
961 reevaluation of etiology; report of cases. *Bulletin Johns Hopkins Hospital* 1942:201-36.
- 962 123. Raffin BJ, Freemark M. Streptobacillary rat-bite fever: a pediatric problem. *Pediatrics*
963 1979; 64:214-7.
- 964 124. Savage NL, Joiner GN, Florey DW. Clinical microbiological, and histological
965 manifestations of *Streptobacillus moniliformis*-induced arthritis in mice. *Infect Immun* 1981;
966 34:605-9.
- 967 125. van Rooyen CE. The biology, pathogenesis and classification of *Streptobacillus*
968 *moniliformis*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1936:455-72.
- 969 126. Heilman FR. A study of *Asterococcus muris* (*Streptobacillus moniliformis*). I.
970 Morphologic aspects and nomenclature. *Journal of Infectious Diseases* 1941:32-44.
- 971 127. Heilman FR. A study of *Asterococcus muris* (*Streptobacillus moniliformis*). II.
972 Cultivations and biochemical activities. *Journal of Infectious Diseases* 1951 45-51.
- 973 128. Nelson JB. The reaction of antisera for *B. actinoides*. *Journal of Bacteriology*
974 1933:321-7.
- 975 129. Bell DP, Elmes PC. Effects of certain organisms associated with chronic respiratory
976 disease on SPF and conventional rats. *J Med Microbiol* 1969; 2:511-9.
- 977 130. Gay FW, Maguire ME, Baskerville A. Etiology of chronic pneumonia in rats and a
978 study of the experimental disease in mice. *Infect Immun* 1972; 6:83-91.
- 979 131. Boot R, Van de Berg L, Koedam MA, Veenema JL, Vlemminx MJ. Resistance to
980 infection of guinea pigs with a rat *Streptobacillus moniliformis*. *Scand J Lab Anim Sci* 2007;
981 34:1-5.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 982 132. Livingston RS, Riley LK, Steffen EK, Besch-Williford CL, Hook RR, Jr., Franklin
983 CL. Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme-linked
984 immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1997; 35:1236-8.
- 985 133. Boot R, van Herck H, van der Logt J. Mutual viral and bacterial infections after
986 housing rats of various breeders within an experimental unit. Lab Anim 1996; 30:42-5.
- 987 134. Anonym. Urban pest management. Washinton: Committee on Urban Pest
988 Management, 1980.
- 989 135. Ordog GJ, Balasubramanium S, Wasserberger J. Rat bites: fifty cases. Ann Emerg
990 Med 1985; 14:126-30.
- 991 136. Legout L, Senneville E, Mulleman D, Solau-Gervais E, Flipo RM, Mouton Y. Rat bite
992 fever mimicking rheumatoid arthritis. Scand J Infect Dis 2005; 37:532-3.
- 993 137. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: Meyers RA, ed. Encyclopedia
994 of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000:102–31.
- 995 138. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF. Complete nucleotide sequence of a
996 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 75:4801-5.
- 997 139. Chen PL, Lee NY, Yan JJ, Yang YJ, Chen HM, Chang CM, et al. Prosthetic valve
998 endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis*: a case of rat bite fever. J Clin Microbiol
999 2007; 45:3125-6.
- 1000
- 1001
- 1002

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

1003 **Figure legends**

1004 **Fig. 1.** Maximum parsimony (MP) tree showing the phylogenetic relationship of cultured
1005 *Leptotrichiaceae* species and those only represented by environmental 16S rRNA gene
1006 sequences. The tree was calculated in ARB using DNAPARS and based on 16S rRNA gene
1007 sequences spanning at least gene termini 97 to 1356. ¹³⁸ Shorter sequences were added after
1008 tree construction without changing the overall tree topologies. Large circles represent nodes
1009 that were at least also present with high bootstrap support in the Maximum likelihood (ML)
1010 tree. Small circles mark nodes that were also present in the MP and neighbor joining tree, but
1011 in the ML tree only supported by bootstrap values <70%. GenBank/EMBL/DBJ accession
1012 numbers of the sequences are given in parentheses. Numbers at branch nodes refer to
1013 bootstrap values >70% (100 replicates). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC
1014 25586^T was used as outgroup. Bar: 0.1 nucleotide substitutions per nucleotide position. ^T
1015 marks type strain sequences.

1016

1017 **Fig. 2.** Gram-negative, pleomorphic cells of a 6-day-old culture of *Streptobacillus*
1018 *moniliformis* DSM 12112^T are arranged in chains and clumps and display irregular, lateral
1019 bulbar swellings, that resemble a 'string of beads' or a necklace – the translation of the Latin
1020 word *moniliformis*. The 0.1-0.7 x 1-5 µm sized bacteria tend to pleomorphism and might form
1021 up to 150 µm unbranched filaments. Oil immersion, ×1000 magnification. Bar, 5 µm.

1022

1023 **Fig. 3.** Transmission electron micrographs (JEM-1011; JEOL, Freising, Germany) of cells of
1024 a: *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T, b: *Streptobacillus felis* 131000547^T, c:
1025 *Streptobacillus ratti* OGS16^T, d: *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T and e: *Streptobacillus*
1026 *hongkongensis* DSM 26322^T. All strains were grown on sheep blood agar at 37°C for 7 days.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

1027 Images were taken with negative contrast (PTA method) at $\times 3000$ to $\times 10,000$ magnifications.

1028 Bars, 500 nm, 1000 and 2000 nm, respectively.

1029

1030 **Fig. 4.** Positive immunofluorescence reaction with *Streptobacillus moniliformis* ATCC

1031 14647. Suspended L929 cells are infected, pipetted to glass slides and incubated for 4 hours

1032 until complete adherence.

1033

1034 **Fig. 5.** Dendrogram including all main spectra peak lists (MSP) of the family

1035 *Leptotrichiaceae* available in the Bruker Taxonomy Database; spectra of *Streptobacillus ratti*

1036 OGS16^T, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T, *Streptobacillus hongkongensis* DSM

1037 26322^T, *Streptobacillus felis* 131000547^T, *Streptobacillus moniliformis* and *Sebaldella*

1038 *termitidis* NCTC 11300^T reference strains were recorded using the direct transfer protocol.

1039 The dendrogram was generated using the BioTyper MSP Dendrogram Creation Standard

1040 Method (v1.4) of the MALDI BioTyper OC Software (v3.1, build 66). The database used (DB

1041 5627, BrukerDaltonics) comprised solely 24 spectra from *Streptobacillus moniliformis* DSM

1042 12112^T; ^T type strain, ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA, DSM:

1043 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany, CIP: Collection of

1044 Institute Pasteur, Paris, France, NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK.

1045

1046 **Fig. 6.** Linear discriminant analysis (LDA) analysis of 69 infrared spectra of 10

1047 *Streptobacillus* isolates obtained by Fourier-transform infrared-spectroscopy (FT-IR) using

1048 OPUS Software (vers. 4.2, BrukerOptics, Ettlingen). The wave numbers 550-1800 & 2800-

1049 3200 cm^{-1} of second derivative spectra were selected and vector normalized. After a principal

1050 component analysis, the first 30 components were used for the LDA. In this LDA every

1051 isolate was defined as one group. Spectra of *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T are

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 1052 represented by circles, *Streptobacillus moniliformis* by dots, *Streptobacillus hongkongensis*
1053 DSM 26322^T by triangles and *Streptobacillus felis* 131000547^T by diamonds.
1054

1055 **Tables**

- 1056 **Table 1.** Physiological characteristics of *Streptobacillus* species known to date obtained by VITEK2-compact with the NHI card[†], API-Zym[‡] (both bioMérieux) and classical reactions[§] (modified after ⁵³); Taxa: 1, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T; 2, results from six *Streptobacillus moniliformis* reference strains (ATCC 27747, ATCC 49567, ATCC 49940, NCTC 11194, CIP 55-48 and CIP 81-99); 3, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 4, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 5, *Streptobacillus notomptis* AHL 370-1^T; 6, *Streptobacillus ratti* OGS16^T; +, positive; -, negative; +/- variable

Compound	1	2	3	4	5	6
Hemolysis on SBA [§]	-	+/-	+	+	-	+
Phosphatase (unspecified) [†]	-	-	+	-	-	-
Phenylalanine arylamidase [†]	+	+	-	-	+	+
Ala-Phe-Pro arylamidase [†]	+	+	-	-	+	+
Alkaline phosphatase [‡]	w	+/-	+	+	-	-
Esterase (C4) [‡]	w	+/-	w	+	+	-
Esterase lipase (C8) [‡]	+	w/+	w	+	+	+
Leucine arylamidase [‡]	-	+/-	-	-	w	-

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

1061	α -Chymotrypsin [†]	+	w/+	-	-	+	+
	Acid phosphatase [‡]	w	-/w	+	+	-	-
	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase [‡]	-	-	w	-	-	-
1062	α -Glucosidase [‡]	-	-	-	-	-	-

[#] score values 0-5 indicate strength of enzymatic intensities (0-2: negative [-], 3: weak [w], 4-5: positive [+])

- 1063 **Table 2.** Cellular fatty acid pattern of *Streptobacillus* species known to date (modified after ⁵³); Taxa: 1, *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112^T;
- 1064 2, *Streptobacillus hongkongensis* DSM 26322^T; 3, *Streptobacillus felis* 131000547^T; 4, *Streptobacillus notomytis* AHL 370-1^T; 5, *Streptobacillus*
- 1065 *rattii* OGS16^T. Biomass for fatty acid analysis was harvested after 3 days of growth in capnophilic environment with 10% CO₂ on Columbia sheep
- 1066 blood agar at 36°C.

Fatty acid	1	2	3	4	5
C _{14:0}	1.5	-	1.5	1.6	1.5
C _{15:0} <i>iso</i>	3.9	3.0	2.1	-	-
C _{16:0}	27.8	26.5	28.2	29.4	28.7
C _{17:0}	1.5	-	1.5	-	1.5
summed feature 5 C _{18:0} ANTE/C _{18:2} ω6,9c	13.3	5.6	12.1	13.0	8.5
C _{18:1} ω6c	2.2	-	2.0	-	5.9
C _{18:1} ω9c	25.1	30.2	24.1	26.6	23.6
C _{18:0}	23.5	34.7	21.6	29.4	26.3
C _{20:4} ω6,9,12,15c	1.2	-	1.1	-	-

- 1067 For unsaturated fatty acids, the position of the double bond is located by counting from the methyl (ω) end of the carbon chain. *cis* isomers are
- 1068 indicated by the suffix *c*.

1069 **Table 3.** Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions of the target genes used for the detection of *Streptobacillus* species

Target gene	Oligo-nucleotide primer	Sequence	PCR program [†]	Expected size of PCR product (bp)	Reference
16S rRNA	LPW8385	5'-GAACGGCTGACAGAAATGCTTA-3'	1	1425	III
	LPW8387	5'-CCAATCACTATCCACACCCTTA-3'	1		
chaperonin (<i>groEL</i>)	LPW8389	5'-GTTGTGGGAAGGNATGCARTTYGA-3'	1	555	III
	LPW8441	5'-CAGCTCCAACCTTTTATTACAGCT-3'	1		
gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	LPW10271	5'-GGAAMWGYRTAAGAGAAAGG-3'	1	796	III
	LPW8399	5'-TTCAATTTCTCCTAGNCCYTTRTA-3'	1		
recombinase subunit A (<i>recA</i>)	LPW8402	5'-GGTGCCGTTATGAAAYTNGNGA-3'	1	813	III
	LPW10124	5'-GAACCA GGCTCCAGCTTT-3'	1		
DNA-directed RNA polymerase	LPW8697	5'-AAATGGCACTTGAGCTGT-3'	1	768	III
	LPW8698	5'-CAATTCCAACAGTAATTCCA-3'	1		

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

subunit B (<i>rpoB</i>)					
16S rRNA	LPW57	5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	2	*	49
	LPW205	5'-CTTGTTACGACTTCACCC-3'	2		
16S rRNA	LPW26378	5'-AGGACAATGRAAAKAGAAG-3'	2	*	49
	LPW26129	5'-TATCTCAGTCCCCCTTGTG-3'	2		
16S rRNA	LPW26128	5'-AAGTTGGGGACTCTAATG-3'	2	*	49
	LPW26379	5'-CTATTCAATTCYCATTTGCC-3'	2		
recombinase	LPW18647	5'-GGWKCYRTHATGAARYTYGGWGA-3'	2	*	49
subunit A (<i>recA</i>)					
	LPW18648	5'-ARCTRAACCA YGMWCCRCT-3'	2		
16S rRNA	S5	5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3'	3	269	10
	AS2	5'-GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3'	3		
16S rRNA	SbmF	5'-GAGAGAGCTTTGCATCCT-3'	4	1222	12
	SbmR	5'-GTAACCTTCAGGTGCAACT-3'	4		
gyrase subunit B	MZK-F	5'-AAGATAGGGTAATGCTTACAGAAGGAG-3'	5	1316	24

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

(<i>gyrB</i>)	MZK-R	5'-AATCTACCTTTGTTTGCAGATCCAC-3'	5
16S rRNA		5'-AGAGTTTGTATGGCTCAG-3'	6
		5'-GGAACGTAATTCACCGTAGCA-3'	6

139

1400

1070 †: PCR program:

1071 1: x40 (94°C, 60 secs, 55°C, 60 secs, 72°C, 120 secs), x1 (72°C, 600 secs);

1072 2: *

1073 3: x1 (95°C, 180 secs), x35 (95°C, 20 secs, 53°C, 60 secs, 72°C, 60 secs), x1 (72°C, 420 secs) (annealing of this PCR was modified to 53 °C (60

1074 secs));

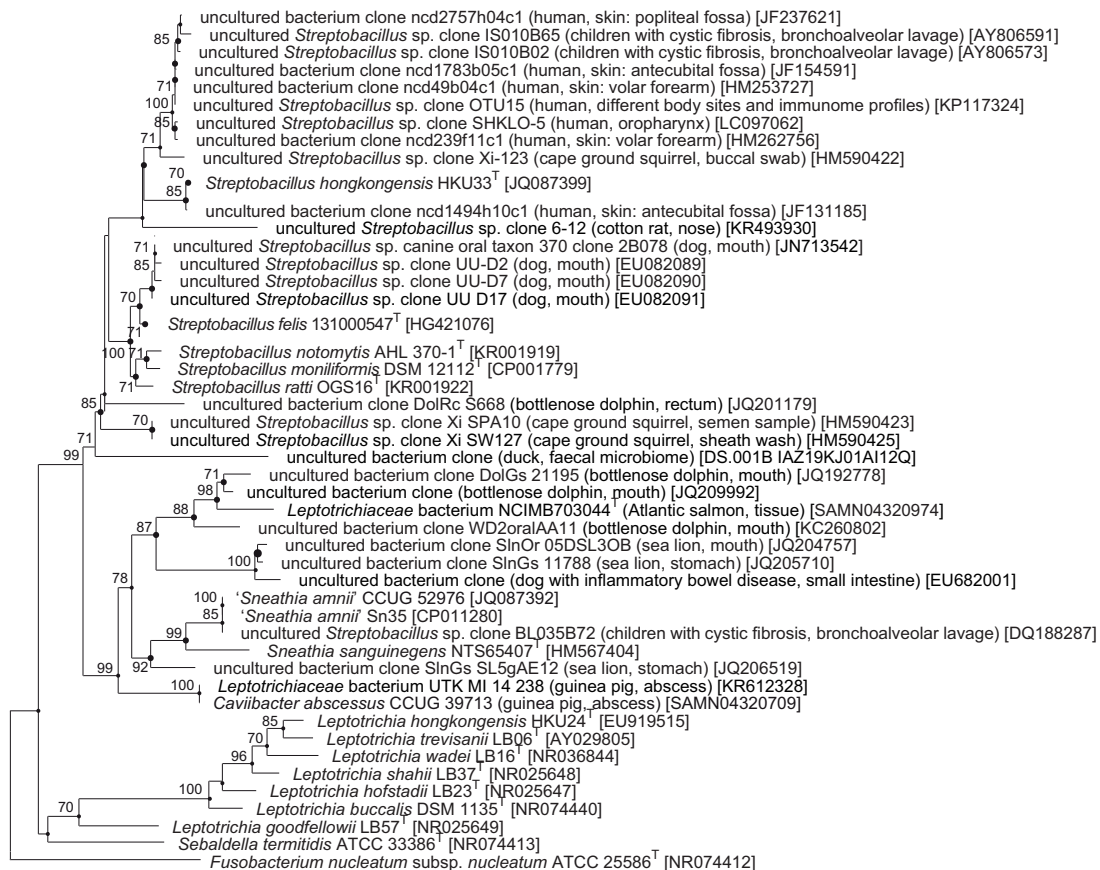
1075 4: x1 (94°C, 240 secs), x35 (94°C, 60 secs, 50°C, 60 secs, 72°C, 60 secs), x1 (72°C, 420 secs);

1076 5: *

1077 6: *

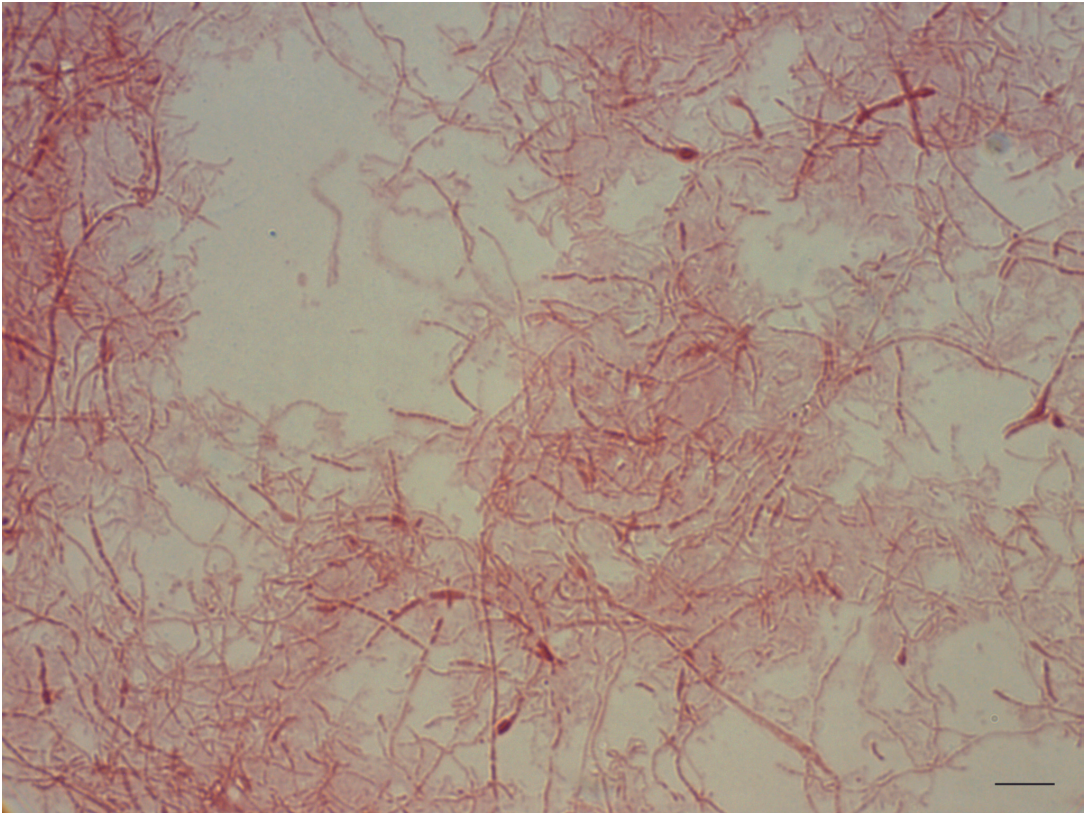
1078 *: not provided in publication

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

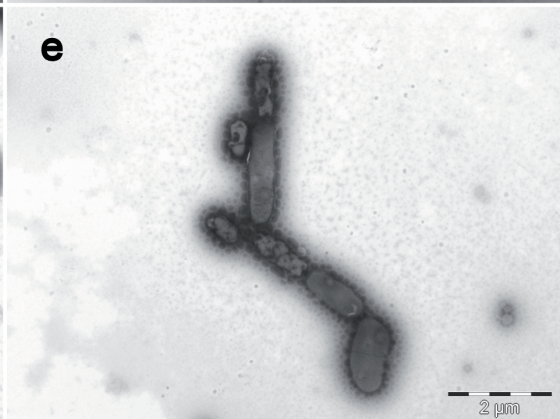
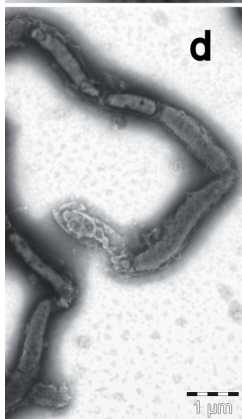
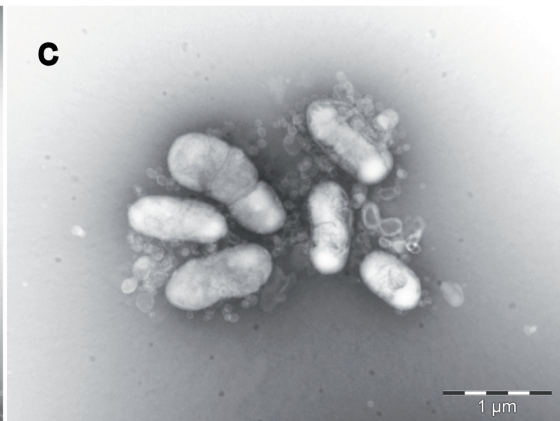
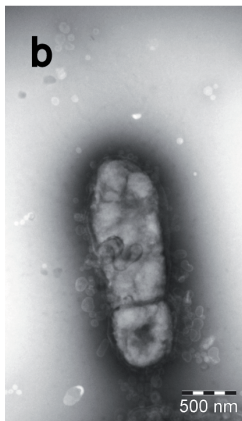
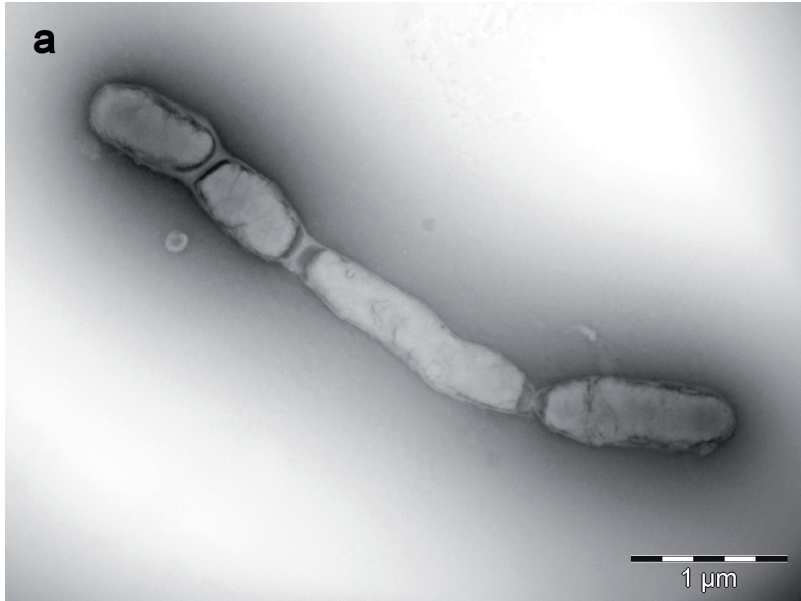


0.10

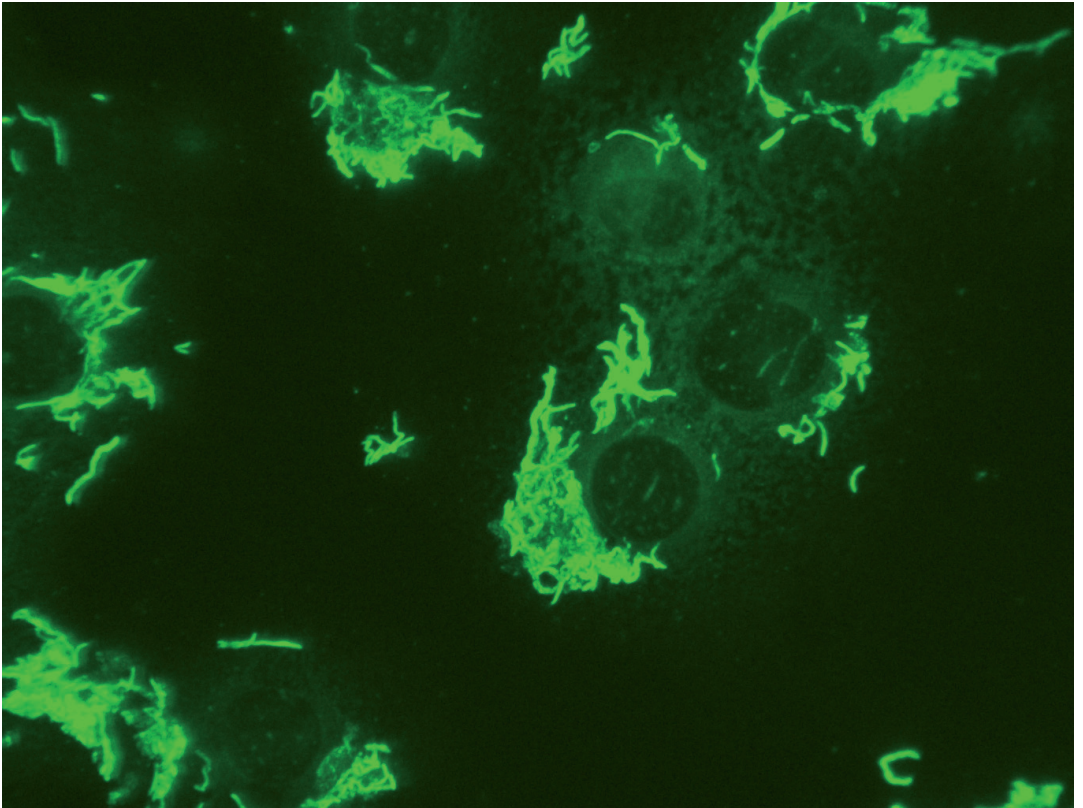
6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



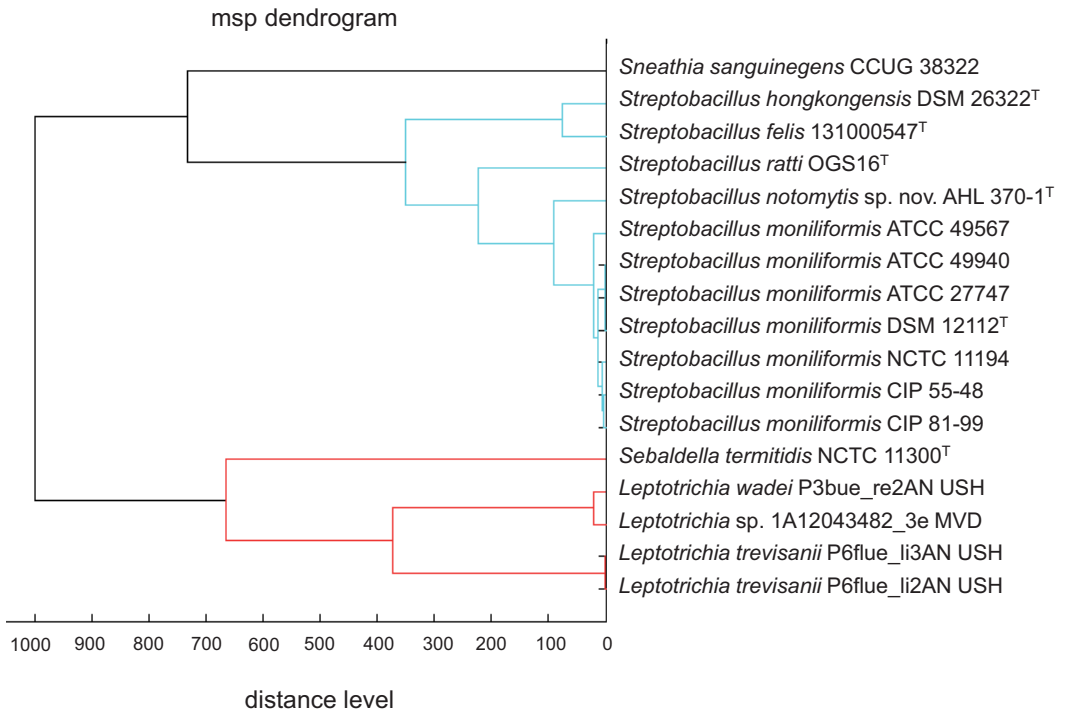
6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



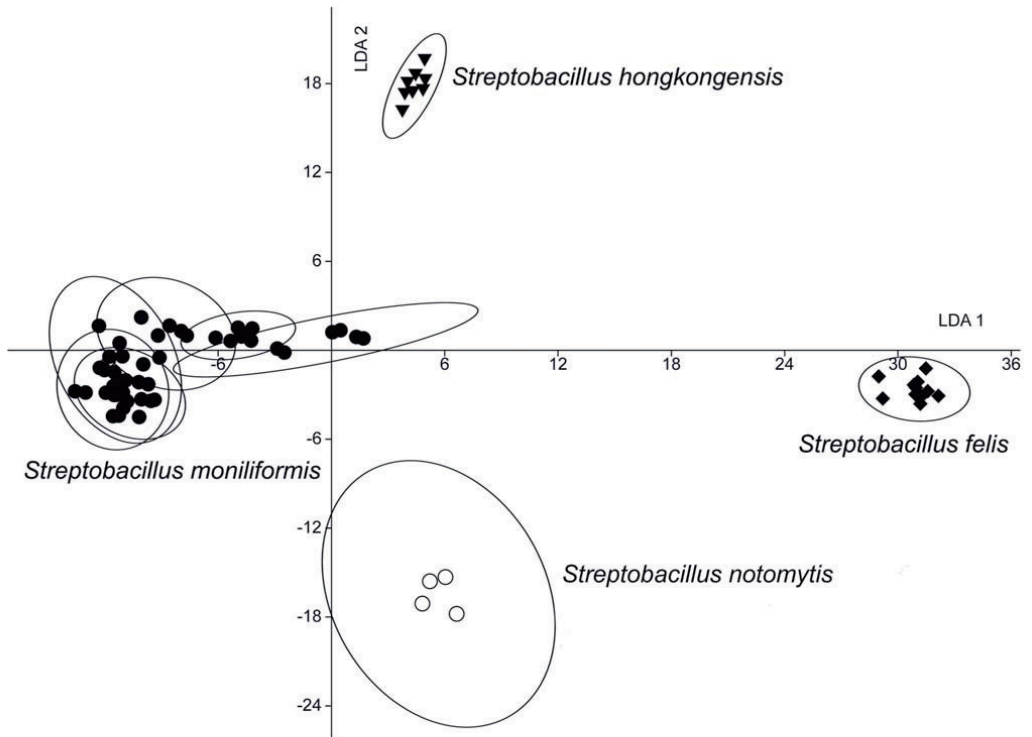
6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.10 Phylogenetic and comparative genomics of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*

Eisenberg, T.*, A. Fawzy, W. Nicklas, T. Semmler & C. Ewers

BMC Genomics 2016, 17(1): 864-875.

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- | | |
|------------------------------|---------------|
| • Initiative | wesentlich |
| • Projektplanung | unterstützend |
| • Durchführung der Versuche | beratend |
| • Auswertung der Experimente | unterstützend |
| • Erstellung der Publikation | wesentlich |

This is the original version of an article published in BMC Genomics.
This version is available online at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-3206-0>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Phylogenetic and comparative genomics of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*

Tobias Eisenberg^{1*}, Ahmad Fawzy^{1,2,5†}, Werner Nicklas³, Torsten Semmler^{4†} and Christa Ewers^{5†}

Abstract

Background: The *Leptotrichiaceae* are a family of fairly unnoticed bacteria containing both microbiota on mucous membranes as well as significant pathogens such as *Streptobacillus moniliformis*, the causative organism of streptobacillary rat bite fever. Comprehensive genomic studies in members of this family have so far not been carried out. We aimed to analyze 47 genomes from 20 different member species to illuminate phylogenetic aspects, as well as genomic and discriminatory properties.

Results: Our data provide a novel and reliable basis of support for previously established phylogeny from this group and give a deeper insight into characteristics of genome structure and gene functions. Full genome analyses revealed that most *S. moniliformis* strains under study form a heterogeneous population without any significant clustering. Analysis of infra-species variability for this highly pathogenic rat bite fever organism led to the detection of three specific variable number tandem analysis loci with high discriminatory power.

Conclusions: This highly useful and economical tool can be directly employed in clinical samples without laborious prior cultivation. Our and prospective case-specific data can now easily be compared by using a newly established MLVA database in order to gain a better insight into the epidemiology of this presumably under-reported zoonosis.

Keywords: Next generation sequencing, Multi locus variable number tandem repeat analysis (MLVA), Phylogeny, Typing, Fingerprinting, *Streptobacillus*, *Leptotrichiaceae*

Background

The *Leptotrichiaceae* are a family of underexplored and rarely isolated microorganisms within the phylum Fusobacteria containing both species known from certain pathologies as well as colonising members of the resident microbiota. Many if not all species of the *Leptotrichiaceae* inhabit the oral cavities, gastrointestinal or urogenital tracts of humans and animals [1–3]. One of the reasons they are rarely encountered is the obligate anaerobic or capnophilic growth dependence of these fastidious bacteria and the usual presence of a high number of concomitant microorganisms. Some

members of this family are well known pathogens, such as *Streptobacillus (S.) moniliformis*, one of the two causative organisms of the bacterial zoonosis rat bite fever [4]. Recently, a number of novel species have been described, most of which could be attributed to clinical disease [5–8]. It can also be concluded from numerous phylotypes, *Leptotrichiaceae* normally colonize mucous membranes [9–15], but when introduced into new tissue or host sites they are also able to shift their pathogenic potential and cause severe and even life-threatening disease. With increasing availability of next generation sequencing a number of single genomes have been published [6, 16–20]. However, almost no comprehensive genomic studies including these microorganisms have been completed, nor have virulence properties been identified in these species. Phylogenetic

* Correspondence: Tobias.Eisenberg@vetmed.uni-giessen.de

†Equal contributors

¹Abteilung Veterinärmedizin, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Schubertstr. 60/H13, D-35392 Giessen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

studies and identifications within the phylum Fusobacteria have been carried out and based on single or multiple gene sequences such as 16S rRNA, 16S–23S rRNA internal transcribed spacer, *gyrB*, *groEL*, *recA*, *rpoB*, conserved indels and genes for group-specific proteins, 43-kDa outer membrane protein and zinc protease [18, 21–30]. In an attempt to characterize different members of this phylum Gupta & Seti proposed various conserved signature indels (CSIs) in amino acid sequences for the *Leptotrichiaceae* from which three CSIs were found to be specific for this family [31]. On the other hand, no detailed phylogenetic and comparative genome studies dedicated to *Leptotrichiaceae* have been published up to now. Furthermore, and due to a general paucity of strains and attempts to differentiate members from the same species there is currently no tool available to type isolates in order to prove transmission chains. Our data, presented here, were derived from 46 complete genomes from 20 different taxa of the family *Leptotrichiaceae* aiming to provide the first such comparative analysis. Our study results confirm the picture of earlier phylogenies from this group that are now based on a larger scale of orthologous genes. We give a surveying insight into the investigated genomes, thereby also including recently described species from this family. With a novel approach it was, furthermore, possible to accurately and unequivocally type isolates of *S. moniliformis* based on three variable number tandem repeat (VNTR) sequences. With this, we are presenting a culture-independent, species-specific fingerprinting tool in order to type the most important causative organism of rat bite fever for the first time.

Results

Accession numbers

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the genome sequences used in this study are summarized in Table 1.

Phylogenetic analysis based on orthologous genes

To determine the phylogeny within the genus *Streptobacillus* we aligned the allelic variations of 281 orthologous genes from 29 strains of *S. moniliformis*, *S. ratti*, *S. notomytis*, *S. felis* and *S. hongkongensis* which resulted in 57,841 single nucleotide polymorphisms (SNPs). From these SNPs we inferred a maximum likelihood phylogeny showing the distance between the different species within this genus (Fig. 1). To zoom deeper into the phylogeny of the *S. moniliformis* group we repeated this analyses with 775 orthologous genes present in 23 *S. moniliformis* strains which resulted in 5,211 SNPs. These SNPs were also used to construct a maximum likelihood phylogeny (Fig. 2).

As shown in the tree, most *S. moniliformis* strains used for this study are unrelated and form a heterogeneous population without any significant clustering. Solely strains A378/1 and B5/1 that both originate from the same source but without a common epidemiological background were phylogenetically indistinguishable.

Analysis of genomes and protein functions

The genome size in members of the *Leptotrichiaceae* varies between 1.22 and 4.42 Mbp with *Caviibacter* (*C.*) *abscessus* and *Sebaldella* (*Se.*) *termitidis* being the smallest and largest genomes, respectively. Generally, and with the exception of *Sebaldella termitidis*, genomes are smaller than 2.45 Mbp. The genera *Caviibacter* and *Sneathia* (*Sn.*) are comparable with respect to genome size (1.22–1.34 Mbp) as are the genera *Streptobacillus* and *Oceanivirga* (*O.*) (1.38–1.90 Mbp). Members of the genus *Leptotrichia* (*L.*) are the second largest group with 2.31–2.47 Mbp. A general overview on the genomes of all strains under study is depicted in Table 2. A similar order can be observed with respect to coding DNA sequences (CDS), i.e., *C. abscessus* and *Sneathia* spp. possess 1212–1282 CDS, followed by *Streptobacillus* spp. and *O. salmonicida* (1293–1679), *Leptotrichia* spp. (1930–2365) and *Sebaldella termitidis* (4083). The average percentage of CDS within the whole genome displays a graded distribution within the family: a highly coding group consisting of the genera *Caviibacter*, *Oceanivirga* and *Sneathia* (89–93 %), an intermediate *Streptobacillus* spp. group (87 %) and a group containing the genera *Leptotrichia* and *Sebaldella* (84 %) with lower coding density. Nevertheless, intra-genus variability can be considerably high, the former results can inevitably also be shown for the average gene densities and the average intergenic regions (in parentheses average genes/Mbp; number of intergenic nt): *O. salmonicida* (1056; 79), *C. abscessus* (996; 76), *Sneathia* spp. (989; 84), *Streptobacillus* spp. (987; 115), *Leptotrichia* spp. (967; 144) and *Sebaldella* (936; 149). An organization of the genomes under study into clusters of orthologous groups (COGs) is depicted in Additional files 1 and 2 and shows, however, high intra-species as well as inter-species variations. On a generic level, gene contents of COG classes J, L, D and F are inversely correlated with increasing genome size, whereas COG classes K, N, T and Q are positively correlated (see Additional files 1 and 2).

Multiple-Locus Variable number tandem repeat

Analysis (MLVA)

In silico VNTR analysis

Under default conditions, 127 repeats were identified by the tandem repeat finder. For further analysis, the three most variable VNTRs were identified according to the degree of variability of allele types identified by

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 1 Strains as well as origins, clinical symptoms and host species of the *Leptotrichiaceae* members used in this study

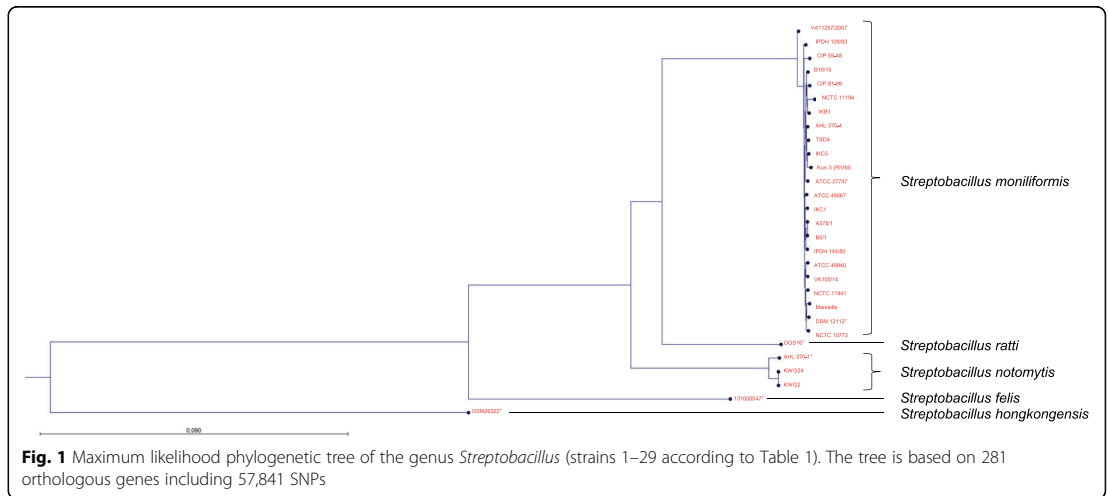
Strain no.	Strain designation	Species	Year of isolation	Host	Clinic/sample	Country	Strain reference	Genome reference	Accession number
1	DSM 12112 ^T (=ATCC 14647 ^T)	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1925	Human	Rat bite fever	France	[4]	[16]	CP001779.1 CP001780.1
2	CIP 55-48	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1947	Mouse	Lymph adenitis	UK	n. d. a.	this study	LWQV00000000
3	ATCC 27747	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1964	Turkey	Septic arthritis	USA	[51]	this study	LWQW00000000
4	NCTC 10773	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1971	Human	Blood culture	UK	n. d. a.	this study	LYRU00000000
5	NCTC 11194	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1977	Human	Rat bite fever	UK	n. d. a.	this study	LWQX00000000
6	IPDH 144/80	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1980	Turkey	Septic arthritis	Germany	n. d. a.	this study	LWQY00000000
7	CIP 81-99	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1981	Human	Blood culture (wild rat bite)	France	n. d. a.	this study	LWSZ00000000
8	AHL 370-4	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1982	Mouse	Ear infection	Australia	n. d. a.	this study	LWTA00000000
9	NCTC 11941	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1983	Human	Haverhill fever	UK	n. d. a.	this study	LXKD00000000
10	IPDH 109/83	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1983	Turkey	Septic arthritis	Germany	n. d. a.	this study	LWTB00000000
11	ATCC 49567	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1989	Mouse	Lymph adenitis	Germany	[52]	this study	LWTC00000000
12	Kun 3 (RIVM)	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1991	Rat	Healthy	The Netherlands	[53]	this study	LWTD00000000
13	ATCC 49940	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1992	Rat	Otitis media	Germany	[54]	this study	LWTE00000000
14	B10/15	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	Unknown	Wild rat	Unknown	The Netherlands	n. d. a.	this study	LWTF00000000
15	A378/1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	1995	Wild rat	Vaginal swab	Germany	DKFZ strain collection	this study	LWTG00000000
16	VA11257/2007	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2007	Human (farmer)	Rat bite fever, endocarditis	Germany	[55]	this study	LWTI00000000
17	VK105/14	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2008	Domestic rat	Abscess	Germany	TiHo strain collection	this study	LWTJ00000000
18	B5/1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2009	Laboratory mouse	After rat bite	Germany	DKFZ strain collection	this study	LXKJ00000000
19	Marseille	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2009	Rat	Rat bite fever	La Réunion	[56]	this study	LXKI00000000
20	IKC1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	n. d. a.	Rat	Oral swab	Japan	[39]	this study	LXKH00000000
21	IKC5	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	n. d. a.	Rat	Oral swab	Japan	[39]	this study	LXKG00000000
22	IKB1	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	n. d. a.	Rat	Oral swab	Japan	[39]	this study	LXKF00000000
23	TSD4	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	n. d. a.	Rat	Oral swab	Japan	[39]	this study	LXKE00000000
24	131000547 ^T (DSM 29248 ^T)	<i>Streptobacillus felis</i>	2013	Cat	Pneumonia	Germany	[5, 7]	[18]	LOHX00000000
25	DSM 26322 ^T (HKU33 ¹)	<i>Streptobacillus hongkongensis</i>	2014	Human	Abscess	Hong Kong	[8]	[18]	LOHY00000000
26	AHL 370-1 ^T	<i>Streptobacillus notomytis</i>	1979	Spinifex hopping mouse	Sepicaemia, cultured from liver tissue	Australia	[57]	[6]	SAMN04038436

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 1 Strains as well as origins, clinical symptoms and host species of the *Leptotrichiaceae* members used in this study (Continued)

27	KWG2	<i>Streptobacillus notomytis</i>	n. d. a.	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Oral swab	Japan	[39]	this study	SAMN04099645
28	KWG24	<i>Streptobacillus notomytis</i>	n. d. a.	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Oral swab	Japan	[39]	this study	SAMN04099670
29	OGS16 ^T	<i>Streptobacillus ratti</i>	n. d. a.	Rat (<i>Rattus rattus</i>)	Oral swab	Japan	[39]	[18]	SAMN04099675
30	CCUG 41628 ^T	<i>Sneathia sanguinegens</i>	1999	Human	Blood	Sweden	[58, 59]	[38]	LOQF00000000
31	Sn35	" <i>Sneathia amnii</i> "	n. d. a.	Human	Vaginal microbiota	n. d. a.	[19]	[19]	NZ_CP011280
32	NCTC 11300 ^T (ATCC 33386 ^T)	<i>Sebaldella termitidis</i>	1962	Termite	Intestine	n. d. a.	[60]	[17]	CP001739
33	DSM 1135 (C-1013-b)	<i>Leptotrichia buccalis</i>	2009	Human	Supragingival calculus	USA	n. d. a.	n. d. a.	CP001685
34	DSM 19756 (LB 57)	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	2013	Human	Prosthetic aortic valve	Germany	n. d. a.	n. d. a.	NZ_AZXW00000000
35	F0264	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	n. d. a.	Human	Oral cavity	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_ADAD00000000
36	F0254	<i>Leptotrichia hofstadii</i>	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_ACVB00000000
37	DSM 19757	<i>Leptotrichia shahii</i>	2013	Human	Gingivitis	Norway	n. d. a.	n. d. a.	NZ_ARDD00000000
38	DSM 19758	<i>Leptotrichia wadei</i>	2004	Human	Saliva	Norway	[2]	n. d. a.	NZ_ARDS00000000
39	F0279	<i>Leptotrichia wadei</i>	n. d. a.	Human	Subgingival plaque	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_AWVM00000000
40	Str. W10393	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 212	2015	Human	Oral microbiome project	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	CP012410
41	Str. W9775	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 215	2015	Human	Oral microbiome project	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_AWVR00000000
42	Str. F0581	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 225	2015	Human	Oral microbiome project	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_AWVS00000000
43	Str. F0557	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 879	2015	Human	Oral microbiome project	n. d. a.	n. d. a.	n. d. a.	NZ_AWVL00000000
44	CCUG 39713 ^T	<i>Caviibacter abscessus</i>	1998	Guinea pig	Cervical abscess	Sweden	n. d. a.	[38]	LOQG00000000
45	1510011837	<i>Caviibacter abscessus</i>	2015	Guinea pig	Cervical abscess	Germany	[38]	[38]	LOQH00000000
46	AVG2115 ^T	<i>Oceanivirga salmonicida</i>	1992	Atlantic salmon	Septicaemia	Ireland	[32, 61]	[37]	LOQI00000000
47	ATCC 25586	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	n. d. a.	Human	Cervico-facial lesion	n. d. a.	n. d. a.	[62]	AE009951

^T type strain, n. d. a. no data available, ATCC American Type Culture Collection, Rockville, USA, NCTC National Collection of Type Cultures, London, UK, CIP Collection Institut Pasteur, Paris, France, IPDH Institute for Poultry Diseases, Hannover, Germany, RIVM Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, The Netherlands, AHL Animal Health Laboratory, South Perth, Australia, ZfV Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Germany, DKFZ Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany, TiHo Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany, RBF rat bite fever



alignment analysis (Table 3). These three allelic loci were only present in *S. moniliformis* and thus proved to be specific for this microorganism (all other members of the *Leptotrichiaceae* were negative). The combination of the three loci yielded a high discriminatory index (0.94296 DI; Table 4).

PCR-based validation of *in silico* results

The absence of the calculated VNTR loci could also be proven by polymerase chain reaction (PCR) in all *Leptotrichiaceae* members other than *S. moniliformis* (data not shown). Contrarily, each of the ten *S. moniliformis* strains exhibited a specific band corresponding to their predicted tandem repeats pattern. Analysis of the sequenced PCR products confirmed the allele type allocation determined *in silico* (Table 4). VNTR_Sm1 alleles of two isolates, which were not found *in silico*, were successfully assigned (Table 4). Re-calculation revealed a DI of 0.9529 after including these two isolates, as well as one isolate for which no genome data was available. In order to facilitate comparisons of results in future studies, every genotype (from the allele types of the three loci) was expressed as a specific allele combination resulting in a specific allele code (Table 4). An online database dedicated to MLVA results of *S. moniliformis* has been established on the webserver of University Paris-Saclay, Orsay, France (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public>) which is open to future entries and strain comparisons.

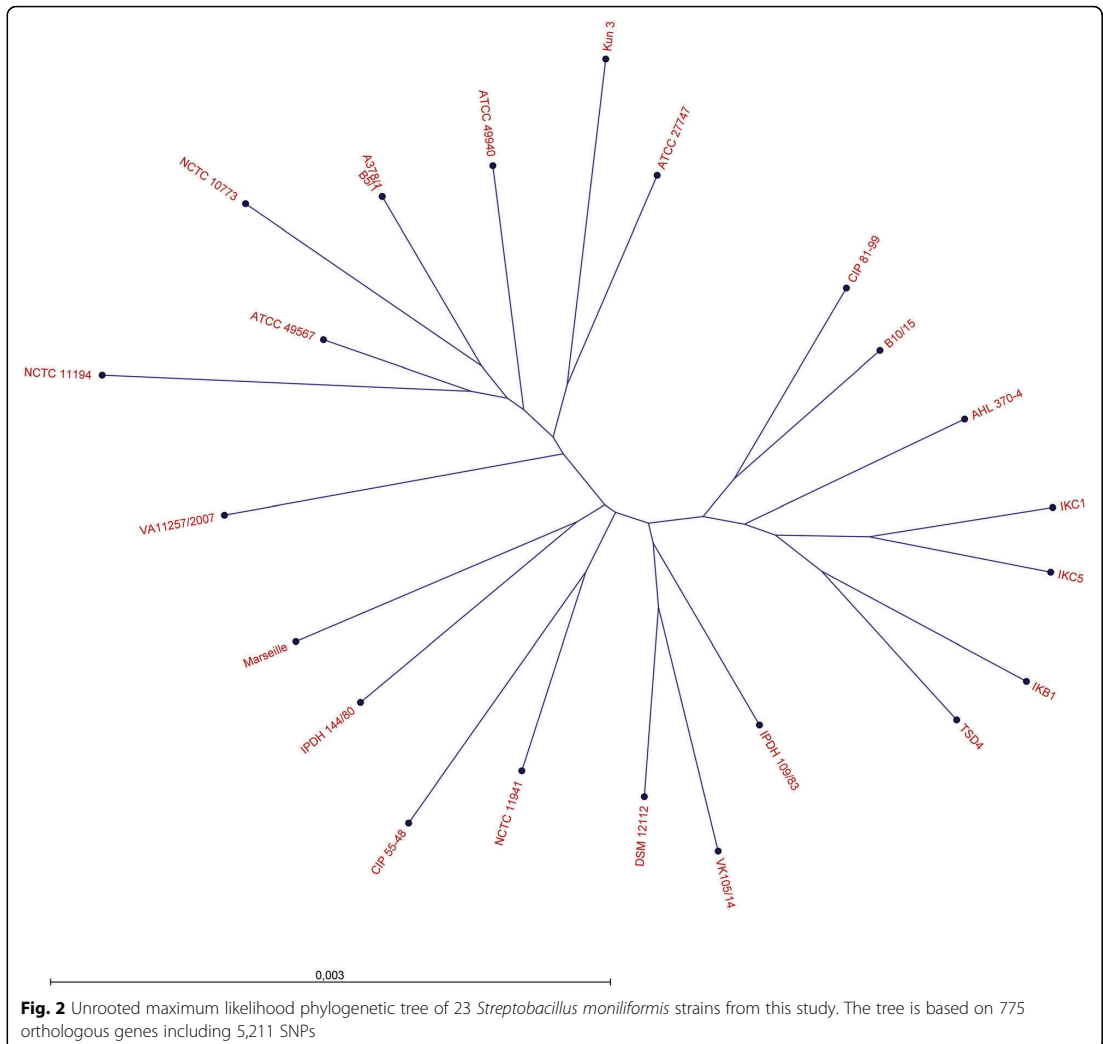
Discussion

Members of the *Leptotrichiaceae* are rarely encountered microorganisms, a phenomenon that seems to be highly dependent on difficulties with cultivation. With the availability of molecular methods in this field the

number of findings and frequencies has significantly increased [10–15, 32–36]. On the other hand, we still need deeper insight into the genomes of this group. In particular, the mechanisms involved in pathogenesis and virulence of pathogenic species are completely unexplored. We have undertaken a first step into this direction by analysing a broad spatio-temporal collection of strains, thereby including especially species with regular evidence for pathologies. Firstly, the large dataset from this study has been utilized for the confirmation of our phylogenetic picture from earlier studies [18, 30, 37, 38]. An intra-genus phylogeny that was based on 775 orthologous genes revealed a very similar picture to previous studies involving only four selected functional genes (Figs. 1 and 2). Conversely and in contrast to almost identical average nucleotide identity (ANI) values [30], full genome analyses revealed a high level of heterogeneity for all but two strains (no. 15 and 18) of *S. moniliformis* without any significant clustering. This is, albeit, not surprising, because the present study included a large spatio-temporal collection of 23 *S. moniliformis* strains that have been isolated over a period of 90 years from at least five different host species and from almost all subcontinents. We were also able to display the three predicted *Leptotrichiaceae* specific CSIs of MreB/MrI (2 aa deletion), AlaS and RecA (5 and 2 aa insertions, respectively) in all of our genomes as well as in the recently described members of the family (data not shown) [31].

Genome size dependent gene content has been described and could also be confirmed for the genomes from this study [19]. With increasing genome size gene contents of COG classes J, L, D and F involved in DNA replication, cell cycle regulation and protein translation

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



are inversely correlated, whereas COG classes K, N, T and Q involved in transcription, signal transduction, cell motility and the biochemistry of secondary metabolites are positively correlated (see Additional files 1 and 2). This makes sense when essential gene functions are preserved in smaller genomes and less important gene functions which are dispensable or can be 'outsourced' to the host, are lost [19]. On first impression the group of *S. moniliformis* strains is highly similar as can be concluded from related morphological and phenotypical properties and also from their high intra-species ANI of 98.5–99.3 % (cf. Table S2 in [30]). Based on data from this study very similar COG classes were also observed within this group (see Additional files 1 and 2),

but differences in coding densities suggested, on the other hand, remarkable discrepancies. Fuelled by the idea that these discrepancies could, furthermore, be utilized with respect to epidemiology, we have developed a specific MLVA typing scheme for the major pathogen from this group, *S. moniliformis*, and the causative organism of rat bite fever. This scheme proved to be sufficient in unequivocally typing all 23 *S. moniliformis* strains under study plus one additional isolate with high discriminatory power (0.9529 DI). Interestingly, only four allele codes (genotypes; LHL2, LHL5, LHL10 and LHL11) were found more than once among isolates (Table 4). At least for LHL2 isolates, a connection could be pursued in that both isolates have been stored in the same strain

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Table 2 Analysis of genome data as well as predictions of coding regions of the *Leptotrichiaceae* members used in this study

Strain no.	Organism	Approx. genome size (nt)	CDS ^a	rRNA	tRNA ^b	% GC ^c	Total DNA coding regions (nt)	Total non-coding regions (nt)	Coding genome space (%)	Average gene density (genes/Mbp)	Average inter-genic region (nt)
1	<i>S. moniliformis</i>	1673280	1568	16	39	26.3	1556870	116410	93	937	74
2	<i>S. moniliformis</i>	1678906	1658	12	37	26.1	1508835	170071	89	988	103
3	<i>S. moniliformis</i>	1684459	1591	14	35	26.1	1486041	198418	87	945	125
4	<i>S. moniliformis</i>	1897024	2244	9	43	28.9	1651665	245359	85	1183	109
5	<i>S. moniliformis</i>	1712153	1764	3	38	26.1	1542831	169322	89	1030	96
6	<i>S. moniliformis</i>	1668382	1615	13	36	26.1	1484745	183637	88	968	114
7	<i>S. moniliformis</i>	1686977	1543	12	35	26.4	1449924	237053	84	915	154
8	<i>S. moniliformis</i>	1598404	1608	14	38	25.9	1470174	128230	91	1006	80
9	<i>S. moniliformis</i>	1689124	1675	4	36	26.1	1399686	289438	79	992	173
10	<i>S. moniliformis</i>	1756513	1765	14	37	26.1	1559103	197410	87	1005	112
11	<i>S. moniliformis</i>	1763717	1621	9	35	26.1	1488168	275549	81	919	170
12	<i>S. moniliformis</i>	1518628	1540	12	33	25.9	1442043	76585	95	1014	50
13	<i>S. moniliformis</i>	1689360	1765	5	36	26.1	1526748	162612	89	1045	92
14	<i>S. moniliformis</i>	1674237	1597	13	37	26.2	1477515	196722	87	954	123
15	<i>S. moniliformis</i>	1667701	1692	14	36	26.0	1518810	148891	90	1015	88
16	<i>S. moniliformis</i>	1690579	1538	16	37	26.1	1468143	222436	85	910	145
17	<i>S. moniliformis</i>	1608659	1507	22	34	26.2	1433763	174896	88	937	116
18	<i>S. moniliformis</i>	1497161	1644	8	36	25.8	1322022	175139	87	1098	107
19	<i>S. moniliformis</i>	1696954	1774	5	38	26.1	1521612	175342	88	1045	99
20	<i>S. moniliformis</i>	1696554	1688	17	37	26.0	1509528	187026	88	995	111
21	<i>S. moniliformis</i>	1792325	1664	16	42	26.2	1550631	241694	84	928	145
22	<i>S. moniliformis</i>	1759287	1737	13	43	25.9	1566621	192666	88	987	111
23	<i>S. moniliformis</i>	1608076	1559	10	35	26.0	1445580	162496	89	969	104
24	<i>S. felis</i>	1610666	1754	3	37	26.4	1450014	160652	89	1089	92
25	<i>S. hongkongensis</i>	1543001	1485	14	35	26.1	1324059	218942	83	962	147
26	<i>S. notomytis</i>	1762984	1773	9	43	28.1	1511157	251827	83	1006	142
27	<i>S. notomytis</i>	1426245	1349	8	40	26.4	1257996	168249	87	946	125
28	<i>S. notomytis</i>	1384502	1341	19	39	26.3	1256817	127685	90	969	95
29	<i>S. ratti</i>	1499353	1411	11	39	25.9	1318767	180586	86	941	128
30	<i>Sneathia sanguinegens</i>	1300753	1329	2	34	26.7	1214541	86212	93	1022	65
31	" <i>Sn. amnii</i> "	1339284	1282		34	28.3	1207722	131562	89	957	103
32	<i>Sebaldella termitidis</i>	4418842	4135	13	40	33.5	3802074	616768	84	936	149
33	<i>Leptotrichia buccalis</i>	2465610	2299	15	46	29.6	2062809	402801	80	932	175
34	<i>L. goodfellowii</i>	2281162	2241	7	39	31.6	2045213	235949	88	982	105
35	<i>L. goodfellowii</i>	2287284	2373	3	39	31.5	2055020	232264	89	1037	98
36	<i>L. hofstadii</i>	2453253	2720	13	47	30.8	2059248	394005	81	1109	145
37	<i>L. shahii</i>	2144606	1969	10	41	29.5	1812950	331656	82	918	168
38	<i>L. wadei</i>	2316529	2139	11	42	29.3	1973929	342600	83	923	160
39	<i>L. wadei</i>	2353455	2212	3	27	29.2	2008568	344887	83	940	156
40	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 212	2444904	2231	14	43	31.4	2146482	298422	86	936	130
41	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 215	2308492	2195	3	34	31.4	2039067	269425	87	951	123

Table 2 Analysis of genome data as well as predictions of coding regions of the *Leptotrichiaceae* members used in this study (Continued)

Accession	Species	CDS	tRNA	GC	Other	Other	Other	Other	Other	Other	
42	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 225	2400083	2306	3	24	29.6	2061283	338800	84	961	147
43	<i>Leptotrichia</i> sp. oral taxon 879	2415750	2361	4	25	29.6	2026284	389466	81	977	165
44	<i>C. abscessus</i>	1219935	1198			26.5	1131456	88479	92	982	74
45	<i>C. abscessus</i>	1304155	1316	4	35	26.4	1201320	102835	91	1009	78
46	<i>O. salmonicida</i>	1769081	1869	2	38	25.4	1621182	147899	91	1056	79
47	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (outgroup)	2174500	2022	15	47	27.2	1937724	236776	88	930	117

^aCDS: DNA coding sequences; ^btRNA: transfer ribonucleic acid; ^cGC: guanine-cytosine content

collection, although a direct transmission could not be proven. To check the clonality of isolates belonging to these four genotypes we have investigated further loci with high discriminatory potential, i.e., the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) region known to occur in *S. moniliformis* (http://crispr.u-psud.fr/cgi-bin/crispr/SpecieProperties.cgi?Taxon_id=519441). In contrast to all other allele codes (LHL5, LHL10, LHL11), both strains (no. 15 and 18) belonging to the allele code LHL2 indeed shared an identical CRISPR region, thereby pointing towards a clonal relation of these two isolates (data not shown) as could also be concluded from the phylogenetic tree (Fig. 2). Due to its length of up to approximately 3,000 nucleotides and its high level of heterogeneity the CRISPR region seems, on the other hand, presently not very well suited as a direct typing tool, but could be useful in certain situations to confirm or negate clonality of strains. A second advantage of the MLVA method described in this study is that it can effectively be pursued directly from the original matrix (e.g., a mouth microbiota swab and a clinical sample) without prior cultivation of the organism, which offers the possibility to better understand transmission chains in the future. This seems to be especially relevant since established PCR assays are not species specific, but limited to genus level specificity [37, 39, 40]. The majority of diagnoses of rat bite fever cases in the recently published literature relies only on partial 16S rRNA gene sequence analysis that may – in the light of very similar novel *Streptobacillus* spp. that

also colonize rats – be quite uncertain for proper pathogen identification [41]. Hopefully, the newly established MLVA database will help to clarify regional infectious clusters and confirm transmission of certain lineages.

Conclusion

We have undertaken a first analysis of *Leptotrichiaceae* genomes using a large spatiotemporal collection of strains also including novel members of this group. Our dataset unveiled a first insight into characteristics founding a stable phylogeny, genome structure and COG classes. Beside apparent intra-species similarities we have detected also genetic heterogeneities that provided a basis for fingerprinting the most relevant pathogen from this group, the rat bite fever organism, *S. moniliformis*. This highly useful and economical tool can be directly used from clinical samples without ambitious prior cultivation and with high discriminatory power. Our data form the basis for a newly established MLVA database that provides the opportunity to store and compare isolate-specific information in future cases with this neglected zoonosis.

Methods

Generation of genomic data

Twenty-two strains of *S. moniliformis* were sequenced in this study, ten strains were taken from previous publications of our group and 15 strains were descended from other projects (Table 1). Genomic DNA was extracted

Table 3 *Streptobacillus moniliformis* specific Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) primer sequences used in this study

Primer ID	VNTR position ^a	Repeat size in nt (identity in %)	Sequence (5–3)	PCR product size (bp)
VNTR_Sm1	1576120 - 1576145	3 (100)	TCA TTT ACT CAC CCT AGT AGT GGT CCA GTT GAA TAT AAG CTT GCT ATG G	210
VNTR_Sm2	1182890 - 1182907	6 (100)	TGG AAC TGT TTG TTG AGT ATT TCC A AGG GAC AGA TGT TCA ATT TGT GTA	298
VNTR_Sm3	284997 - 285268	36 (91)	TAC GCT GTA GGG TTG AAC GG ACA GTT TGA GCA CGT CTT AAT CC	830

Primers were designed with Geneious (v. 8.1.3; Biomatters, Auckland, NZ) [43] and to be complementary to VNTR flanking regions that were conserved among genomes; ^aaccording to the *S. moniliformis* DSM 12112^T genome (CP001779.1)

Table 4 VNTR allele types of the *Streptobacillus moniliformis* strains used in this study

Isolate ID	VNTR_Sm1 ^a	VNTR_Sm2	VNTR_Sm3 ^b	Allele code
DSM 12112^T	9	3	16	LHL1
CIP 55-48	7	3	16	LHL10
ATCC 27747	10	3	16	LHL4
NCTC 10773	8	4	17	LHL15
NCTC 11194	6	3	17	LHL16
IPDH 144/80	6	3	16	LHL5
CIP 81-99	7	3	16	LHL10
AHL 370-4	7	2	15	LHL3
NCTC 11941	6	3	18	LHL11
IPDH 109/83	6	3	16	LHL5
ATCC 49567	6	3	16	LHL5
Kun 3 (RIVM)	6	3	18	LHL11
ATCC 49940	6	3	14	LHL6
B10/15	6	4	15	LHL7
A378/1	8	5	16	LHL2
VA11257/2007	6	3	16	LHL5
VK105/14	8	3	16	LHL13
B5/1	8	5	16	LHL2
Marseille	6	4	14	LHL14
IKC1	6	3	15	LHL8
IKC5	5	3	15	LHL9
IKB1	6	3	16	LHL5
TSD4	11	3	18	LHL12
A40-13^c	11	2	17	LHL17

Bold rows represent strains used for a PCR-based validation of *in silico* identified VNTR allele types (underlined alleles were not found *in silico* and only identified after PCR amplification); ^a in order to fit requirements of the database, the repeat copy numbers at locus VNTR_Sm1 have been rounded up to receive integer values (e.g., 9 instead of 8.7); ^b while the repeat copy numbers at locus VNTR_Sm3 have been rounded up to the next half-value and doubled to receive integer values (e.g., 15 instead of 7.2); ^c type strain; *strain was only used for validation (no complete genome available)

from a 72 h bacterial culture with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, Epicentre, distributed by Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany). Whole genome sequencing of the strains was performed on an Illumina MiSeq with v3 chemistry resulting in 300 bp paired end reads and a coverage of greater than 90×. Quality trimming and de novo assembly was performed with CLC Genomics Workbench, Version 7.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). For automatic annotation we used the RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology [42]. Data from further relevant reference genomes from the *Leptotrichiaceae* were also utilized and obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Sequence analyses and genome calculations as well as oligonucleotide primer generation were carried out with Geneious (v. 8.1.3; Biomatters, Auckland, NZ) [43]. Table 1 depicts the set of strains and reference genomes used for this study.

Phylogenetic analysis based on orthologous genes

The determination of the maximum common genome (MCG) alignment was done comprising those genes present in all genomes considered for comparison [44]. Based on the parameters sequence similarity (minimum 70 %) and coverage (minimum 90 %) the genes were clustered and those genes that were present in each genome, fulfilling the threshold parameters were defined as MCG. This resulted in 281 orthologous genes for the comparison of 29 strains of *S. moniliformis*, *S. rattii*, *S. notomytis*, *S. felis* and *S. hongkongensis* and in 775 orthologous genes for the comparison within 23 strains of *S. moniliformis* only.

The following extraction of the allelic variants of these genes from all genomes was performed by a blast based approach after which they were aligned individually for each gene and concatenated which resulted in an alignment of 219,961 bp for the 29 strains and of 546,508 bp for the 23 *S. moniliformis* strains [45].

This alignment was used to generate a phylogenetic tree with randomized accelerated maximum likelihood (RAxML) 8.1 [46] using a General Time Reversible model and gamma correction for among site rate variation.

Analysis of genomes and protein functions

Genes were predicted with Prodigal [47] and assigned to COGs with the NCBI's Conserved Domain Database [48].

Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA)

In silico VNTR analysis

The complete genome sequence of the *S. moniliformis* type strain DSM12112^T (accession number CP001779.1) was used to search for potential VNTRs using a tandem repeat finder web tool (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.basic-submit.html>). We focused our search on repeats that were characterized by high purity, large size, and/or large number of repeat copies [49]. Repeats of interest were aligned against a set of available genomes depicted in Table 1 using Geneious and allele types were determined as shown in repeat copy numbers. The DI was calculated for a combination of three most variable VNTRs using an online discriminatory power calculator (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/).

PCR-based validation of *in silico* results

Ten *S. moniliformis* strains (strain nos. 1, 2, 3, 12, 14, 15, 21, 22 and 23 according to Table 1 plus strain A40-13

for which complete genomic data were not available) as well as all accessible members of the *Leptotrichiaceae* other than *S. moniliformis* were used for validation. DNA was extracted from respective isolates (2–3 colonies) by boiling in 100 μ L distilled water for 20 min (min.) followed by centrifugation at $20,817 \times g$ for 5 min. The 20 μ L final PCR reaction contained 10 μ L of Hotstar Taq MasterMix (Qiagen, Hilden, Germany), 1 μ L of each forward and reverse primer (10 pmol/ μ L) (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) (Table 3), 6 μ L DNase free PCR grade water (Qiagen), and 2 μ L of the extracted DNA. PCR conditions were as following: 1 \times (95 $^{\circ}$ C, 15 min), 40 \times (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s), 1 \times (72 $^{\circ}$ C, 10 min). PCR products were stained with ethidium bromide in a 2 % agarose gel (100 V for 1.5 h) and then analyzed with a gel documentation system (BioDoc-It, UVP, UK). The PCR amplicons were purified using MicroElute DNA Cycle-Pure Kit (OMEGA bio-tek, Norcross, USA) and sequenced at SeqLab-Microsynth laboratories (Göttingen, Germany). All sequences were analyzed by tandem repeat finder web tool and/or BLASTN 2.3.1+ [50] hosted by NCBI website and compared to the *in silico* results.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Analysis of clusters of orthologous groups (COGs) of the *Leptotrichiaceae* members used in this study. COGs were assessed as described in the Materials and Methods. (XLSX 16 kb)

Additional file 2: Figure S1. Relative abundances of clusters of orthologous groups (COGs) of the *Leptotrichiaceae* members used in this study. COGs were assessed as described in the Materials and Methods. (TIF 4188 kb)

Abbreviations

AHL: Animal Health Laboratory South Perth, Australia; ANI: Average nucleotide identity; ATCC: American Type Culture Collection Rockville, USA; C: *Caviibacter*; $^{\circ}$ C: Degrees Celsius; CDS: Coding DNA sequences; CIP: Collection Institut Pasteur Paris, France; COG: Cluster of orthologous groups; CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CS: Conserved signature index; DDBJ: DNA Data Bank of Japan; DI: Discriminatory index; DNA: Desoxyribonucleic acid; DKFZ: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Germany; EMBL: European Molecular Laboratory; Fig: Figure; g: Gravity; GC: Guanine-cytosine content; h: Hour; IPDH: Institute for Poultry Diseases Hannover, Germany; kDa: kilo Dalton; L: *Leptotrichia*; LHL: Landesbetrieb Hessisches Landeslabor; Mbp: Mega base pairs; MCG: Maximum common genome; min: minute; MVLA: Multi locus variable number tandem repeat analysis; μ L: micro liter; NCBI: National Center for Biotechnology Information; NCTC: National Collection of Type Cultures London, UK; n. d. a.: no data available; nt: nucleotides; O: *Oceanivirga*; PCR: Polymerase chain reaction; RAST: Rapid annotations using subsystems technology; RaxML: Randomized accelerated maximum likelihood; RBF: Rat bite fever; RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene Bilthoven, The Netherlands; rRNA: ribosomal ribonucleic acid; S: *Streptobacillus*; Se: *Sebadella*; sec.: second; Sn: *Sneathia*; SNPs: Single nucleotide polymorphisms; † : Type strain; TiHo: Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany; tRNA: transfer ribonucleic acid; VNTR: Variable number tandem repeat; ZfV: Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Germany

Acknowledgement

We thank Ulrike Kling, Asmahan Omar, Anna Mohr, Katharina Engel, Mersiha Curic, Jens Heinbächer, Ursula Leidner, Andrea Erles-Kemna and Bernhard Berkus for excellent technical assistance and Barbara Gamb for making even

the most exotic manuscripts available. We are greatly acknowledging the support of Walter Geißdörfer (Erlangen), Judith Rohde (Hannover), Bernard La Scola (Marseille), Koichi Imaoka (Tokyo) and Nobuhito Hayashimoto (Tokyo) for providing strains or DNA of strains no. 17, 18, 19, 21–28 and A40-13, respectively.

Funding

We declare that none of the authors has received funding for this work.

Availability of data and materials

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the genome sequences used in this study are summarized in Table 1. Phylogenetic datasets generated during and analysed during the current study are available in the Dryad Digital Repository, <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.1q7q4> [45].

Authors' contributions

TE, CE and TS conceived the study. TE, AF, WN, and TS carried out diagnostics and experiments. TE, CE and TS conducted the data analysis. TE wrote the manuscript and all the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

"Not applicable" (This manuscript does not contain any human or animal participants, human or animal data, or human or animal tissue and therefore does not require a statement on ethics approval and consent.)

Author details

¹Abteilung Veterinärmedizin, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL), Schubertstr. 60/H13, D-35392 Giessen, Germany. ²Department of Medicine and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza Square 12211, Egypt. ³Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany. ⁴Robert Koch-Institut, D-13353 Berlin, Germany. ⁵Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Germany.

Received: 9 June 2016 Accepted: 25 October 2016

Published online: 03 November 2016

References

- Gaastera W, Boot R, Ho HT, Lipman LJ. Rat bite fever. *Vet Microbiol*. 2009; 133(3):211–28.
- Eribe ER, Paster BJ, Caugant DA, Dewhurst FE, Stromberg VK, Lacy GH, Olsen I. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(Pt 2):583–92.
- Harwich Jr MD, Serrano MG, Fettweis JM, Alves JM, Reimers MA, Buck GA, Jefferson KK. Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 8:S4.
- Levaditi C, Nicolau S, Poincloux P. Sur le rôle étiologique de *Streptobacillus moniliformis* (nov. spec.) dans l'érythème polymorphe aigu septicémique. *C R Acad Sci*. 1925;180:1188–90.
- Eisenberg T, Glaeser S, Nicklas W, Mauder N, Contzen M, Aledelbi K, Kämpfer P. *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(7):2172–8.
- Eisenberg T, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, Nicklas W, Rau J, Mauder N, Hofmann N, Imaoka K, Kimura M, et al. *Streptobacillus notornytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notornis alexis* THOMAS, 1922), and emended description of *Streptobacillus Levaditi* et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(12):4823–9.
- Eisenberg T, Nesselser A, Nicklas W, Spamer V, Seeger H, Zschöck M. *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. *J Clin Microbiol Case Reports*. 2014;2014:1–7.
- Woo PC, Wu AK, Tsang CC, Leung KW, Ngan AH, Curreem SO, Lam KW, Chen JH, Chan JF, Lau SK. *Streptobacillus hongkongensis* sp. nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis, and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 9):3034–9.

9. Bik EM, Rohlik CM, Chow E, Carlin KP, Jensen ED, Venn-Watson S, Relman DA. Indigenous microbiota of marine mammals. In: 13th International Symposium on Microbial Ecology. Seattle: International Society for Microbial Ecology; 2010. <http://www.isme-microbes.org/isme13>.
10. Chaves-Moreno D, Plumeier I, Kahl S, Krismer B, Peschel A, Oxley AP, Jauregui R, Pieper DH. The microbial community structure of the cotton rat nose. *Environ Microbiol Rep*. 2015;7(6):929–35.
11. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, Buckley CM, Davis IJ, Bennett ML, Marshall-Jones ZV. The canine oral microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):e36067.
12. Hullar MA, Lancaster SM, Li F, Tseng E, Beer K, Atkinson C, Wahala K, Copeland WK, Randolph TW, Newton KM, et al. Enterolignan-producing phenotypes are associated with increased gut microbial diversity and altered composition in premenopausal women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(3):546–54.
13. Strong T, Dowd S, Gutierrez AF, Coffman J. Amplicon pyrosequencing of wild duck eubacterial microbiome from a fecal sample reveals numerous species linked to human and animal diseases. *Research*. 2013;2(224):1–7. [v1; ref status: awaiting peer review, <http://f1000res/1yy>]. F1000.
14. Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM, Suchodolski JS. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008;66(3):579–89.
15. Bik EM, Costello EK, Switzer AD, Callahan BJ, Holmes SP, Wells RS, Carlin KP, Jensen ED, Venn-Watson S, Relman DA. Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. *Nat Commun*. 2016;7:10516.
16. Nolan M, Gronow S, Lapidus A, Ivanova N, Copeland A, Lucas S, Del Rio TG, Chen F, Tice H, Pitluck S, et al. Complete genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901). *Stand Genomic Sci*. 2009;1(3):300–7.
17. Harmon-Smith M, Celina L, Chertkov O, Lapidus A, Copeland A, Glavina Del Rio T, Nolan M, Lucas S, Tice H, Cheng JF, et al. Complete genome sequence of *Sebadella termitidis* type strain (NCTC 11300). *Stand Genomic Sci*. 2010;2(2):220–7.
18. Eisenberg T, Imaoka K, Kimura M, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, Rau J, Nicklas W, Kämpfer P. *Streptobacillus rattii* sp. nov., isolated from a black rat (*Rattus rattus*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(4):1620–6.
19. Hanwich Jr MD, Serrano MG, Fettweis JM, Alves JM, Reimers MA, Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Buck GA, Jefferson KK. Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 8:54.
20. Ivanova N, Gronow S, Lapidus A, Copeland A, Glavina Del Rio T, Nolan M, Lucas S, Chen F, Tice H, Cheng JF, et al. Complete genome sequence of *Leptotrichia buccalis* type strain (C-1013-b). *Stand Genomic Sci*. 2009;1(2):126–32.
21. Woo PC, Wong SS, Teng JL, Leung KW, Ngan AH, Zhao DQ, Tse H, Lau SK, Yuen KY. *Leptotrichia hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural reservoir. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(6):391–401.
22. Conrads G, Claros MC, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam V, Goldstein EJ. 16S–23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(Pt 2):493–9.
23. Sun D, Zhang H, Lv S, Wang H, Guo D. Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of other *Fusobacterium* species. *Res Vet Sci*. 2013;95(1):27–33.
24. Kim HS, Lee DS, Chang YH, Kim MJ, Koh S, Kim J, Seong JH, Song SK, Shin HS, Son JB, et al. Application of *proB* and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):545–53.
25. Shah HN, Olsen I, Bernard K, Finegold SM, Gharbia S, Gupta RS. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. *Anaerobe*. 2009;15(5):179–94.
26. Strauss J, White A, Ambrose C, McDonald J, Allen-Vercoe E. Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut. *Anaerobe*. 2008;14(6):301–9.
27. Jin J, Haga T, Shinjo T, Goto Y. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium varium* and *Fusobacterium nucleatum* based on *gyrB* gene sequences. *J Vet Med Sci*. 2004;66(10):1243–5.
28. Jalava J, Erola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49(Pt 4):1375–9.
29. Lawson PA, Gharbia SE, Shah HN, Clark DR, Collins MD. Intrageneric relationships of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Int J Syst Bacteriol*. 1991;41(3):347–54.
30. Eisenberg T, Nicklas W, Mauder N, Rau J, Contzen M, Semmler T, Hofmann N, Aledelbi K, Ewers C. Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134312.
31. Gupta RS, Sethi M. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe*. 2014;28:182–98.
32. Palmer R, Drinan E, Murphy T. A previously unknown disease of farmed Atlantic salmon: pathology and establishment of bacterial aetiology. *Dis Aquat Org*. 1994;19:7–14.
33. Wouters EG, Ho HT, Lipman LJ, Gaastra W. Dogs as vectors of *Streptobacillus moniliformis* infection? *Vet Microbiol*. 2008;128(3–4):419–22.
34. Swartz JD, Lachman M, Westveer K, O'Neill T, Geary T, Kott RW, Berardinelli JG, Hatfield PG, Thomson JM, Roberts A, et al. Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Front Vet Sci*. 2014;1:19.
35. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, Nomicos E, Polley EC, Komarow HD, Program NCS, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res*. 2012;22(5):850–9.
36. Eisenberg T, Glaeser SP, Kämpfer P, Schauerer N, Geiger C. Root sepsis associated with insect-dwelling *Sebadella termitidis* in a lesser dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015;108(6):1373–82.
37. Eisenberg T, Kämpfer P, Ewers C, Semmler T, Glaeser SP, Collins E, Rutledge M, Palmer R. *Oceanivirga salmonicida* gen. nov. sp. nov., a novel member from the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66:2429–37.
38. Eisenberg T, Glaeser SP, Ewers C, Semmler T, Drescher B, Kämpfer P. *Caviibacter abscessus* gen. nov., sp. nov., a member from the family *Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(4):1652–9.
39. Kimura M, Tanikawa T, Suzuki M, Koizumi N, Kamiyama T, Imaoka K, Yamada A. Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*. 2008;52(1):9–15.
40. Rohde J, Rapsch C, Fehr M. Case report: Abscessation due to *Streptobacillus moniliformis* in a rat [in German]. *Prakt Tierarz*. 2008;89(6):466–73.
41. Eisenberg T, Ewers C, Rau J, Akimkin V, Nicklas W. Approved and novel strategies in diagnostics of rat bite fever and other *Streptobacillus* infections in humans and animals. *Virulence*. 2016;7(6):630–48.
42. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008;9:75.
43. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647–9.
44. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard K, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet*. 2014;46(12):1321–6.
45. Eisenberg T, Fawzy A, Nicklas W, Semmler T, Ewers C. Data from: Phylogenetic and comparative genomics of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*. Dryad Digital Repository. doi:10.5061/dryad.1q7q4; 2016.
46. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312–3.
47. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:119.
48. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DJ, et al. CDD: NCBIs conserved domain database. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D222–6.
49. Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome Res*. 2007;17(12):1787–96.
50. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7(1–2):203–14.
51. Yamamoto R, Clark GT. *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. *Vet Rec*. 1966;79(4):95–100.

52. Wullenweber M, Kaspareit-Rittinghausen J, Farouq M. *Streptobacillus moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6 J mice and susceptibility to infection of different strains of mice. *Lab Anim Sci*. 1990; 40(6):608–12.
53. Boot R, Oosterhuis A, Thuis HC. PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab Anim*. 2002;36(2):200–8.
54. Wullenweber M, Jonas C, Kunstyr I. *Streptobacillus moniliformis* isolated from otitis media of conventionally kept laboratory rats. *J Exp Anim Sci*. 1992; 35(1):49–57.
55. Kondruweit M, Weyand M, Mahmoud FO, Geissdorfer W, Schoerner C, Ropers D, Achenbach S, Strecker T. Fulminant endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis* in a young man. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 134(6):1579–80.
56. Loidant S, Jaffar-Bandjee MC, La Scola B. Shell vial cell culture as a tool for *Streptobacillus moniliformis* "resuscitation". *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):306–7.
57. Hopkinson WI, Lloyd JM. *Streptobacillus moniliformis* septicaemia in spinifex hopping mice (*Notomys alexis*). *Aust Vet J*. 1981;57(11):533–4.
58. Hanff PA, Rosol-Donoghue JA, Spiegel CA, Wilson KH, Moore LH. *Leptotrichia sanguinegens* sp. nov., a new agent of postpartum and neonatal bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1995;20 Suppl 2:S237–9.
59. Collins MD, Hoyles L, Tornqvist E, von Essen R, Falsen E. Characterization of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*": description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2001;24(3):358–61.
60. Sebald M. Etude sur les bacteries anaerobies gram-negatives asporulees. Laval: Theses de L'universite Paris, Imprimerie Barneoud S. A; 1962.
61. Maher M, Palmer R, Gannon F, Smith TJ. Relationship of a novel bacterial fish pathogen to *Streptobacillus moniliformis* and the Fusobacteria group, based on 16S ribosomal RNA analysis. *Syst Appl Microbiol*. 1995;18:79–84.
62. Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, Bhattacharyya A, Bartman A, Gardner W, Grechkin G, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol*. 2002;184(7):2005–18.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

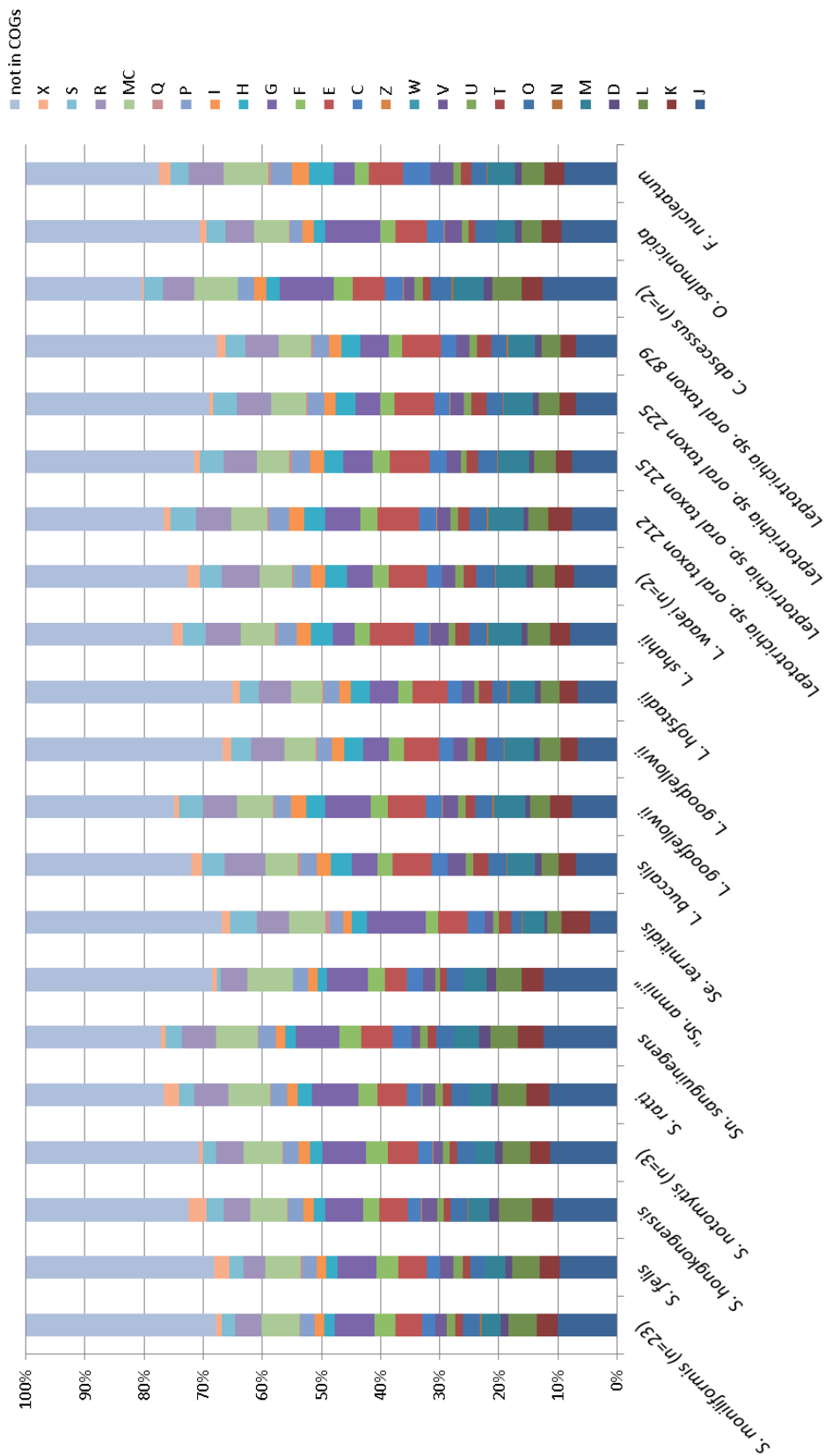
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Strain no.	COG Clusters													Reference												
	Information storage and processing																									
	Cellular processing and signaling													Metabolism	Poorly characterized						Molbiome prophages, transposons	and in COGs	Reference			
	J	K	L	D	M	N	O	T	U	V	W	Z	C		E	F	G	H	I	P				Q	MC	R
1	10.1	3.4	5.2	1.3	3.6	0.3	2.9	1.3	2.0	1.8	0.0	0.1	2.1	4.7	3.7	6.8	1.9	1.7	2.4	0.2	6.7	2.4	0.5	30.2	this study	
2	10.2	3.7	4.6	1.2	3.5	0.3	2.6	1.1	1.6	1.9	0.0	0.1	2.1	4.5	3.7	6.6	1.9	1.6	2.2	0.2	6.2	2.3	1.0	31.8	this study	
3	10.3	3.4	4.7	1.2	3.6	0.3	2.6	1.1	1.6	1.9	0.0	0.1	2.1	4.5	3.7	6.6	1.9	1.6	2.2	0.2	6.2	2.3	1.0	31.8	this study	
4	8.6	3.8	4.6	1.1	3.6	0.2	2.6	1.5	1.3	1.6	0.0	0.0	2.4	4.3	3.0	6.4	1.6	1.5	2.0	0.3	5.6	2.0	1.0	37.1	this study	
5	9.4	3.6	4.6	1.1	3.3	0.3	2.8	1.1	1.9	1.8	0.0	0.1	1.9	4.4	3.0	6.4	1.7	1.5	2.0	0.3	5.6	2.4	1.2	34.1	this study	
6	10.0	3.6	5.0	1.2	3.4	0.2	3.2	1.2	1.3	1.9	0.0	0.1	2.2	4.6	3.7	6.8	1.9	1.6	2.4	0.1	6.1	4.7	1.0	32.0	this study	
7	10.8	3.4	5.1	1.2	3.4	0.1	3.2	1.2	1.6	1.8	0.0	0.1	2.3	4.8	3.8	7.1	2.0	1.8	2.6	0.1	6.9	4.5	0.5	29.2	this study	
8	10.2	3.7	4.8	1.1	3.4	0.2	3.2	1.3	1.5	1.6	0.0	0.1	2.3	4.5	3.7	6.5	1.8	1.7	2.5	0.2	6.5	4.9	1.1	31.0	this study	
9	10.3	3.4	4.8	1.1	3.4	0.2	3.2	1.3	1.5	1.6	0.0	0.1	2.3	4.5	3.7	6.5	1.8	1.7	2.5	0.2	6.5	4.9	1.1	31.0	this study	
10	9.2	3.7	4.9	1.1	3.0	0.2	2.7	1.1	1.4	1.8	0.0	0.1	2.1	4.3	3.3	6.5	1.8	1.5	2.1	0.1	5.8	2.3	1.5	35.0	this study	
11	10.1	3.3	5.0	1.2	3.5	0.2	3.0	1.4	1.7	1.9	0.0	0.1	2.2	4.5	3.5	6.8	1.9	1.6	2.3	0.2	6.4	4.9	1.1	31.0	this study	
12	10.6	3.8	4.7	1.2	3.4	0.2	3.1	1.3	1.2	1.9	0.0	0.1	2.3	4.5	3.7	6.8	2.1	1.8	2.5	0.2	6.4	4.9	2.3	29.6	this study	
13	10.3	3.4	4.6	1.2	3.0	0.2	2.9	1.3	1.4	1.9	0.0	0.1	2.0	4.5	3.3	6.7	1.8	1.5	2.3	0.1	6.1	4.4	1.1	34.4	this study	
14	10.3	3.4	4.7	1.2	3.3	0.1	3.0	1.3	1.6	2.0	0.0	0.1	2.1	4.5	3.6	6.7	1.8	1.7	2.3	0.2	6.5	4.7	2.4	31.5	this study	
15	10.6	3.7	4.7	1.1	3.4	0.2	3.1	1.4	1.4	1.9	0.0	0.1	2.1	4.6	3.6	6.8	2.0	1.8	2.4	0.1	7.2	4.7	1.1	38.8	this study	
16	10.7	3.4	5.1	1.2	3.6	0.2	3.1	1.3	1.4	2.0	0.0	0.1	2.2	4.6	3.6	6.8	2.0	1.8	2.4	0.1	7.2	4.7	1.1	38.8	this study	
17	10.7	3.4	5.2	1.3	3.5	0.2	3.1	1.4	1.3	2.3	0.0	0.1	2.3	5.0	3.8	7.0	2.0	1.8	2.5	0.1	6.6	4.8	0.9	28.6	this study	
18	9.7	3.8	5.2	1.2	3.2	0.2	3.1	1.2	1.4	1.9	0.0	0.1	2.0	4.6	3.4	6.5	1.8	1.6	2.4	0.2	6.3	4.7	2.3	32.0	this study	
19	10.0	3.2	4.5	1.3	3.0	0.1	2.6	1.5	1.0	1.9	0.0	0.1	2.0	4.3	3.2	6.4	1.7	1.5	2.3	0.2	6.0	4.3	2.1	1.0	35.7	this study
20	9.7	3.5	5.0	1.4	3.5	0.2	2.9	1.2	1.8	1.7	0.0	0.1	2.1	4.4	3.4	7.0	1.8	1.5	2.5	0.2	6.3	4.3	2.3	1.0	32.3	this study
21	9.7	3.7	4.9	1.3	3.2	0.2	3.0	1.1	1.5	2.2	0.0	0.1	2.0	4.4	3.7	6.4	1.9	1.7	2.3	0.2	6.7	4.4	2.2	31.9	this study	
22	10.6	3.4	4.8	1.2	3.4	0.1	2.9	1.2	1.4	1.8	0.0	0.1	2.1	4.4	3.4	6.5	1.9	1.7	2.3	0.2	6.7	4.4	2.2	31.9	this study	
23	10.6	3.5	4.9	1.3	3.5	0.2	3.1	1.2	1.5	1.8	0.0	0.1	2.4	4.7	3.7	6.8	1.9	1.9	2.4	0.1	6.7	4.8	2.4	0.4	30.1	this study
24	9.7	3.4	4.7	1.1	3.3	0.1	2.6	1.2	1.7	2.1	0.0	0.1	2.3	4.7	3.8	6.5	1.9	1.6	2.5	0.3	6.0	3.7	2.4	2.5	31.9	this study
25	10.8	3.5	5.7	1.5	3.6	0.1	2.9	1.1	1.1	2.7	0.0	0.1	2.2	4.9	2.6	6.5	1.9	1.8	2.6	0.1	6.2	4.6	2.8	3.0	27.5	this study
26	9.5	3.3	4.9	1.1	3.0	0.2	3.0	1.2	1.2	1.6	0.0	0.1	2.1	4.4	3.3	6.4	1.7	1.6	2.1	0.1	6.1	4.3	1.9	1.4	35.5	this study
27	12.2	3.5	4.6	1.3	3.5	0.1	3.1	1.2	1.0	1.7	0.0	0.1	2.7	5.5	4.1	8.0	2.1	2.1	2.9	0.1	6.8	4.7	2.4	0.2	26.2	this study
28	11.5	3.8	4.8	1.2	3.6	0.1	3.0	1.4	1.3	2.2	0.1	0.1	2.5	4.9	3.3	7.9	2.3	1.8	2.8	0.1	7.1	5.7	2.5	2.5	23.4	this study
29	11.5	3.8	4.8	1.2	3.6	0.1	3.0	1.4	1.3	2.2	0.1	0.1	2.5	4.9	3.3	7.9	2.3	1.8	2.8	0.1	7.1	5.7	2.5	2.5	23.4	this study
30	12.5	4.3	4.7	1.9	4.1	0.1	3.0	1.4	1.3	1.4	0.0	0.1	3.1	5.4	3.6	7.4	1.8	1.7	2.8	0.1	7.1	5.9	2.7	0.7	22.9	this study
31	12.5	3.6	4.4	1.5	3.7	0.1	3.0	1.1	0.8	2.2	0.0	0.0	2.6	3.8	2.8	7.0	1.6	1.6	2.6	0.0	7.6	4.5	0.7	0.8	31.9	this study
32	4.5	4.9	2.4	0.5	3.6	0.2	1.8	2.0	1.0	1.5	0.0	0.0	2.8	5.1	2.1	9.9	2.6	1.4	2.2	0.8	6.2	5.4	4.4	1.5	33.1	[19]
33	7.0	2.9	2.9	1.0	4.7	0.2	3.0	2.6	1.3	3.0	0.0	0.1	2.7	6.6	2.5	4.3	3.6	2.3	2.8	0.4	5.5	6.9	3.9	1.8	27.9	[19]
34	6.7	2.9	2.9	1.0	4.7	0.2	3.0	2.6	1.3	3.0	0.0	0.1	2.7	6.6	2.5	4.3	3.6	2.3	2.8	0.4	5.5	6.9	3.9	1.8	27.9	[19]
35	6.7	2.9	2.9	1.0	4.7	0.2	3.0	2.6	1.3	3.0	0.0	0.1	2.7	6.6	2.5	4.3	3.6	2.3	2.8	0.4	5.5	6.9	3.9	1.8	27.9	[19]
36	6.7	2.9	3.2	1.0	4.4	0.2	2.6	2.3	0.8	2.1	0.0	0.0	2.3	5.9	2.6	4.1	3.3	2.0	2.5	0.3	5.2	3.4	1.5	33.2	this study	
37	8.0	3.4	3.8	1.0	5.7	0.2	2.9	2.4	1.2	3.1	0.0	0.1	2.6	7.5	2.7	3.6	3.7	2.5	3.2	0.4	5.8	6.0	3.8	1.8	24.9	this study
38	7.6	3.2	3.6	1.1	5.0	0.2	3.3	2.2	1.3	2.1	0.0	0.0	2.6	6.6	2.8	4.1	3.8	2.5	2.9	0.4	5.4	6.6	3.9	2.6	26.2	this study
39	7.1	3.1	3.7	1.2	5.3	0.2	3.0	2.1	1.4	2.5	0.0	0.0	2.5	6.3	2.8	4.6	3.6	2.2	2.7	0.4	5.6	6.1	3.6	1.6	28.4	this study
40	7.6	3.2	3.6	1.1	5.0	0.2	3.3	2.2	1.3	2.1	0.0	0.1	2.6	6.6	2.8	4.1	3.8	2.5	2.9	0.4	5.4	6.6	3.9	2.6	26.2	this study
41	7.8	3.5	4.0	1.2	5.8	0.2	3.2	1.9	1.4	2.4	0.0	0.1	2.8	6.7	2.9	3.9	3.2	2.7	3.1	0.4	5.6	5.5	4.1	0.9	28.3	this study
42	7.0	2.8	3.5	1.0	4.9	0.2	2.8	2.5	1.3	2.3	0.0	0.1	2.6	6.8	2.4	4.2	3.3	2.0	2.6	0.4	6.0	5.7	4.0	0.7	31.1	this study
43	6.9	2.6	3.2	1.0	4.5	0.3	2.7	2.3	1.3	2.3	0.0	0.0	2.6	6.5	2.3	4.7	3.2	2.1	2.7	0.3	5.5	5.6	3.4	1.4	32.3	this study
44	13.2	3.7	4.9	1.4	5.3	0.3	3.6	1.3	1.5	1.8	0.0	0.1	3.1	5.5	3.3	9.4	2.3	2.1	2.8	0.0	7.3	5.5	3.2	0.1	18.4	[38]
45	11.9	3.6	4.9	1.4	5.2	0.3	3.5	1.1	1.4	1.9	0.0	0.1	3.2	5.2	3.3	8.9	2.1	2.1	2.7	0.1	7.2	5.2	3.2	0.5	21.0	[38]
46	9.4	3.4	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.2	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
47	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
48	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
49	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
50	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
51	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
52	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
53	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
54	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
55	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9	0.0	0.0	3.0	5.2	2.6	9.3	1.9	1.9	2.2	0.1	4.9	4.9	3.1	1.1	29.5	[37]
56	9.0	3.2	4.3	1.1	4.3	0.1	3.3	1.1	1.3	2.9																

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

6.11 MALDI-UP – an internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra.

User guide for <http://maldi-up.ua-bw.de/>.

Rau, J*. **T. Eisenberg**, A. Männig, C. Wind, P. Lasch, R. Sting

Aspects of food control and animal health (eJournal), 2016(1): 1-17

URL: http://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201601.pdf

(ISSN 2196-3460)

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

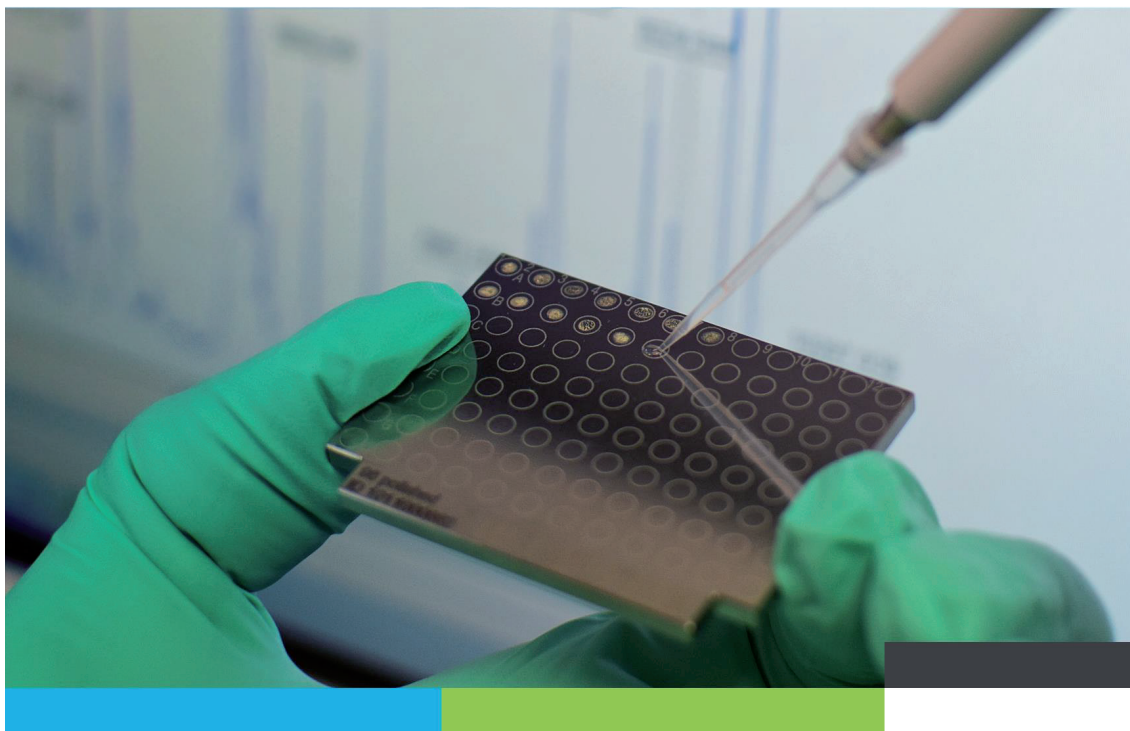
- | | |
|------------------------------|---------------|
| • Initiative | unterstützend |
| • Projektplanung | unterstützend |
| • Durchführung der Versuche | unterstützend |
| • Auswertung der Experimente | wesentlich |
| • Erstellung der Publikation | unterstützend |

This is the original version of an article published in Aspects of food control and animal health (free eJournal; ISSN: 2196-3460).

This version is available online at: http://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201601.pdf

Aspects of food control and animal health

eJournal 01 | 2016 (April) ISSN 2196-3460



MALDI-UP – An Internet Platform for the Exchange of MALDI-TOF Mass Spectra

User guide for <http://maldi-up.ua-bw.de/>

J. Rau, T. Eisenberg, A. Männig, C. Wind, P. Lasch, R. Sting



Baden-Württemberg

MALDI-UP – An Internet Platform for the Exchange of MALDI-TOF Mass Spectra

User guide for <http://maldi-up.ua-bw.de/>

J. Rau¹, T. Eisenberg², A. Männig¹, C. Wind³, P. Lasch⁴, R. Sting¹

¹*Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart
Schaflandstraße 3/2
70736 Fellbach, Germany
Phone: +49 711 3426 1264
Fax: +49 711 588176
Email: joerg.rau@cvuas.bwl.de*

²*Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (Hessian State Laboratory),
Department of Veterinary Medicine, Schubertstraße 60 Haus 13,
35392 Gießen, Germany*

³*Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg,
Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, Germany*

⁴*Robert Koch-Institut, Proteomics and Spectroscopy (ZBS6),
Seestraße 10, 13353 Berlin, Germany*

Keywords:

MALDI-TOF MS, database, contact platform, spectrometry, spectra

Abstract

Recent years have seen substantial progress towards the application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in routine microbiological diagnostics. MALDI-TOF MS-based identification relies on the reproducible detection of large biopolymer mass patterns obtained from proteins of whole cells.

Besides species identification in microbiological diagnostics, MALDI-TOF MS can also be used for protein profiling, to screen for metabolites and

contaminants, for epidemiological traceback, for phenotyping resistance and virulence patterns, or for biomarker detection directly from clinical material to mention only a few of the applications.

The fundamental principle of MALDI-TOF MS-based microbial identification analysis relies on a computer-based comparison of mass spectra recorded from unknown pathogens with databases containing mass spectra from samples with a known taxonomic status. Such databases are commercially available and most of the employed software and database solutions allow creating and including custom, user-specific and transferable database entries. The goal of the present work is to introduce a novel user-to-user internet platform – MALDI-User-Platform (MALDI-UP) – which was specifically designed to facilitate the exchange of information about user-specific database entries. Thereby, diagnostic gaps could be closed efficiently and databases for yet under-reported applications, such as the species identification of animal meat, insects or mushrooms via MALDI-TOF MS, could be promoted.

Introduction

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a powerful analytical tool in food analysis, veterinary and clinical diagnostics. At the present stage the technique is used mainly for the differentiation, classification and identification of bacteria and other microorganisms in several fields of microbiology [Clark et al., 2013; Randall et al, 2015, Singhal et al., 2015, Zimmermann, 2015]. In contrast to classical microbial identification techniques, like biochemical identifications and molecular approaches, MALDI-TOF MS measurements can be carried out within minutes, coupled with the advantage of minimal material costs per identification [Dihman et al., 2011; Tran et al., 2015]. The method is not restricted to bacterial identification, but can also be utilized to determine eukaryotic cells, fungi, algae, protozoans and insects. MALDI-TOF MS was found to be useful even for species identification based on host proteins [Singhal et al., 2015; Barbano et al., 2015; Cassagne et al., 2014].

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



The comparison of experimental mass spectra obtained from unidentified samples (e.g. microorganisms) with reference spectra in a given database results in a ranking list containing the best matching database entries. For this approach, commercial databases use several thousands of spectra from broad microbial fields. The success of identification depends on the quality and the species coverage of the entries included in the used database. Manufacturers place large efforts on extending their databases. However, due to economic reasons, the time between validated manufacturer updates can be long. The systems (consisting of hardware, software and the MS database) employed by most users do not only offer the gradual update of an extensive database supplied by the manufacturer, but also allow for the addition of custom data. Such data can be transferred within the device platform, making it possible to close diagnostic gaps more quickly. In medical and veterinary microbiology, this is particularly relevant for various special microorganisms and highly pathogenic species. Although there is a great demand, until now, there are only a few MALDI-TOF MS database entries available for non-clinical applications, such as the species identification of animal meat or of fish.

The reliable exchange of custom database entries requires that the user who creates the entry (creator) provides certain basic information (metadata) to the user who receives the data (recipient). The recipient is primarily interested in what is being offered and of what quality the entry is: Briefly, this aspect covers the accuracy of species assignment by reference methods, the quality of sample preparation, spectra acquisition, selection, and processing.

Only if this basic information (metadata) is reliable, the recipients will accept such an entry and add it to existing MS databases. Therefore, the recipients must be able to identify the creator of the entry. This can be achieved either through personal contacts, or by means of an open information exchange platform. The online MALDI-UP catalog which is available at <http://maldi-up.ua-bw.de> and which is hosted by the Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS) was specifically designed for this purpose. The catalog lists user-created database entries that are uniformly presented and contains comprehensive metadata information such as detailed taxonomic

information, isolate numbers and sample preparation parameters. Furthermore, the designations of isolates (e.g. molecular identification, biochemical data) as well as technical details of the entries (instrument, cultivation, preparation, etc.) are given. The summary of database entries and the contact information of the creators of the entries are also presented. The MALDI-UP catalog is not intended to provide free downloads of the spectra. This is important because it assures that the protection of copyrights will remain in the hands of the copyrights owners.

Usage of the catalog and description of the procedure to add spectral entries

The MALDI-UP catalog is open to everyone interested in providing information about personal database entries with the option to exchange or distribute spectra under own merchandising criteria. The catalog can be used, subject to the conditions stated on the homepage. It is also a source of information for everyone who wishes to contact spectra creators.

The catalog (in Microsoft Excel) can be downloaded from the MALDI-UP platform and new data entries can be added in the proposed format. Following the submission of personal new data to maldi-up@ua-bw.de, they will be carefully checked and missing information will be requested. Finally, the latest entries will be included in the next update of the catalog. Creators agree to make their contact information publicly available (institutional and email address) and principally agree to respond to data requests. The procedure ensures that the creators themselves control the exchange of information with their colleagues.

The catalog will be continuously updated on a regular basis, at least monthly, and demands a procedure of disclosed parameters for validation. This concept was developed with assistance from employees at CVUA Stuttgart and the Hessian State Laboratory (for comments and suggestions please contact maldi-up@ua-bw.de).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



The MALDI-UP catalog – a detailed description

The following section specifies the information given in the spreadsheets of the MALDI-UP catalog, including relevant column headings.

Spreadsheet Entries – Information fields (Fig. 1)

	A	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
1	MALDI-UP					133 entries		18.03.2016		http://maldi-up-me-user-platform.ua-by.de		CVUA Stuttgart (CVUAS)		Contact: MALDI-UP@ua-by.de					
2	List of available database-entries by users																		
3	Liste verfügbarer Datenbank-Einträge von Anwendern																		
4																			
5	Basic data for the entry					Taxonomic information about the used material							data for the isolate/material Daten zum Isolat / dem Material						
6						Taxonomie													
7	No.	Date	system	user responsible for the row (see contact)		domain	genus	species	subspecies	identifier	isolation source / date / (reference)	isolate tracking	Further details on the isolate / material		spore former	verification of assignment			
8	Nr.	Datum des Listen-eintrags	System	Verantwortlich für die Zeile (s. contact)		Domäne	Genus	Spezies / Art	Unterart	Material / Isolatzbezeichnung	isoliert aus / wann / (Literatur)	Isolat-Historie	weitere Angaben zum Isolat / Material		bildet Sporen	Verifikation der Benennung			
9	FILTER																		
10	0001	22.07.2015	Braker Biologiput LT-microflex	CVUA Stuttgart (CVUAS)		Bacteria	Bacillus	cytotoxicus		CVUAS 2033	potato peris / 2003 / [0001]	isolate CVUAS	Draft genome sequence [0003]		yes	isolate of species description [0001]; resequenced [0005]			
11	0002	22.07.2015	Braker Biologiput LT-microflex	CVUA Stuttgart (CVUAS)		Bacteria	Bacillus	cytotoxicus		NWH 331-30	[0001]	A. Sorokin (MBA, F) -> CVUAS -> DSM 22305	NWH 331-30; DSM 22305		yes	typestrain [0001]			
12	0003	22.07.2015	Braker Biologiput LT-microflex	CVUA Stuttgart (CVUAS)		Bacteria	Flavobacterium	psychrophilum		CVUAS 10309	rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)	isolate CVUAS			no	resequenced			
13	0004	22.07.2015	Braker Biologiput LT-microflex	CVUA Stuttgart (CVUAS)		Eukaryota	Sar	paraf	domesticus	M0001	flesh	CVUAS	pork sock			label; resequenced analysis			

Fig. 1: Screenshot of the first Excel spreadsheet “Entries”, depicting the list of database entries.

In the upper part of the spreadsheet one can find contact information to the editor of the version (defined by the number of entries and the date). There is also a link to the MALDI-UP homepage to get back to the main website. The next rows include the column titles of the table in English and German. The row “FILTER” serves as an Excel filter for each column to facilitate the individual search and adaption of the table after download.

The entries are sorted by a rough taxonomic classification. Following the download of the MALDI-UP catalog, the sorting can be restricted and controlled using the filters.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

The columns of the table were grouped in six sections:

Basic data for the entry					
Taxonomic information about the used material					
Data for the isolate or material					
Technical data for the entry					
Results of an independent sample preparation in routine mode, using the new entry for identification					
Information about the number of users who have tested the entry and the type of feedback (positive/ negative)					

Explanation for every data column:

Basic data for the entry	
No.	Serial number of the database entry
Date	Listing date
System	Mass spectrometry system used
User responsible for the line (see contact)	Institution responsible for the information in this row. The contact information of the creator is given on the spreadsheet "contact".

Taxonomic information about the used material	
Domain	Rough classification in taxonomic criteria up to subspecies-level to facilitate searching and filtering
Phylum	
Class	
Order	
Family	
Genus	
Species	
Subspecies	

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



Data for the isolate/material	
Identifier	Identifier of the isolate, preferably a number of a public strain collection (e.g. DSM, ATCC ...) or an isolate collection number (e.g. of the creators CVUAS 1234)
Isolation source / date / [reference]	Source of the material, literature reference (if available)
Isolate tracking	Known history of the isolate. Isolates should be conserved to allow subsequent verification.
Further details on the isolate	
Spore former	The ability of the isolate to form spores, because of the possible influence on MALDI-TOF MS spectra and preparation requirements.
Verification of assignment	Principle of the verification of the isolate / material (e.g. sequenced, type strain, veterinary post mortem pathology examination)
Results of sequencing	In this field a short version of sequencing results can be provided, which supports the species assignment. Depending on the primer-system used, sequencing results are not always the sequence of the whole target gene (e.g. 16S rDNA, <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i>). The resulting match with the first reliable hit in a genetic sequence database should therefore be given with the number of bases. If available in format: 16S rDNA: 1387bp (96.70% of ref-sequence) > 1[difference bp]/1387 = 99.93% similarity with <i>Flavobacterium psychrophilum</i> JIPO2/86, 100% completeness (11.06.15; EzBioCloud)
Other results for assignment of the isolate	E.g. biochemical data, or specific PCR results, especially important for species decision (if available)
Isolate / material conserved as	Own isolate collection or reference to public strain collection.

Technical data for the entry	
Agar / medium	Agar (e.g. SBA = sheep blood agar) used for cultivation of the microorganism
Kind of medium	Solid / liquid
Cultivation temperature	In degree Celsius
Cultivation time	In hours (h) or days (d)
Cultivation, other conditions	e.g. atmospheric conditions (aerobic, anaerobic)
Sample preparation [reference]	Sample preparation protocol used, with reference if available
Matrix	e.g. HCCA
Creation of the entry according to the manufacturer's specifications by trained personnel	Yes or no
Full name of entry	Full name of the new entry
Date of entry (year/day/month)	Creation date of the new entry

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



Results with the entry	
	Result of an independent sample preparation in routine use
Sample preparation > date of independent spectrum	e.g. direct transfer (DT); date in format day/month/year
Commercial database version	Commercial database version used (e.g. DB 5898)
Result with commercial database version	Result of the independent spectrum identified with the commercial database e.g. Biotyper-format: <i>Staphylococcus aureus</i> (1.782) B: 1.782 is the score value, A/B/C the consistency category of the Genus / Species according to [Anonymous, 2012]
Result with the new entry	Result of the independent spectrum identified with the database including the new entry
Remarks for interpretation	Remarks or information about the interpretation of this entry (e.g. "closely related to <i>Staphylococcus aureus</i> ")

Information about the number of users who have tested the entry and the type of feedback (positive/ negative)	
	Feedback from other users of the entry
Number of known external users of the entry	Number of recipients, with whom the entry has been shared
Number of users who gave feedback about the entry. Green: positive experiences; red: negative experiences	Number of reported experiences for the entry: positive experiences confirm the result found with the new entry; negative experiences fail to confirm the new entry

Spreadsheet Contact (Fig. 2)

The spreadsheet "contact" contains addresses of creators and their institutions, in alphabetical order, who have deposited information on own database entries.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN










MALDI-UP												
1	MALDI-UP											
2	contact address											
3	Kontakte / Ansprechpartner											
4	institution		address			e-mail institution	contact person	e-mail contact person		MALDI-system	institution category	
5	Institution		Adresse			e-mail Institution	Ansprechpartner MALDI	e-mail Ansprechpartner		MALDI-System	Art der Institution	
6	FILTER											
7	CVFR	CVUA Freiburg		Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Dienstgebäude Tierhygiene	Am Moosweiher 2	79108 Freiburg	D	poststelle@cvuaf.bwl.de	Dr. Christine Wind	christine.wind@cvuaf.bwl.de	Bruker Biotyper LT-microflex	Food and veterinary inspection service
8	CVKA	CVUA Karlsruhe		Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe	Weißerburger Str. 3	76187 Karlsruhe	D	poststelle@cvuaka.bwl.de	Dr. med. vet. Franziska Eisenbeiss	franziska.eisenbeiss@cvuaka.bwl.de	Bruker Biotyper LT-microflex	Food and veterinary inspection service
9	CVUAS	CVUA Stuttgart		Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart	Schafandstr. 3/2	70367 Fellbach	D	poststelle@cvuas.bwl.de	Dr. Jörg Rau	joerg.rau@cvuas.bwl.de	Bruker Biotyper LT-microflex	Food and veterinary inspection service
10	LGL	LGL Oberschleißheim		Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit	Veterinärstrasse 2	85764 Oberschleißheim	D	poststelle@lgl.bayern.de	Dr. Ingrid Huber, Dr. Melanie Pavlovic	ingrid.huber@lgl.bayern.de, melanie.pavlovic@lgl.bayern.de	Bruker Biotyper LT-microflex	Food and veterinary and health inspection service
11	LHL	LHL Giessen		Landesbetrieb Hessisches Landeslabor	Schubertstraße 68 - Haus 13	35392 Giessen	D	poststelle@lhl.hessen.de	Dr. Tobias Eisenberg	Tobias.Eisenberg@lhl.hessen.de	Bruker Biotyper LT-microflex	Food and veterinary inspection service
12	RIP	RIPAC-LABOR		RIPAC Labor GmbH	Am Mühlenberg 11	14476 Potsdam - Golm	D		Dr. Marcel Eihard	merhard@ripac-labor.de	VITEK MS Plus (Axiom + SARA/MS)	Private veterinary laboratory
13	RKI	RKI Berlin		Robert Koch-Institut, Center for Biological Threats and Special Pathogens (ZBS) ZBS 6 - Proteomics and Spectroscopy	Nordufer 20	13353 Berlin	D		Dr. Peter Lasch	laschp@rki.de	Bruker Autoflex	Governmental institution

Fig. 2: Screenshot of the second spreadsheet, depicting the list of creators with contact information.

The Row “FILTER” serves as Excel-filter for every column, to facilitate the individual search and adaption of the table after download.

Institution	Name in abbreviated form
	Name in short form
	Logo of the institution
Address	Official name of institution
	Street
	Area code and city
	Country code
E-mail institution	E-mail address of the institute, without one specific recipient
Contact person	Physical person, who works with the MALDI-TOF MS / provides entries
E-mail contact person	Email address of the contact person
MALDI-System	The type of MALDI-TOF MS equipment available
Institution category	Private / Governmental / Inspection service...

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



Spreadsheet References (Fig. 3)

This page summarizes the references used for the identification of certain species. It also refers to the extraction methods used. Sequential numbers are given, followed by a column with the complete citation of the article.

If a new reference is essential for the creator, it should be submitted together with the database entry. The reference number will be edited by the webmaster of the MALDI-UP list.

	A	B	C
1	References		
2			
3	[BRU01]	DT	Bruker Protocol direct transfer, Anonymous, MALDI Biotyper 3.1 User manual Revision 1, 2012 Appendix D2.1
4	[BRU02]	eDT	Bruker Protocol extended direct transfer, Anonymous, MALDI Biotyper 3.1 User manual Revision 1, 2012 Appendix D2.1
5	[BRU03]	extr	Bruker Protocol extraction, Anonymous, MALDI Biotyper 3.1 User manual Revision 1, 2012 Appendix D2.2
6	[BRU04]	Fextr	Bruker Protocol Filamentous-Fungi-Cultivation ProcedureV1.0, Anonymous
7	[0007]	OSextr	Organic solvent extraction for meat
8			
9	[0001]	Guinebretiere et al., 2013	Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A <i>Bacillus cytotoxicus</i> sp. nov. is a new thermotolerant species of the <i>Bacillus cereus</i> group occasionally associated with food poisoning Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013 ; 63: 31-40
10			
11			
12	[0002]	Bertsch et al., 2013	Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Hug MC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L <i>Listeria fleischmannii</i> sp. nov., isolated from cheese Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013 ; 63: 526-532
13			
14			
15	[0003]	DSMZ Catalogue	Anonymous Catalogue of microorganisms. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. DSMZ, Braunschweig, Germany
16			
17			
18	[0004]	Eisenberg et al., 2014	Eisenberg T, Nessler A, Nicklas W, Spamer V, Seeger H, Zschöck M <i>Streptobacillus</i> sp. isolated from a cat with pneumonia Journal of Medical Microbiology Case Reports, 2014 : 1-7. DOI 10.1099/jmmcr.0.000562
19			
20			
21	[0005]	Eisenberg et al., 2015a	Eisenberg T, Glaeser S, Nicklas W, Mauder N, Contzen M, Aledelbi K, Kämpfer P <i>Streptobacillus felis</i> sp. nov., isolated from a cat with pneumonia, and emended descriptions of the genus <i>Streptobacillus</i> and of <i>Streptobacillus moniliformis</i> . Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015 ; 65: 2172-2178. DOI: 10.1099/ijs.0.000238
22			
23			
24	[0006]	Glaeser et al., 2013	Glaeser SP, Galatis H, Martin K, Kämpfer P. <i>Niabella hirudinis</i> and <i>Niabella drilacis</i> sp. nov., isolated from the medicinal leech <i>Hirudo verbana</i> . Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013 ; 63: 3487-3493. DOI 10.1099/ijs.0.050823-0
25			
26			
27	[0007]	Stoll & Rau, 2015	Stoll P, Rau J Tierartendifferenzierung von Fleisch mittels MALDI-TOF MS Poster auf Deutscher Lebensmittelchemikertag Karlsruhe 14.-16.09.2015. Lebensmittelchemie 69: 142.
28			
29			
30	[0008]	Eisenberg et al., 2015b	Eisenberg T, Nicklas W, Mauder N, Rau J, Contzen M, T Semmler, Hofmann N, Aledelbi K, Ewers C Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus <i>Streptobacillus</i> Plos One August 7, 2015 10(8): e0134312. Journal.pone.0134312
31			
32			

Fig. 3: Screenshot of the third spreadsheet, depicting the list of references.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Spreadsheets History (Fig. 4)

This page provides an overview of the history of uploads and the total sum of entries. Additionally, it states the next scheduled update of the list.

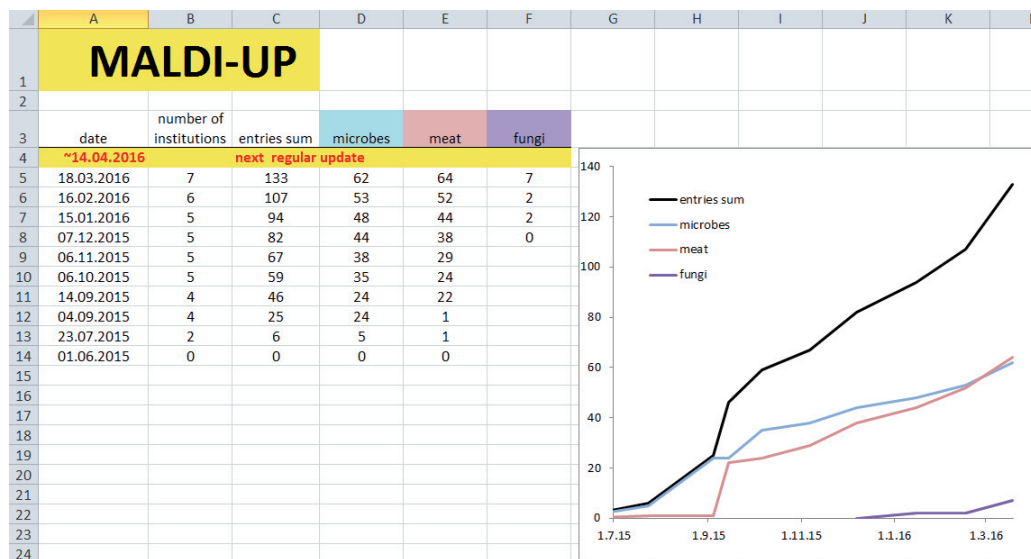


Fig. 4: Screenshot of the fourth spreadsheet, depicting the history of the increase and the material groups of the MALDI-UP entries.

Row 3 contains several columns:

Date	Chronological list of update-dates
Number of institutes	Number of institutes that have provided information about database entries (see page contact)
Entries sum	Total number of entries
Microbes	Number of entries for microorganisms
Meat	Number of entries for meat
Fungi	Number of entries for fungi
	Still open, for other types of entries (e.g. plants, algae etc.)

This sheet also contains a graphic overview of the progression of entries [Fig. 4].

Discussion

Universal use of databases depends on size and quality of data entries. The purpose of the MALDI-User-Platform (MALDI-UP) is to provide MALDI-TOF MS users with an easily accessible possibility to exchange database entries. At the time of writing (March 2016), altogether 133 entries by users of seven institutions have been added to the catalog (Version 133/18.03.2016) since its first release (September 2015). These database entries originate from different mass spectrometers (e.g. Bruker LT microflex and autoflex, and bioMérieux VITEK MS Plus). Furthermore, since the database has been launched in November 2015 the number of downloads has increased continuously (Fig. 4).

This open access catalog does not claim to substitute the manufacturers' continued efforts to provide database extensions. It allows, however, to gain a quick overview on available database entries from users working in the same area of research or diagnostics with special interests, such as animal meat, insects or mushrooms. Furthermore, the contact to colleagues can be easily established, independently of whether the creator is from a research institution, a hospital or an official or private diagnostic laboratory. The interest during the first months is reflected by the number of deposited entries and the growing number of downloads in the last months (Fig. 4, Fig. 5).

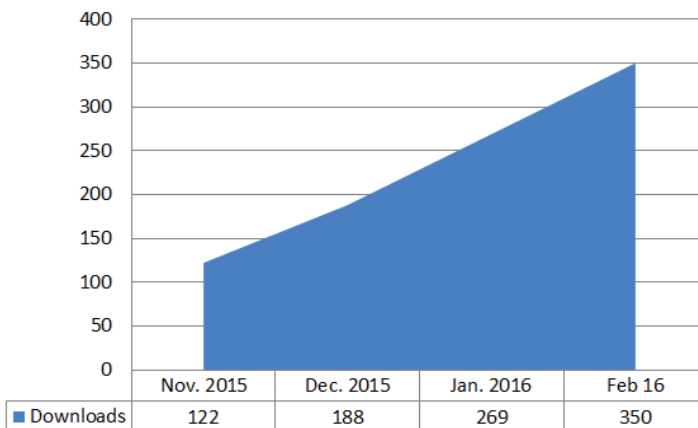


Fig. 5: Downloads of the MALDI-UP file since the launch.

The interest in the catalog and its benefit for the user will increase for both, creators and recipients, as the number of approved data entries increases. Additionally, fruitful collaborations can arise beyond the exchange of database entries alone.

The potential of finding interested creators, capable of offering high-quality entries for exchange, is considered high, for the following reasons:

- the number of marketed MALDI-TOF mass spectrometers increases world-wide (2015 > 2.000),
- a higher level of training of MALDI-users, offered by the manufacturers or other institutions, ensures an increase in knowledge and
- a wide range of research projects deal with MALDI-TOF MS use and validation.

Increasing numbers of catalog entries and database downloads are promising and an incentive to consolidate the MALDI-UP project as a source for current data as a pillar of up-to-date diagnostics. We have already proven that MALDI-TOF MS can be a suitable tool to be integrated in the description of novel species. Therefore, it is increasingly important to quickly provide MS data of newly detected species. This has been common practice for several years for data on taxonomically important genetic sequences. As an example, we refer to the MALDI-UP catalog entries for the recently described bacterial species *Bacillus cytotoxicus* CVUAS 2833 (entry 0001; Guinebretière et al., 2013) and *Listeria fleischmanni* (entry 0006; Bertsch et al., 2013) as well as for the entries of *Streptobacillus (S.) felis* (entry 0013, Eisenberg et al., 2015 a), *S. notomytis* (entry 0119; Eisenberg et al., 2016 a) and *S. ratti* (entry 0120; Eisenberg et al., 2016 b).

Additionally, the database focused on the identification of species of food animals has recently been augmented by spectral data for pork meat (entry 0004; Stoll et al, 2015).

In conclusion, the launch of the MALDI-UP catalog aims to support networking and expansion of the community of MALDI users based on mutual sharing of information.

Acknowledgements

The authors like to thank M. Contzen, E. Hiller (CVUAS), and Andy Schneider (RKI Berlin) for helpful discussions and S. Böttcher (CVUAS) for preparing the MALDI-UP web-page.

References

1. Anonymous (2012). MALDI Biotyper 3.1 User Manual - preparation protocols. Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany.
2. Barbano, D., R. Diaz, L. Zhang, T. Sandrin, H. Gerken, T. Dempster (2015). Rapid Characterization of Microalgae and Microalgae Mixtures Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Vertes A, ed. PLoS ONE. 2015; 10(8):e0135337. doi:10.1371/journal.pone.0135337.
3. Bertsch, D., J. Rau, M.R. Eugster, M.C. Hug, P.A. Lawson, C. Lacroix, L. Meile (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 526–532.
4. Cassagne, C., F. Pralong, F. Jeddi, R. Benikhlef, K. Aoun, A. C. Normand, F. Faraut, P. Bastien, R. Piarroux (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Microbiology and Infection, 20: 551–557. doi: 10.1111/1469-0691.12387.
5. Clark, A. E., E. J. Kaleta, A. Arora, D. M. Wolk (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, 26: 547–603. doi.org/10.1128/CMR.00072-12
6. Dhiman, N., L. Hall, S. L. Wohlfiel, S. P. Buckwalter, N. L. Wengenack (2011). Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. Journal of Clinical Microbiology, 49: 1614–1616. doi.org/10.1128/JCM.02381-10
7. Eisenberg, T., W. Nicklas, N. Mauder, J. Rau, M. Contzen, T. Semmler, N. Hofmann, K. Aledelbi, C. Ewers (2015 a). Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*. PLoS ONE, 2015; 10(8): e0134312. doi:10.1371/journal.pone.0134312.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN



8. Eisenberg T., S.P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, W. Nicklas, J. Rau, N. Mauder, N. Hofmann, K. Imaoka, M. Kimura, P. Kämpfer (2016 a). *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis*) THOMAS, 1922 and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015 Oct 5. doi: 10.1099/ijsem.0.000654. [Epub ahead of print]
9. Eisenberg T., K. Imaoka, M. Kimura, S.P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, J. Rau, W. Nicklas, T. Tanikawa, P. Kämpfer (2016 b). *Streptobacillus ratti* sp. nov. isolated from a black rat (*Rattus rattus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015 Dec 23. doi: 10.1099/ijsem.0.000869. [Epub ahead of print]
10. Guinebretière, M.H., S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. De Sarrau, M.L. De Buyser, G. Lamberet, A. Fagerlund, P.E. Granum, D. Lereclus, P. De Vos, C. Nguyen-The, A. Sorokin (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 31–40.
11. Randall, L.P., F. Lemma, M. Koylass, J. Rogers, R.D. Ayling, D. Worth, M. Klita, A. Steventon, K. Line, P. Wragg, J. Muchowski, M. Kostrezewa, A.M. Whatmore (2015). Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. *Research in Veterinary Science*, 101: 42–49.
12. Singhal, N., M. Kumar, P. K. Kanaujia, J.S. Virdi (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6: 791. doi:10.3389/fmicb.2015.00791.
13. Stoll, P., Rau, J. (2015). Tierartendifferenzierung von Fleisch mittels MALDI-TOF MS. Poster. 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag Karlsruhe 14.–19.09.2015 [GERMAN]. *Lebensmittelchemie*, 69: 142.
14. Tran, A., K. Alby , A. Kerr , M. Jones, P.H. Gilligan (2015). Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 53: 2473–2479. doi: 10.1128/JCM.00833-15. Epub 2015 May 20.
15. Zimmermann, S. (2015). *Maldi-ToF*. In: *Modern techniques for pathogen detection*, eds. Popp, J., M. Bauer. Wiley Blackwell, Weinheim, Germany. Pages 221–254.

Impressum / Editorial Board

Aspects of food control and animal health

Free eJournal

ISSN: 2196-3460

Volume 2016 Issue 01

Published April 2016

Publisher:

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart
70702 Fellbach
Postfach 12 06
GERMANY

Phone: +49 711 3426 1234

Email: Poststelle@cvuas.bwl.de

Internet: www.cvuas.de

Images:

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart

V.i.S.d.P: Maria Roth

Editor in Chief and Layout: Stefan Böttcher

Corporate Design: Maja Lindemann



License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 6.12 Acute tetraplegia caused by rat bite fever in snake keeper and transmission of *Streptobacillus moniliformis*.

Eisenberg T., S. Poignant, Y. Jouan, A. Fawzy, W. Nicklas, C. Ewers, L. Mereghetti, A. Guillon*

Emerging Infectious Diseases, 2017 Apr; 23(4): 719-721.

<http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>

* korrespondierender Autor

Eigener Anteil in der Publikation:

- Initiative wesentlich
- Projektplanung wesentlich
- Durchführung der Versuche beratend
- Auswertung der Experimente wesentlich
- Erstellung der Publikation wesentlich

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in Emerging Infectious Diseases.
The final authenticated version is available online at: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1 Submitted: 12/10/2016
2 Accepted: 1/16/2017
3 DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>
4 16-1987 Research Letter
5 Tables: 0
6 Figures: 1
7 Technical Appendix: 1
8 TOC title: Acute Tetraplegia Caused by Rat Bite Fever in Snake Keeper and Transmission of
9 *Streptobacillus moniliformis*
10 Running head: Acute Tetraplegia Caused by Rat Bite Fever in Snake Keeper and Transmission
11 of *Streptobacillus moniliformis*
12 Keywords: acute tetraplegia, rat bite fever, snake keeper, transmission, Streptobacillus
13 moniliformis, bacteria, zoonoses, variable number tandem repeat analysis, multilocus variant
14 analysis, snakes, reptiles, rats, PCR, species specificity, France
15 *Suggested citation for this article:* Eisenberg T, Poignant S, Jouan Y, Fawzy A, Nicklas W,
16 Ewers C, et al. Acute tetraplegia caused by rat bite fever in snake keeper and transmission of
17 *Streptobacillus moniliformis*. Emerg Infect Dis. 2017 Apr [date cited].
18 <http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>

19 Acute Tetraplegia Caused by Rat Bite Fever 20 in Snake Keeper and Transmission of 21 *Streptobacillus moniliformis*

22 **[Q1. Title has been edited for brevity and EID style. Subtitles and sentences are not used.**
23 **Titles must be as general (common language) as possible. OK?]**

24 Tobias Eisenberg,¹ Simon Poignant,¹ Youenn Jouan, Ahmad Fawzy, Werner Nicklas, Christa
25 Ewers, Laurent Mereghetti, Antoine Guillon

26 Author Affiliations: Hessian State Laboratory, Giessen,
27 Germany (T. Eisenberg, A. Fawzy); Centre Hospitalier

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1 Universitaire de Tours, Tours, France (S. Poignant, Y. Jouan,
2 A. Guillon); Université François Rabelais, Tours (Y. Jouan, L.
3 Mereghetti, A. Guillon); Cairo University, Cairo, Egypt (A.
4 Fawzy); Justus-Liebig-University, Giessen (A. Fawzy, C.
5 Ewers); German Cancer Research Center, Heidelberg,
6 Germany (W. Nicklas); Centre Hospitalier Régional
7 Universitaire de Tours, Tours (L. Mereghetti) [Q2. Journal
8 style is to list main affiliations only. We do not list
9 departments, etc. Affiliations correct?]

10 ¹These authors contributed equally to this article.

11 We report acute tetraplegia caused by rat bite fever in a 59-year old man (snake keeper) and
12 transmission of *Streptobacillus moniliformis*. We found an identical characteristic bacterial pattern in
13 rat and human samples, which validated genotyping-based evidence for infection with the same
14 strain, and identified diagnostic difficulties concerning infection with this microorganism.

15 Human infections by *Streptobacillus moniliformis* are assumed to be caused by rats on the
16 basis of epidemiologic information. We provide genotyping-based evidence for infection with the
17 same bacterial strain in rat and human samples. We highlight diagnostic difficulties concerning
18 this microorganism and its potential for life-threatening consequences.

19 A 59-year old man was admitted to Centre Hospitalier Universitaire de Tours (Tours,
20 France) because he was unable to stand and had acute progressive onset of dyspnea and a 15-day
21 history of fever and arthralgia (left knee, right wrist) but no signs of rash. He was sedated,
22 mechanically ventilated, and admitted to the intensive care unit. The patient had a temperature of
23 39°C, a pulse rate of 63 beats/min, and a blood pressure of 126/68 mm Hg.

24 After discontinuation of sedation, physical examination showed cervical pain, flaccid
25 tetraplegia, and sensitivity at the T4 level. His knees and left wrist were swollen and had joint
26 effusions. There was little available information for the patient because he could not speak and
27 had no known social contacts. Blood tests showed an increased leukocyte count ($15 \times$
28 10^9 /cells/L), predominantly neutrophils, and an increased C-reactive protein level (125 mg/L).

29 The patient was given antimicrobial drugs (amoxicillin and cloxacillin) after blood and
30 synovia (knee) sampling. Cervical magnetic resonance imaging showed C5–T1 vertebral
31 osteomyelitis and an epidural abscess with consecutive compression of the spinal cord (C5–T1).

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1 Surgical spinal decompression and vertebral stabilization were not attempted because of
2 extensiveness of injury and flaccid tetraplegia. Transthoracic and transesophageal
3 echocardiograms showed no features of endocarditis. Blood cultures showed negative results.
4 Joint effusions contained a culture-negative inflammatory liquid and uric acid crystals. The
5 patient was given a tracheotomy and continuously ventilated.

6 A final diagnosis was obtained by sequencing the 16S rRNA gene obtained directly from
7 synovia. An 897-nt partial 16S rRNA sequence showed 99.0% identity with sequences of *S.*
8 *moniliformis* (GenBank accession nos. JQ087393 and CP001779).

9 The patient was a snake keeper who breed rats for snake food. He reported snake bites but
10 not rat bites. We sampled his snakes (*Boa constrictor* and *Elaphe* sp.) and 1 of his feeder rats
11 (*Rattus norvegicus*) by obtaining swab and biopsy specimens from oral cavities of all animals.
12 All cultures were polymicrobial. We used desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry
13 (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) to identify isolated bacteria, but failed to identify *S.*
14 *moniliformis*.

15 Synovia and serum samples from the patient and oral swab and biopsy specimens from
16 animals were subjected to three 16S rRNA gene–based PCRs that were genus specific, rather
17 than *S. moniliformis* specific (1). Synovia from the patient and 2 swab and 2 biopsy specimens
18 from the same rat, but none of the oral samples from snakes, were positive. This result suggested
19 rat bite fever. However, diagnosis of rat bite fever on the basis of partial 16S rRNA gene
20 sequencing might be uncertain (1).

21 We tested the same samples by using *S. moniliformis*–specific multilocus variant analysis
22 (MLVA) (2) to identify the bacterial transmission chain. MLVA results were consistent with
23 those for PCR and identified 2 MLVA genotypes of *S. moniliformis* in rat oral samples.
24 Conversely, genomic information obtained for human synovia showed only 1 of these patterns,
25 indicating a clonal relationship with 1 of the rat bacterial strains. Serum from the patient, which
26 was obtained on day 1 after hospitalization, contained antibodies against *S. moniliformis* when
27 tested by bead-based multiplex serologic analysis and indirect immunofluorescence.

28 Rat bite fever is an underdiagnosed worldwide zoonosis that is closely associated with
29 bites of rats or close contact with them. Snakes that eat rats might serve, at least temporarily, as
30 reservoirs for human infection. Thus, we attempted to detect the rat bite fever organism in oral

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1 and biopsy specimens from the patient's snakes by using different PCRs (including a quantitative
2 CR that has a sensitivity of 10 DNA molecules). All results were negative.

3 Four studies reported rat bite fever associated with keeping reptiles, but definitive
4 transmission could not be proven in these instances, in which infections seemed more likely to be
5 introduced by feeder rats (3–6). Regular contact with prey rats might be a general risk factor, and
6 being bitten by a snake shortly after it fed on a prey rat might have the same consequences as a
7 rat bite. In our study, we identified and typed the involved clone by using a recently developed,
8 species- specific, culture-independent MLVA scheme ([http://microbesgenotyping.i2bc.paris-](http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public)
9 [saclay.fr/databases/public](http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/public)).

10 We showed that a rat might be simultaneously colonized by >1 clone of *S. moniliformis*
11 and demonstrated identical strains in the human patient and the reservoir host (online Technical
12 Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/23/4/16-1987-Techapp1.pdf>). The
13 infectious genotype has been designated as LHL18 on the basis of the novel allele combination
14 17-3-16.

15 Human infections with *S. moniliformis* have been assumed to be caused by a rat bite or
16 close contact with rats on the basis of epidemiologic information. We demonstrated the presence
17 of an identical characteristic bacterial pattern in rat and human samples, which validated
18 genotyping-based evidence for infection with the same strain. Our case highlights diagnostic
19 difficulties concerning this microorganism and supports tropism of this bacteria for synovial
20 tissue and its potential for life-threatening consequences.

21 **Acknowledgments**

22 We thank the patient for providing written permission to publish this report; Kathkeen Gaillot and Isabelle
23 Griffoul for help in interpreting magnetic resonance imaging results; and Chrystophe Aubert and Elodie
24 Theyssandier for handling snakes.

25 G.I. was supported by the Ente Cassa di Risparmio di Firenze (grant no. 2014.0923). **[Q3. There is no**
26 **co-author of this paper whose initials are G.I. Please clarify and modify as needed.]**

27 S.P., Y.J., and A.G. provided care for the patient; T.E., A.F., W.N., C.E., and L.M. performed the
28 microbiological analyses; and T.E., S.P., and A.G. wrote the report.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1 Dr. Eisenberg is a veterinary specialist in microbiology and team supervisor of the bacteriology department,
2 Hessian State Laboratory, Giessen, Germany. His primary research interests are rat bite fever, other infectious
3 diseases in zoo animals and wildlife, and zoonoses.

4 References

- 5 <jrn>1. Eisenberg T, Ewers C, Rau J, Akimkin V, Nicklas W. Approved and novel strategies in
6 diagnostics of rat bite fever and other *Streptobacillus* infections in humans and animals.
7 Virulence. 2016;7:630–48. PubMed <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1177694></jrn>
- 8 <jrn>2. Eisenberg T, Fawzy A, Nicklas W, Semmler T, Ewers C. Phylogenetic and comparative genomics
9 of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for
10 *Streptobacillus moniliformis*. BMC Genomics. 2016;17:864. PubMed
11 <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-3206-0></jrn>
- 12 <jrn>3. Dendle C, Woolley IJ, Korman TM. Rat-bite fever septic arthritis: illustrative case and literature
13 review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25:791–7. PubMed
14 <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0224-x></jrn>
- 15 <jrn>4. Gilroy SA, Khan MU. Rat bite fever: case report and review of the literature. Infectious Diseases
16 in Clinical Practice. 2002;11:403–5. <http://dx.doi.org/10.1097/00019048-200209000-00007></jrn>
- 17 <jrn>5. Irvine L, Wills T. *Streptobacillus moniliformis*: a mouse trying to become a rat. Clinical
18 Microbiology Newsletter. 2006;28:118–20.
19 <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2006.07.002></jrn>
- 20 <jrn>6. Trigo-Daporta M, Cortizo-Vidal S, Pallarés-González Á, García-Campello M. Fever and rash in
21 the owner of exotic pets [in Spanish]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:311–2. PubMed
22 <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2010.07.019></jrn>

23 Address for correspondence: Antoine Guillon, Centre Hospitalier Regional Universitaire de Tours, 2 Blvd
24 Tonnelle, Tours 37044, France; email: antoine.guillon@univ-tours.fr

25

26 **Figure.** Fat-saturated, contrast-enhanced T1-weighted magnetic resonance image of the spine of a 59-
27 year-old man (snake keeper) with rat bite fever. Sagittal view of the cervical spine shows spondylodiscitis
28 (*) and an epidural abscess with C5–T1 compression (brace). Preexisting spinal degeneration was
29 observed and was probably a promoting factor for spinal compression. [Author: the Figure is OK.

30 **We can make any required changes in it.]**

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Figure 1. Eisenberg T, *et al.*

Emerging Infectious Diseases

Page 8 of 10



ScholarOne support: (434) 964-4100

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter

1

2 **Technical Appendix.** Additional information on acute tetraplegia caused by rat bite fever in
3 snake keeper and transmission of *Streptobacillus moniliformis*.

6. VORGELEGTE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publisher: CDC; Journal: Emerging Infectious Diseases
Article Type: Research Letter; Volume: 23; Issue: 4; Year: 2017; Article ID: 16-1987
DOI: 10.3201/eid2304.161987; TOC Head: Research Letter
Article DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2304.161987>

Acute Tetraplegia Caused by Rat Bite Fever in Snake Keeper and Transmission of *Streptobacillus moniliformis*

Technical Appendix.

Technical Appendix Figure. A) Results for *Streptobacillus moniliformis*-specific multilocus variant analysis (MLVA) for a snake keeper with acute tetraplegia caused by rat bite fever. Chromatograms show sequencing results for variable number tandem repeat (VNTR) Sm1 locus amplified from 2 different rat oral samples. A: 16.7 (17) copies of the 3-nt repeat (TTA) (identical to the locus amplified from the human sample). B: 6.7 (7) copies of the same repeat. B) Maximum-likelihood tree showing phylogenetic position of *S. moniliformis* in the family *Leptotrichiaceae* on the basis of 16S rRNA gene sequences. Closely related species (>98% sequence homology) are shown in the box. The tree was generated by using MEGA version 5.2.2 (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura-Nei model, gamma distribution plus invariant sites) and is based on 1,572 nt, GenBank accession numbers are indicated in brackets. Numbers at the branch nodes indicate bootstrap values >70% (100 replicates). Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T was used as the outgroup.

[Author: the Technical Appendix Figure is OK. We can make any required changes in it.]

7. ZUSAMMENFASSUNG

7. ZUSAMMENFASSUNG

Streptobacillus (S.) moniliformis ist einer der beiden ätiologischen Erreger der Zoonose Rattenbissfieber. Die Gattung beinhaltete fast 90 Jahre lang nur diese eine Spezies, erst 2014 wurde mit *S. hongkongensis* ein zweiter Vertreter beschrieben. Obwohl Rattenbissfieber weltweit auftritt, die Infektion lebensbedrohliche Komplikationen hervorrufen kann und die Kolonisierungsrate wilder Ratten bei über 90% liegen kann, gilt die Infektion als unter-diagnostiziert. Die Ursachen liegen vor allem in der schwierigen Anzucht des Erregers, den anfangs bisweilen unspezifischen Krankheitssymptomen, einer hohen Empfindlichkeit des Erregers gegenüber antimikrobiellen Substanzen und einer selbst unter medizinischem Fachpersonal mangelnden Kenntnis dieser Infektionskrankheit. Die Grundlage für die Untersuchungen dieser Arbeit bildete ein atypisches Isolat aus einer Katze, welches erste Zweifel an der monotypischen Stellung von *S. moniliformis* aufkommen ließ. Die in der Folge durchgeführten Untersuchungen führten letztlich zum Aufbau einer Stammsammlung und zur Neubeschreibung von *S. felis*. Unter den weltweit akquirierten Isolaten fanden sich weitere Kandidaten für neue Erreger, sodass die Gattung *Streptobacillus* mit den gleichfalls neu beschriebenen *S. notomytis* und *S. rattii* mittlerweile fünf Spezies beinhaltet. Zwei weitere Erreger, welche von Meerschweinchen und Lachsen beschrieben und historisch in die Verwandtschaft von *S. moniliformis* gestellt worden waren, wurden ebenfalls als neue Spezies erkannt. Mit *Caviibacter abscessus* und *Oceanivirga salmonicida* wurden diese jedoch in eigenständige neue Gattungen gestellt, wodurch die Familie *Leptotrichiaceae* nunmehr aus sechs Gattungen besteht. Neben der phylogenetischen Untersuchung fand eine phänotypische und genotypische Charakterisierung sämtlicher, im Rahmen dieser Arbeit gesammelter Stämme und Isolate statt, um einerseits die Diagnostik dieser selten isolierten Mikroorganismen zu optimieren und andererseits erstmals eine phylogenetische und komparative Analyse zu ermöglichen. Mittels *next generation sequencing* wurden ferner sämtliche Genome der Stämme vollständig sequenziert. Obwohl die phänotypischen Untersuchungen und auch die isolierten Betrachtungen einzelner funktioneller Gene kaum innerartliche Unterschiede zwischen den Isolaten aufdecken konnten, ergaben sich aus der Genomanalyse Hinweise auf deutliche Devianzen und einen geringen

7. ZUSAMMENFASSUNG

Verwandtschaftsgrad zwischen den untersuchten Stämmen. Es fanden sich erstmals zumindest bei einigen der untersuchten Stämme molekulare Hinweise auf putative Virulenz-assoziierte Gene aus den Sub-Kategorien „Resistenz gegenüber Antibiotika und toxischen Komponenten“ sowie „Invasion und intrazelluläre Abwehr“ und ein Typ V-Sekretionssystem, deren Link mit den entsprechenden Phänotypen zukünftig weiter vertieft werden soll. Es gelang ferner mit Hilfe von drei *Tandem-Repeat*-Loki, ein Kultur-unabhängiges Typisierungsverfahren zu entwickeln, womit Stämme von *S. moniliformis* speziesspezifisch und mit hohem diskriminatorischem Potential typisiert werden können. Damit lassen sich zukünftig erstmals epidemiologische Daten für diese Spezies generieren und auf diese Weise ein „realeres“ Verständnis zum Auftreten bestimmter Infektionsstämmen im Rahmen von Transmissionsketten erzielen.

8. SUMMARY

8. SUMMARY

Streptobacillus (S.) moniliformis is one of the two causative microorganisms of the bacterial zoonosis rat bite fever. The genus contained for almost 90 years only this one type species, but in 2014 a second species, *S. hongkongensis*, has been described. Although rat bite fever has a worldwide distribution, infections may pose the harm of life-threatening complications and wild rats are in up to over 90% regularly colonised with *S. moniliformis*, this infection is supposed to be under-diagnosed. Reasons for that can be found in difficulties in culturing this fastidious organism as well as in non-specific initial clinical symptoms, a high susceptibility towards antimicrobial substances and a lack of knowledge of this infectious disease even in healthcare professionals. An untypical isolate from a cat formed the basis for this study, in that it did rise doubt concerning the monotypic position of *S. moniliformis*. The following investigations facilitated the setup of an isolate collection and the description of *S. felis* as a novel species. Further candidate species could be detected among the worldwide acquired strains and isolates. Despite their very high 16S rRNA gene similarities these strains unequivocally proved to represent independent species, that were named according to their sources of origin. With *S. notomytis* and *S. ratti* the genus *Streptobacillus* now contains five species. Furthermore, two additional *S. moniliformis*-like organisms that have been previously reported from guinea pigs and salmons were also found to represent novel members of the family *Leptotrichiaceae*. Based on remarkable differences, separate genera were proposed for these latter taxa that were described as *Caviibacter abscessus* and *Oceanivirga salmonicida*. Consequently, the family *Leptotrichiaceae* now contains six genera. To further optimize diagnostics with these rarely isolated microorganisms a thorough evaluation based on phenotypical and genotypical properties has been carried out with all isolates. Beyond, a phylogenetic and comparative analysis was conducted for the first time involving such a profound spatio-temporal collection of members from the family *Leptotrichiaceae*. Using next generation sequencing, every isolate was subjected to whole genome sequencing. Based on phenotype and sequencing of selected functional genes there seemed to be a very 'homogenous' population among *S. moniliformis* isolates under study. Nevertheless, genome evaluations pointed towards a remarkable heterogeneity and

8. SUMMARY

only few relationships between isolates. For the first time, an evaluation of respective genomes fostered evidence for the existence of virulence associated genes from sub-categories “resistance to antibiotics and toxic compounds” and „invasion and intracellular resistance“ as well as a type V secretion system in at least some of the investigated strains. Further studies are planned to deepen these findings and to identify deduced virulence phenotypes. Based on three tandem repeat loci it was possible to develop a culture-independent, species-specific scheme for *S. moniliformis* in order to type this pathogen with high discriminatory power. This might help to generate epidemiological data for the first time to facilitate a more sophisticated view and detection of certain infectious clusters during transmission chains.

9. LITERATURVERZEICHNIS

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abadeer, M. N., P. C. Kouretas, R. K. Woods (2016): Rat bite fever: Complex triple valve surgery for endocarditis and sinus of Valsalva fistula. – J Thorac Cardiovasc Surg.
2. Abudayyeh, O. O., J. S. Gootenberg, S. Konermann, J. Joung, I. M. Slaymaker, D. B. Cox, S. Shmakov, K. S. Makarova, E. Semenova, L. Minakhin, K. Severinov, A. Regev, E. S. Lander, E. V. Koonin, F. Zhang (2016): C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. – Science, 353(6299): aaf5573.
3. Achtman, M., G. Morelli, P. Zhu, T. Wirth, I. Diehl, B. Kusecek, A. J. Vogler, D. M. Wagner, C. J. Allender, W. R. Easterday, V. Chenal-Francisque, P. Worsham, N. R. Thomson, J. Parkhill, L. E. Lindler, E. Carniel, P. Keim (2004): Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. – Proc Natl Acad Sci USA, 101(51): 17837-17842.
4. Addidle, M., J. Pynn, K. Grimwade, M. Giola (2012): Epidural abscess caused by *Streptobacillus moniliformis*. – J Clin Microbiol, 50(9): 3122-3124.
5. Aldred, P., A. C. Hill, C. Young (1974): The isolation of *Streptobacillus moniliformis* from cervical abscesses of guinea-pigs. – Lab Anim, 8(3): 275-277.
6. Anderson, L. C., S. L. Leary, P. J. Manning (1983): Rat-bite fever in animal research laboratory personnel. – Lab Anim Sci, 33(3): 292-294.
7. Andre, J. M., A. M. Freydiere, Y. Benito, A. Rousson, S. Lansiaux, A. Kodjo, C. Mazzocchi, J. C. Berthier, F. Vandenesch, D. Floret (2005): Rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis* in a child: human infection and rat carriage diagnosed by PCR. – J Clin Pathol, 58(11): 1215-1216.
8. Anglada, A., L. Comas, J. M. Euras, R. Sanmarti, J. Vilaro, J. Brugues (1990): Arthritis caused by *Streptobacillus moniliformis*: a case of fever induced by a rat bite [in Spanish]. – Med Clin (Barc), 94(14): 535-537.
9. Anonym, *Urban pest management*. 1980, Committee on Urban Pest Management: Washington.
10. Anonym (1998): From the Centers for Disease Control and Prevention. Rat-bite fever - New Mexico, 1996. – Jama, 279(10): 740-741.

9. LITERATURVERZEICHNIS

11. Anonym. *Culture Collection, University of Göteborg, Sweden (CCUG) 2006* [cited 2016 04.01.]; Available from: http://www.ccug.se/default.cfm?page=search_record.cfm&ccugno=52889%20A.
12. Antiabong, J. F., A. S. Ball, M. H. Brown (2015): The effects of iron limitation and cell density on prokaryotic metabolism and gene expression: Excerpts from *Fusobacterium necrophorum* strain 774 (sheep isolate). – *Gene*, 563(1): 94-102.
13. Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G. J. Olsen, R. Olson, A. L. Osterman, R. A. Overbeek, L. K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G. D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, O. Zagnitko (2008): The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. – *BMC Genomics*, 9: 75.
14. Bacci, G., P. Paganin, L. Lopez, C. Vanni, C. Dalmastrì, C. Cantale, L. Daddiego, G. Perrotta, D. Dolce, P. Morelli, V. Tuccio, A. De Alessandri, E. V. Fiscarelli, G. Taccetti, V. Lucidi, A. Bevivino, A. Mengoni (2016): Pyrosequencing unveils cystic fibrosis lung microbiome differences associated with a severe lung function decline. – *PLoS One*, 11(6): e0156807.
15. Bachy, B., P. Bemer, L. Tortellier, C. Giraudeau, A. Reynaud, S. Corvec (2011): Septic arthritis due to a *Sneathia* species most closely related to *Sneathia sanguinegens*. – *J Med Microbiol*, 60(Pt 11): 1693-1696.
16. Banerjee, P., Z. Ali, D. R. Fowler (2011): Rat bite fever, a fatal case of *Streptobacillus moniliformis* infection in a 14-month-old boy. – *J Forensic Sci*, 56(2): 531-533.
17. Bemis, D. A., B. H. Johnson, M. J. Bryant, R. D. Jones, B. V. McCleery, C. B. Greenacre, V. Perreten, S. A. Kania (2016): Isolation and identification of *Caviibacter abscessus* from cervical abscesses in a series of pet guinea pigs (*Cavia porcellus*). – *J Vet Diagn Invest*, 28(6): 763-769.
18. Berger, C., M. Altwegg, A. Meyer, D. Nadal (2001): Broad range polymerase chain reaction for diagnosis of rat-bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. – *Pediatr Infect Dis J*, 20(12): 1181-1182.

9. LITERATURVERZEICHNIS

19. Bhally, H. S., C. Lema, M. Romagnoli, A. Borek, T. Wakefield, K. C. Carroll (2005): *Leptotrichia buccalis* bacteremia in two patients with acute myelogenous leukemia. – *Anaerobe*, 11(6): 350-353.
20. Bierne, H., P. Cossart (2007): *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. – *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(2): 377-397.
21. Bik, E. M., E. K. Costello, A. D. Switzer, B. J. Callahan, S. P. Holmes, R. S. Wells, K. P. Carlin, E. D. Jensen, S. Venn-Watson, D. A. Relman (2016): Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. – *Nat Commun*, 7: 10516.
22. Bittinger, K., E. S. Charlson, E. Loy, D. J. Shirley, A. R. Haas, A. Laughlin, Y. Yi, G. D. Wu, J. D. Lewis, I. Frank, E. Cantu, J. M. Diamond, J. D. Christie, R. G. Collman, F. D. Bushman (2014): Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing. – *Genome Biol*, 15(10): 487.
23. Bleich, A., W. Nicklas (2008): Zoonosen bei Maus und Ratte als Labor- und Heimtiere. – *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 121(7-8): 241-255.
24. Boolchandani, M., S. Patel, G. Dantas (2017): Functional metagenomics to study antibiotic resistance. – *Methods Mol Biol*, 1520: 307-329.
25. Boot, R., R. H. Bakker, H. Thuis, J. L. Veenema, H. De Hoog (1993): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring rodent colonies for *Streptobacillus moniliformis* antibodies. – *Lab Anim*, 27(4): 350-357.
26. Boot, R., A. Oosterhuis, H. C. Thuis (2002): PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. – *Lab Anim*, 36(2): 200-208.
27. Boot, R., L. Van de Berg, M. J. Vlemminx (2006): Detection of antibodies to *Streptobacillus moniliformis* in rats by an immunoblot procedure. – *Lab Anim*, 40(4): 447-455.
28. Boot, R., L. Van de Berg, M. A. Koedam, J. L. Veenema, M. J. Vlemminx (2007): Resistance to infection of guinea pigs with a rat *Streptobacillus moniliformis*. – *Scand J Lab Anim Sci*, 34(1): 1-5.
29. Boot, R., L. Van de Berg, F. A. Reubsaet, M. J. Vlemminx (2008): Positive *Streptobacillus moniliformis* PCR in guinea pigs likely due to *Leptotrichia* spp. – *Vet Microbiol*, 128(3-4): 395-399.
30. Boyer, C. I. J., D. W. Bruner, J. A. Brown (1958): A *Streptobacillus*, the cause of tendon-sheath infection in turkeys. – *Avian Dis*, 2: 418-427.

9. LITERATURVERZEICHNIS

31. Bregman, B., S. Slavinski (2012): Using emergency department data to conduct dog and animal bite surveillance in New York City, 2003-2006. – Public Health Rep, 127(2): 195-201.
32. Bricker, B. J., D. R. Ewalt, S. M. Halling (2003): Brucella 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). – BMC Microbiol, 3: 15.
33. Brondz, I., I. Olsen (1986): Microbial chemotaxonomy. Chromatography, electrophoresis and relevant profiling techniques. – J Chromatogr, 379: 367-411.
34. Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, H. F. Noller (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. – Proc Natl Acad Sci USA, 75(10): 4801-4805.
35. Brown, T. M. P., J. C. Nunemaker (1942): Rat-bite fever. A review of the American cases with reevaluation of etiology; report of cases. – Bulletin Johns Hopkins Hospital (70): 201-236.
36. Bukowski, M., A. Rojowska, B. Wladyka (2011): Prokaryotic toxin-antitoxin systems - the role in bacterial physiology and application in molecular biology. – Acta Biochim Pol, 58(1): 1-9.
37. Busse, H. J., E. B. Denner, W. Lubitz (1996): Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. – J Biotechnol, 47(1): 3-38.
38. Cardinali-Rezende, J., J. C. Araujo, P. G. Almeida, C. A. Chernicharo, J. L. Sanz, E. Chartone-Souza, A. M. Nascimento (2013): Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. – Antonie Van Leeuwenhoek, 104(6): 993-1003.
39. Chaves-Moreno, D., I. Plumeier, S. Kahl, B. Krismer, A. Peschel, A. P. Oxley, R. Jauregui, D. H. Pieper (2015): The microbial community structure of the cotton rat nose. – Environ Microbiol Rep.
40. Chen, P. L., N. Y. Lee, J. J. Yan, Y. J. Yang, H. M. Chen, C. M. Chang, H. C. Lee, N. Y. Ko, C. H. Lai, W. C. Ko (2007): Prosthetic valve endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis*: a case of rat bite fever. – J Clin Microbiol, 45(9): 3125-3126.

9. LITERATURVERZEICHNIS

41. Chung, S. L., S. J. Hwang, S. B. Kwon, D. W. Kim, J. B. Jun, B. K. Cho (1998): Outbreak of rat mite dermatitis in medical students. – *Int J Dermatol*, 37(8): 591-594.
42. Ciammaruconi, A., S. Grassi, G. Faggioni, R. De Santis, V. Pittiglio, R. D'Amelio, G. Vergnaud, F. Lista (2009): A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. – *Diagn Microbiol Infect Dis*, 65(1): 7-13.
43. Clausen, C. (1987): Septic arthritis due to *Streptobacillus moniliformis*. – *Clin Microbiol Newsl*, 9: 123-124.
44. Cohen, R. L., R. G. Wittler, J. E. Faber (1968): Modified biochemical tests for characterization of L-phase variants of bacteria. – *Appl Microbiol*, 16(11): 1655-1662.
45. Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, J. M. Tiedje (2014): Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. – *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue): D633-642.
46. Collins, M. D., H. N. Shah (1986): Reclassification of *Bacteroides termitidis* Sebald (Holdeman and Moore) in a new genus *Sebaldella*, as *Sebaldella termitidis* comb. nov. – *Int J Syst Bacteriol*, 36: 349-350.
47. Collins, M. D., L. Hoyles, E. Tornqvist, R. von Essen, E. Falsen (2001): Characterization of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*": description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. – *Syst Appl Microbiol*, 24(3): 358-361.
48. Conrads, G., M. C. Claros, D. M. Citron, K. L. Tyrrell, V. Merriam, E. J. Goldstein (2002): 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 2): 493-499.
49. Conti, L., S. Lieb, T. Liberti, M. Wiley-Bayless, K. Hepburn, T. Diaz (1995): Pet ownership among persons with AIDS in three Florida counties. – *Am J Public Health*, 85(11): 1559-1561.
50. Copenhagen-Glazer, S., A. Sol, J. Abed, R. Naor, X. Zhang, Y. W. Han, G. Bachrach (2015): Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth. – *Infect Immun*, 83(3): 1104-1113.

9. LITERATURVERZEICHNIS

51. Costa-Pinto, J., C. Morley, S. Hauser (2016): A case of rat bite fever in a 12-year-old boy. – J Paediatr Child Health.
52. Costas, M., R. J. Owen (1987): Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Streptobacillus moniliformis* strains from human, murine and avian infections. – J Med Microbiol, 23(4): 303-311.
53. Cui, Y., C. Yu, Y. Yan, D. Li, Y. Li, T. Jombart, L. A. Weinert, Z. Wang, Z. Guo, L. Xu, Y. Zhang, H. Zheng, N. Qin, X. Xiao, M. Wu, X. Wang, D. Zhou, Z. Qi, Z. Du, H. Wu, X. Yang, H. Cao, H. Wang, J. Wang, S. Yao, A. Rakin, Y. Li, D. Falush, F. Balloux, M. Achtman, Y. Song, J. Wang, R. Yang (2013): Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. – Proc Natl Acad Sci USA, 110(2): 577-582.
54. Cui, Y., X. Yang, X. Xiao, A. P. Anisimov, D. Li, Y. Yan, D. Zhou, M. Rajerison, E. Carniel, M. Achtman, R. Yang, Y. Song (2014): Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. – Infect Genet Evol, 26: 172-179.
55. Cunningham, B. B., A. S. Paller, B. Z. Katz (1998): Rat bite fever in a pet lover. – J Am Acad Dermatol, 38(2 Pt 2): 330-332.
56. Das, A. M. (1986): *Streptobacillus moniliformis* isolated from an abscess of a dog. – Ind J Comp Microbiol Immunol Infect Dis 7: 115.
57. Das, S., H. R. Dash, N. Mangwani, J. Chakraborty, S. Kumari (2014): Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. – J Microbiol Methods, 103: 80-100.
58. De, A. S., S. M. Baveja, P. M. Salunke, M. V. Manglani (2010): Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from the blood of a child with acute lymphoblastic leukaemia. – Indian J Med Microbiol, 28(4): 387-389.
59. De Bruyn, A., D. P. Martin, P. Lefeuvre (2014): Phylogenetic reconstruction methods: an overview. – Methods Mol Biol, 1115: 257-277.
60. De Martino, S. J., I. Mahoudeau, J. P. Brettes, Y. Piemont, H. Monteil, B. Jaulhac (2004): Peripartum bacteremias due to *Leptotrichia amnionii* and *Sneathia sanguinegens*, rare causes of fever during and after delivery. – J Clin Microbiol, 42(12): 5940-5943.

9. LITERATURVERZEICHNIS

61. Dendle, C., I. J. Woolley, T. M. Korman (2006): Rat-bite fever septic arthritis: illustrative case and literature review. – Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 25(12): 791-797.
62. DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, G. L. Andersen (2006): Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. – Appl Environ Microbiol, 72(7): 5069-5072.
63. Devi, U., R. Bora, J. K. Das, V. Malik, J. Mahanta (2014): *Sneathia* species in a case of neonatal meningitis from Northeast India. – Oxf Med Case Reports, 2014(6): 112-114.
64. Dewhirst, F. E., E. A. Klein, E. C. Thompson, J. M. Blanton, T. Chen, L. Milella, C. M. Buckley, I. J. Davis, M. L. Bennett, Z. V. Marshall-Jones (2012): The canine oral microbiome. – PLoS One, 7(4): e36067.
65. Dick, G. E., R. Tunnicliff (1918): *Streptothrix* isolated from blood of a patient bitten by weasel. – J Infect Dis 23: 183-187.
66. Dienes, L. (1947): The morphology of the L(1) of Klieneberger and its relationship to *Streptobacillus moniliformis*. – J Bacteriol, 54(2): 231-237.
67. Dijkmans, B. A., R. T. Thomeer, G. J. Vielvoye, A. S. Lampe, H. Mattie (1984): Brain abscess due to *Streptobacillus moniliformis* and *Actinobacterium meyerii*. – Infection, 12(4): 262-264.
68. Dijkshoorn, L., B. M. Ursing, J. B. Ursing (2000): Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. – J Med Microbiol, 49(5): 397-401.
69. Ditchfield, J., L. H. Lord, K. A. McKay (1961): *Streptobacillus moniliformis* infection in a dog. – Can Vet J, 2(12): 457-459.
70. Dolman, C. E., D. E. Kerr, H. Chang, A. R. Shearer (1951): Two cases of rat bite fever due to *Streptobacillus moniliformis*. – Can J Public Health, 42(6): 228-241.
71. Domingue, G. J., Sr., H. B. Woody (1997): Bacterial persistence and expression of disease. – Clin Microbiol Rev, 10(2): 320-344.
72. Dubois, D., F. Robin, D. Bouvier, J. Delmas, R. Bonnet, O. Lesens, C. Hennequin (2008): *Streptobacillus moniliformis* as the causative agent in spondylodiscitis and psoas abscess after rooster scratches. – J Clin Microbiol, 46(8): 2820-2821.

9. LITERATURVERZEICHNIS

73. Duperval, R., S. Beland, J. A. Marcoux (1984): Infective endocarditis due to *Leptotrichia buccalis*: a case report. – Can Med Assoc J, 130(4): 422-424.
74. Dworkin, J., M. J. Bankowski, S. M. Wenceslao, R. Young (2010): A case of septic arthritis from rat-bite fever in Hawai'i. – Hawaii Med J, 69(3): 65-67.
75. Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. – Nucleic Acids Res, 32(5): 1792-1797.
76. Edwards, K. J., S. E. Gharbia, *Family Leptotrichiaceae, Genus I Leptotrichia*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N. R., W. Ludwig, W. B. Whitman, B. P. Hedlund, B. J. Paster, J. T. Staley, N. Ward, D. Brown, Editors. 2010, Springer: New York, NY.
77. Edwards, R., R. G. Finch (1986): Characterisation and antibiotic susceptibilities of *Streptobacillus moniliformis*. – J Med Microbiol, 21(1): 39-42.
78. Eisenberg, T., A. Nessler, W. Nicklas, V. Spamer, H. Seeger, M. Zschöck (2014): *Streptobacillus* sp. isolated from a cat with pneumonia. – JMMCR, 2014: 1-7.
79. Eisenberg, T., W. Nicklas, N. Mauder, J. Rau, M. Contzen, T. Semmler, N. Hofmann, K. Aledelbi, C. Ewers (2015a): Phenotypic and genotypic characteristics of members of the genus *Streptobacillus*. – PLoS One, 10(8): e0134312.
80. Eisenberg, T., S. P. Glaeser, P. Kämpfer, N. Schauerte, C. Geiger (2015b): Root sepsis associated with insect-dwelling *Sebaldella termitidis* in a lesser dwarf lemur (*Cheirogaleus medius*). – Antonie Van Leeuwenhoek, 108(6): 1373-1382.
81. Eisenberg, T., S. Glaeser, W. Nicklas, N. Mauder, M. Contzen, K. Aledelbi, P. Kämpfer (2015c): *Streptobacillus felis* sp. nov. isolated from a cat with pneumonia. – Int J Syst Evol Microbiol, 65(7): 2172-2178.
82. Eisenberg, T., S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, W. Nicklas, J. Rau, N. Mauder, N. Hofmann, K. Imaoka, M. Kimura, P. Kämpfer (2015d): *Streptobacillus notomytis* sp. nov. isolated from a spinifex hopping mouse (*Notomys alexis* THOMAS, 1922), and emended description of *Streptobacillus* Levaditi et al. 1925, Eisenberg et al. 2015 emend. – Int J Syst Evol Microbiol 65(12): 4823-4829.
83. Eisenberg, T., S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, B. Drescher, P. Kämpfer (2016a): *Caviibacter abscessus* gen. nov., sp. nov., a member of the family

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Leptotrichiaceae* isolated from guinea pigs (*Cavia porcellus*) – Int J Syst Evol Microbiol, 66(4): 1652-1659.
84. Eisenberg, T., A. Fawzy, W. Nicklas, T. Semmler, C. Ewers, *Data from: Phylogenetic and comparative genomics of the family Leptotrichiaceae and introduction of a novel fingerprinting MLVA for Streptobacillus moniliformis. Dryad Digital Repository. doi:10.5061/dryad.1q7q4.* 2016b.
85. Eisenberg, T., P. Kämpfer, C. Ewers, T. Semmler, S. P. Glaeser, E. Collins, M. Rutledge, R. Palmer (2016c): *Oceanivirga salmonicida* gen. nov., sp. nov., a member of the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) – Int J Syst Evol Microbiol, 66(6): 2429-2437.
86. Eisenberg, T., A. Fawzy, W. Nicklas, T. Semmler, C. Ewers (2016d): Phylogenetic and comparative genomics of the family *Leptotrichiaceae* and introduction of a novel fingerprinting MLVA for *Streptobacillus moniliformis*. – BMC Genomics, 17(1): 864-875.
87. Eisenberg, T., K. Imaoka, M. Kimura, S. P. Glaeser, C. Ewers, T. Semmler, J. Rau, W. Nicklas, P. Kämpfer (2016e): *Streptobacillus ratti* sp. nov., isolated from a black rat (*Rattus rattus*) – Int J Syst Evol Microbiol, 66(4): 1620-1626.
88. Eisenberg, T., S. Poignant, Y. Jouan, A. Fawzy, W. Nicklas, C. Ewers, L. Mereghetti, A. Guillon (2017): Acute tetraplegia caused by rat bite fever in snake keeper and transmission of *Streptobacillus moniliformis*. – Emerg Infect Dis, 23(4): 719-721.
89. Elliott, S. P. (2007): Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. – Clin Microbiol Rev, 20(1): 13-22.
90. Ellis, R., C. Ellis (2014): Dog and cat bites. – Am Fam Physician, 90(4): 239-243.
91. Eribe, E. R., B. J. Paster, D. A. Caugant, F. E. Dewhirst, V. K. Stromberg, G. H. Lacy, I. Olsen (2004): Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. – Int J Syst Evol Microbiol, 54(Pt 2): 583-592.
92. Euzéby, J. P. (1997): List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. – Int J Syst Bacteriol, 47(2): 590-592.

9. LITERATURVERZEICHNIS

93. Evaldson, G., G. Carlstrom, A. Lagrelius, A. S. Malmborg, C. E. Nord (1980): Microbiological findings in pregnant women with premature rupture of the membranes. – *Med Microbiol Immunol*, 168(4): 283-297.
94. Fan, X., A. V. Alekseyenko, J. Wu, B. A. Peters, E. J. Jacobs, S. M. Gapstur, M. P. Purdue, C. C. Abnet, R. Stolzenberg-Solomon, G. Miller, J. Ravel, R. B. Hayes, J. Ahn (2016): Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. – *Gut*, 2016 Oct 14. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312580.
95. Fang, G., N. Bhardwaj, R. Robilotto, M. B. Gerstein (2010): Getting started in gene orthology and functional analysis. – *PLoS Comput Biol*, 6(3): e1000703.
96. Faro, S., C. Walker, R. L. Pierson (1980): Amnionitis with intact amniotic membranes involving *Streptobacillus moniliformis*. – *Obstet Gynecol*, 55(3 Suppl): 9S-11S.
97. Felsenstein, J. (1973): Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. – *Am J Hum Genet*, 25(5): 471-492.
98. Felsenstein, J. (1985): Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. – *Evolution*, 39: 783-791.
99. Fenn, D. W., A. Ramoutar, G. Jacob, H. Bin Xiao (2014): An unusual tale of rat-bite fever endocarditis. – *BMJ Case Rep*, 2014, Nov 20. doi: 10.1136/bcr-2014-204989.
100. Fleming, M. P. (1976): *Streptobacillus moniliformis* isolations from cervical abscesses of guinea-pigs. – *Vet Rec*, 99(13): 256.
101. Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen, C. R. Woese (1980): The phylogeny of prokaryotes. – *Science*, 209(4455): 457-463.
102. Fredricks, D. N., T. L. Fiedler, K. K. Thomas, C. M. Mitchell, J. M. Marrazzo (2009): Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. – *J Clin Microbiol*, 47(3): 721-726.
103. Freundt, E. A. (1956): Experimental investigations into the pathogenicity of the L-phase variant of *Streptobacillus moniliformis*. – *Acta Pathol Microbiol Scand*, 38(3): 246-258.

9. LITERATURVERZEICHNIS

104. Freunek, K., A. Turnwald-Maschler, J. Pannenbecker (1997): Rattenbissfieber: Infektion mit *Streptobacillus moniliformis* – Monatsschr Kinderheilkd, 145: 473-476.
105. Gaastra, W., R. Boot, H. T. Ho, L. J. Lipman (2009): Rat bite fever. – Vet Microbiol, 133(3): 211-228.
106. Galan, M., M. Razzauti, E. Bard, M. Bernard, C. Brouat, N. Charbonnel, A. Dehne-Garcia, A. Loiseau, C. Tatard, L. Tamisier, M. Vayssier-Taussat, H. Vignes, J. F. Cosson (2016): 16S rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife. – mSystems, 2016 Jul 19;1(4). pii: e00032-16.
107. Galperin, M. Y., K. S. Makarova, Y. I. Wolf, E. V. Koonin (2015): Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. – Nucleic Acids Res, 43(Database issue): D261-269.
108. Garcia-Gutierrez, E., C. Almendros, F. J. Mojica, N. M. Guzman, J. Garcia-Martinez (2015): CRISPR content correlates with the pathogenic potential of *Escherichia coli*. – PLoS One, 10(7): e0131935.
109. Gascard, E., R. Vignoli, J. C. Moulard, J. M. Salvadori (1967): Case of febrile eruption after a cat bite: *Streptobacillus moniliformis* septicemia? [in Französisch]. – Mars Med, 104(10): 861-864.
110. Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson, J. Swings (2005): Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. – Nat Rev Microbiol, 3(9): 733-739.
111. Glaeser, S. P., P. Kämpfer (2015): Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. – Syst Appl Microbiol, 38(4): 237-245.
112. Glastonbury, J. R., J. G. Morton, L. M. Matthews (1996): *Streptobacillus moniliformis* infection in Swiss white mice. – J Vet Diagn Invest, 8(2): 202-209.
113. Glünder, G., K. H. Hinz, B. Stiburek (1982): Eine durch *Streptobacillus moniliformis* bedingte Gelenkserkrankung bei Puten in Deutschland. – Dtsch Tierärztl Wochenschr, 89(9): 367-370.
114. Godfroid, J., X. DeBolle, R. M. Roop, D. O'Callaghan, R. M. Tsolis, C. Baldwin, R. L. Santos, J. McGiven, S. Olsen, I. H. Nymo, A. Larsen, S. Al Dahouk, J. J. Letesson (2014): The quest for a true One Health perspective of brucellosis. – Rev Sci Tech, 33(2): 521-538.

9. LITERATURVERZEICHNIS

115. Gordon, I. J., E. S. Jones (1999): I smell a rat! – *Hosp Med*, 60(9): 682-683.
116. Goris, J., K. T. Konstantinidis, J. A. Klappenbach, T. Coenye, P. Vandamme, J. M. Tiedje (2007): DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 1): 81-91.
117. Gourlay, R. N., B. F. Flanagan, S. G. Wyld (1982): *Streptobacillus actinoides* (*Bacillus actinoides*): isolation from pneumonic lungs of calves and pathogenicity studies in gnotobiotic calves. – *Res Vet Sci*, 32(1): 27-34.
118. Graves, M. H., J. M. Janda (2001): Rat-bite fever (*Streptobacillus moniliformis*): a potential emerging disease. – *Int J Infect Dis*, 5(3): 151-155.
119. Gray, H. H. (1967): Squirrel bite fever. – *Trans R Soc Trop Med Hyg* 61: 857.
120. Guenther, S., A. Bethe, A. Fruth, T. Semmler, R. G. Ulrich, L. H. Wieler, C. Ewers (2012): Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. – *PLoS One*, 7(11): e50331.
121. Guerrero-Preston, R., F. Godoy-Vitorino, A. Jedlicka, A. Rodriguez-Hilario, H. Gonzalez, J. Bondy, F. Lawson, O. Folawiyo, C. Michailidi, A. Dzedzic, R. Thangavel, T. Hadar, M. G. Noordhuis, W. Westra, W. Koch, D. Sidransky (2016): 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. – *Oncotarget*, 7(32):51320-51334.
122. Gupta, R. S., M. Sethi (2014): Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. – *Anaerobe*, 28: 182-198.
123. Hagelskjaer, L., I. Sorensen, E. Randers (1998): *Streptobacillus moniliformis* infection: 2 cases and a literature review. – *Scand J Infect Dis*, 30(3): 309-311.
124. Haggerty, C. L., P. A. Totten, M. Ferris, D. H. Martin, S. Hoferka, S. G. Astete, R. Ondondo, J. Norori, R. B. Ness (2009): Clinical characteristics of bacterial vaginosis among women testing positive for fastidious bacteria. – *Sex Transm Infect*, 85(4): 242-248.
125. Haggerty, C. L., P. A. Totten, G. Tang, S. G. Astete, M. J. Ferris, J. Norori, D. C. Bass, D. H. Martin, B. D. Taylor, R. B. Ness (2016): Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. – *Sex Transm Infect*, 92(6):441-446.

9. LITERATURVERZEICHNIS

126. Hall, B. G., *Phylogenetic trees made easy: a how-to-manual*. 4th ed. 2011, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
127. Hanff, P. A., J. A. Rosol-Donoghue, C. A. Spiegel, K. H. Wilson, L. H. Moore (1995): *Leptotrichia sanguinegens* sp. nov., a new agent of postpartum and neonatal bacteremia. – Clin Infect Dis, 20 Suppl 2: S237-239.
128. Harmon-Smith, M., L. Celia, O. Chertkov, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina Del Rio, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J. F. Cheng, C. Han, J. C. Detter, D. Bruce, L. Goodwin, S. Pitluck, A. Pati, K. Liolios, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, T. Brettin, M. Goker, B. Beck, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk, F. Chen (2010): Complete genome sequence of *Sebaldeella termitidis* type strain (NCTC 11300). – Stand Genomic Sci, 2(2): 220-227.
129. Harris, S. R., E. J. Feil, M. T. Holden, M. A. Quail, E. K. Nickerson, N. Chantratita, S. Gardete, A. Tavares, N. Day, J. A. Lindsay, J. D. Edgeworth, H. de Lencastre, J. Parkhill, S. J. Peacock, S. D. Bentley (2010): Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. – Science, 327(5964): 469-474.
130. Harrison, C. J., J. A. Langdale (2006): A step by step guide to phylogeny reconstruction. – Plant J, 45(4): 561-572.
131. Harwich, M. D., Jr., M. G. Serrano, J. M. Fettweis, J. M. Alves, M. A. Reimers, G. A. Buck, K. K. Jefferson (2012): Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. – BMC Genomics, 13 Suppl 8: S4.
132. Hausemer, G., *Die heiligen Ratten von Deshnok: Eine indische Reise* 2008, Luxembourg: Saint-Paul
133. Hayashimoto, N., H. Yoshida, K. Goto, A. Takakura (2008): Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. – J Vet Med Sci, 70(5): 493-495.
134. Heuser, E., S. Fischer, R. Ryll, A. Mayer-Scholl, D. Hoffmann, C. Spahr, C. Imholt, D. M. Alfa, A. Frohlich, D. Luschow, R. Johne, B. Ehlers, S. Essbauer, K. Nöckler, R. G. Ulrich (2016): Survey for zoonotic pathogens in Norway rat populations from Europe. – Pest Manag Sci, 73(2): 341-348.
135. Hillier, S. L., J. M. Marrazzo, K. K. Holmes, *Bacterial vaginosis*, in *Sex Transm Dis*, Holmes, K. K., P. F. Sparling, W. E. Stamm, P. Piot, J. N. Wasserheit, L.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Corey, M. S. Cohen, D. H. Watts, Editors. 2008, McGraw-Hill: New York. p. 737-768.
136. Himsworth, C. G., K. L. Parsons, C. Jardine, D. M. Patrick (2013): Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. – *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13(6): 349-359.
137. Hofmann, N., *Phänotypische und molekulartaxonomische Untersuchungen zur systematischen Stellung von Streptobacillus moniliformis, dem Erreger des Rattenbissfiebers*, in *Fakultät Biologie, Leibniz Universität Hannover*. 1994: Dissertationsschrift Dr. rer. nat., Fakultät Biologie, Leibniz Universität Hannover. 105 S.
138. Hopkinson, W. I., J. M. Lloyd (1981): *Streptobacillus moniliformis* septicaemia in spinifex hopping mice (*Notomys alexis*). – *Aust Vet J*, 57(11): 533-534.
139. Hot, A., B. Coppere, J. Ninet, A. Thiebault (2008): Lemierre syndrome caused by *Leptotrichia buccalis* in a neutropenic patient. – *Int J Infect Dis*, 12(3): 339-340.
140. Hu, K. T., J. X. Zheng, Z. J. Yu, Z. Chen, H. Cheng, W. G. Pan, W. Z. Yang, H. Y. Wang, Q. W. Deng, Z. M. Zeng (2015): Directed shift of vaginal microbiota induced by vaginal application of sucrose gel in rhesus macaques. – *Int J Infect Dis*, 33: 32-36.
141. Hudsmith, L., V. Weston, J. Szram, S. Allison (2001): Clinical picture, rat bite fever. – *Lancet Infect Dis*, 1(2): 91.
142. Hullar, M. A., S. M. Lancaster, F. Li, E. Tseng, K. Beer, C. Atkinson, K. Wahala, W. K. Copeland, T. W. Randolph, K. M. Newton, J. W. Lampe (2015): Enterolignan-producing phenotypes are associated with increased gut microbial diversity and altered composition in premenopausal women in the United States. – *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(3): 546-554.
143. Hyatt, D., G. L. Chen, P. F. Locascio, M. L. Land, F. W. Larimer, L. J. Hauser (2010): Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. – *BMC Bioinformatics*, 11: 119.
144. Ikegami, A., P. Chung, Y. W. Han (2009): Complementation of the *fadA* mutation in *Fusobacterium nucleatum* demonstrates that the surface-exposed adhesin promotes cellular invasion and placental colonization. – *Infect Immun*, 77(7): 3075-3079.

9. LITERATURVERZEICHNIS

145. Irvine, L., T. Wills (2006): *Streptobacillus moniliformis*: a mouse trying to become a rat. – Clin Microbiol Newsl, 28: 118-120.
146. Ivanova, N., S. Gronow, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina Del Rio, M. Nolan, S. Lucas, F. Chen, H. Tice, J. F. Cheng, E. Saunders, D. Bruce, L. Goodwin, T. Brettin, J. C. Detter, C. Han, S. Pittluck, N. Mikhailova, A. Pati, K. Mavrommatis, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, P. Chain, C. Rohde, M. Goker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk (2009): Complete genome sequence of *Leptotrichia buccalis* type strain (C-1013-b). – Stand Genomic Sci, 1(2): 126-132.
147. Jalava, J., E. Eerola (1999): Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. – Int J Syst Bacteriol, 49 Pt 4: 1375-1379.
148. Jang, J. Y., I. S. Song, K. J. Baek, Y. Choi, S. Ji (2016): Immunologic characteristics of human gingival fibroblasts in response to oral bacteria. – J Periodontal Res, 2016 Aug 24. doi: 10.1111/jre.12410.
149. Jeon, S. J., A. Vieira-Neto, M. Gobikrushanth, R. Daetz, R. D. Mingoti, A. C. Parize, S. L. de Freitas, A. N. da Costa, R. C. Bicalho, S. Lima, K. C. Jeong, K. N. Galvao (2015): Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. – Appl Environ Microbiol, 81(18): 6324-6332.
150. Jia, S., X. Zhang, G. Zhang, A. Yin, S. Zhang, F. Li, L. Wang, D. Zhao, Q. Yun, Tala, J. Wang, G. Sun, M. Baabdullah, X. Yu, S. Hu, I. S. Al-Mssallem, J. Yu (2013): Seasonally variable intestinal metagenomes of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). – Environ Microbiol, 15(11): 3020-3029.
151. Jiang, S., X. Gao, L. Jin, E. C. Lo (2016): Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children. – Int J Mol Sci, 17(12).
152. Jiang, W., L. A. Marraffini (2015): CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. – Annu Rev Microbiol, 69: 209-228.
153. Jin, J., T. Haga, T. Shinjo, Y. Goto (2004): Phylogenetic analysis of *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium varium* and *Fusobacterium*

9. LITERATURVERZEICHNIS

- nucleatum* based on *gyrB* gene sequences. – J Vet Med Sci, 66(10): 1243-1245.
154. Johnson, J. L., *Bacterial classification III. Nucleic acids in bacterial classification*, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Krieg, N. R., J. G. Holt, Editors. 1984, The Williams & Wilkins Co.: Baltimore, London. p. 8-11.
155. Jung, J. W., J. C. Choi, J. W. Shin, J. Y. Kim, I. W. Park, B. W. Choi, H. W. Park, S. H. Cho, K. Kim, H. R. Kang (2016): Lung microbiome analysis in steroid-naïve asthma patients by using whole sputum. – Tuberc Respir Dis (Seoul), 79(3): 165-178.
156. Kacerovsky, M., F. Vrbacky, R. Kutova, L. Pliskova, C. Andrys, I. Musilova, R. Menon, R. Lamont, J. Nekvindova (2015): Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. – PLoS One, 10(5): e0126884.
157. Kadan, D., D. Chih, A. Brett, M. Segasothy (2002): A case of rat-bite fever. – Intern Med J, 32(4): 193-194.
158. Kämpfer, P. (2012): Systematics of prokaryotes: the state of the art. – Antonie Van Leeuwenhoek, 101(1): 3-11.
159. Kapatral, V., I. Anderson, N. Ivanova, G. Reznik, T. Los, A. Lykidis, A. Bhattacharyya, A. Bartman, W. Gardner, G. Grechkin, L. Zhu, O. Vasieva, L. Chu, Y. Kogan, O. Chaga, E. Goltsman, A. Bernal, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, N. Kyrpides, R. Overbeek (2002): Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. – J Bacteriol, 184(7): 2005-2018.
160. Kapatral, V., N. Ivanova, I. Anderson, G. Reznik, A. Bhattacharyya, W. L. Gardner, N. Mikhailova, A. Lapidus, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, R. Haselkorn, R. Overbeek, N. Kyrpides (2003): Genome analysis of *F. nucleatum* sub spp *vincentii* and its comparison with the genome of *F. nucleatum* ATCC 25586. – Genome Res, 13(6a): 1180-1189.
161. Karlsson, R., L. Gonzales-Siles, F. Boulund, L. Svensson-Stadler, S. Skovbjerg, A. Karlsson, M. Davidson, S. Hulth, E. Kristiansson, E. R. Moore (2015): Proteotyping: proteomic characterization, classification and identification of microorganisms - a prospectus. – Syst Appl Microbiol, 38(4): 246-257.

9. LITERATURVERZEICHNIS

162. Kasai, H., T. Ezaki, S. Harayama (2000): Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. – J Clin Microbiol, 38(1): 301-308.
163. Kaspereit-Rittinghausen, J., M. Wullenweber, F. Deerberg, M. Farouq (1990): Pathologische Veränderungen bei *Streptobacillus moniliformis* Infektion von C57BL/6J Mäusen. – Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 103(3): 84-87.
164. Kato, I., A. Vasquez, G. Moyerbrailean, S. Land, Z. Djuric, J. Sun, H. S. Lin, J. L. Ram (2016): Nutritional correlates of human oral microbiome. – J Am Coll Nutr, 2016 Oct 31:1-11.
165. Kawanami, T., K. Fukuda, K. Yatera, T. Kido, C. Yoshii, H. Taniguchi, M. Kido (2009): Severe pneumonia with *Leptotrichia* sp. detected predominantly in bronchoalveolar lavage fluid by use of 16S rRNA gene sequencing analysis. – J Clin Microbiol, 47(2): 496-498.
166. Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, A. Drummond (2012): Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – Bioinformatics, 28(12): 1647-1649.
167. Keim, P., M. N. Van Ert, T. Pearson, A. J. Vogler, L. Y. Huynh, D. M. Wagner (2004): Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. – Infect Genet Evol, 4(3): 205-213.
168. Khamis, A., D. Raoult, B. La Scola (2005): Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. – J Clin Microbiol, 43(4): 1934-1936.
169. Kim, H. S., D. S. Lee, Y. H. Chang, M. J. Kim, S. Koh, J. Kim, J. H. Seong, S. K. Song, H. S. Shin, J. B. Son, M. Y. Jung, S. N. Park, S. Y. Yoo, K. W. Cho, D. K. Kim, S. Moon, D. Kim, Y. Choi, B. O. Kim, H. S. Jang, C. S. Kim, C. Kim, S. J. Choe, J. K. Kook (2010): Application of *rpoB* and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. – J Clin Microbiol, 48(2): 545-553.
170. Kim, O. S., Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, H. Na, S. C. Park, Y. S. Jeon, J. H. Lee, H. Yi, S. Won, J. Chun (2012): Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. – Int J Syst Evol Microbiol, 62(Pt 3): 716-721.

9. LITERATURVERZEICHNIS

171. Kimura, M., T. Tanikawa, M. Suzuki, N. Koizumi, T. Kamiyama, K. Imaoka, A. Yamada (2008): Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. – *Microbiol Immunol*, 52(1): 9-15.
172. Kirchner, B. K., S. G. Lake, S. R. Wightman (1992): Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a guinea pig with granulomatous pneumonia. – *Lab Anim Sci*, 42(5): 519-521.
173. Klieneberger, E. (1939): Studies on pleuropneumonia-like organisms : Bacteriological features and serological relationships of strains from various sources. – 49(2): 451–452.
174. Klieneberger, E. (1940): The pleuropneumonia-like organisms: further comparative studies and a descriptive account of recently discovered types. – *J Hyg Camb* 40: 204–222.
175. Knobel Freud, H., J. L. Lopez Colomes, C. Serrano Sainz, P. Hernandez Vidal (1997): Animal bites. Study of 606 cases [in Spanish]. – *Rev Clin Esp*, 197(8): 560-563.
176. Knudsen, L. R., C. C. Karstrup, H. G. Pedersen, O. Angen, J. S. Agerholm, E. L. Rasmussen, T. K. Jensen, K. Klitgaard (2016): An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum. – *Theriogenology*, 86(2): 642-650.
177. Kondruweit, M., M. Weyand, F. O. Mahmoud, W. Geissdorfer, C. Schoerner, D. Ropers, S. Achenbach, T. Strecker (2007): Fulminant endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis* in a young man. – *J Thorac Cardiovasc Surg*, 134(6): 1579-1580.
178. Kong, H. H., J. Oh, C. Deming, S. Conlan, E. A. Grice, M. A. Beatson, E. Nomicos, E. C. Polley, H. D. Komarow, N. C. S. Program, P. R. Murray, M. L. Turner, J. A. Segre (2012): Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. – *Genome Res*, 22(5): 850-859.
179. Koonin, E. V., P. Puigbo, Y. I. Wolf (2011): Comparison of phylogenetic trees and search for a central trend in the "forest of life". – *J Comput Biol*, 18(7): 917-924.
180. Koopman, J. P., M. E. Van den Brink, P. P. Vennix, W. Kuypers, R. Boot, R. H. Bakker (1991): Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from the middle ear of rats. – *Lab Anim*, 25(1): 35-39.

9. LITERATURVERZEICHNIS

181. Koumans, E. H., M. Sternberg, C. Bruce, G. McQuillan, J. Kendrick, M. Sutton, L. E. Markowitz (2007): The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. – *Sex Transm Dis*, 34(11): 864-869.
182. Kumar, A., D. Anderson, R. G. Amachawadi, T. G. Nagaraja, S. K. Narayanan (2013): Characterization of *Fusobacterium necrophorum* isolated from llama and alpaca. – *J Vet Diagn Invest*, 25(4): 502-507.
183. Kumar, A., S. Menon, T. G. Nagaraja, S. Narayanan (2015): Identification of an outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* that binds with high affinity to bovine endothelial cells. – *Vet Microbiol*, 176(1-2): 196-201.
184. Kumar, G., K. Hummel, M. Ahrens, S. Menanteau-Ledouble, T. J. Welch, M. Eisenacher, E. Razzazi-Fazeli, M. El-Matbouli (2016a): Shotgun proteomic analysis of *Yersinia ruckeri* strains under normal and iron-limited conditions. – *Vet Res*, 47(1): 100.
185. Kumar, S., T. Verma, R. Mukherjee, F. Ariese, K. Somasundaram, S. Umapathy (2016b): Raman and infra-red microspectroscopy: towards quantitative evaluation for clinical research by ratiometric analysis. – *Chem Soc Rev*, 45(7): 1879-1900.
186. Lambe, D. W., Jr., A. M. McPhedran, J. A. Mertz, P. Stewart (1973): *Streptobacillus moniliformis* isolated from a case of Haverhill fever: biochemical characterization and inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate. – *Am J Clin Pathol*, 60(6): 854-860.
187. Land, M., L. Hauser, S. R. Jun, I. Nookaew, M. R. Leuze, T. H. Ahn, T. Karpinets, O. Lund, G. Kora, T. Wassenaar, S. Poudel, D. W. Ussery (2015): Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. – *Funct Integr Genomics*, 15(2): 141-161.
188. Land, M. L., D. Hyatt, S. R. Jun, G. H. Kora, L. J. Hauser, O. Lukjancenko, D. W. Ussery (2014): Quality scores for 32,000 genomes. – *Stand Genomic Sci*, 9: 20.
189. Lapage, S. P., P. H. A. Sneath, E. F. Lessel, V. B. D. Skerman, H. P. R. Seeliger, W. A. Clark, in *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision*, Lapage, S. P., P. H. A. Sneath, E. F.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Lessel, V. B. D. Skerman, H. P. R. Seeliger, W. A. Clark, Editors. 1992: Washington (DC).
190. Larcia, L. L., 2nd, R. C. Estacio, L. M. Dalmacio (2011): Bacterial diversity in Philippine fermented mustard (burong mustasa) as revealed by 16S rRNA gene analysis. – *Benef Microbes*, 2(4): 263-271.
191. Lau, S. K., J. F. Chan, C. C. Tsang, S. M. Chan, M. L. Ho, T. L. Que, Y. L. Lau, P. C. Woo (2016): Human oropharynx as natural reservoir of *Streptobacillus hongkongensis*. – *Sci Rep*, 6: 24419.
192. Lawson, P. A., S. E. Gharbia, H. N. Shah, D. R. Clark, M. D. Collins (1991): Intrageneric relationships of members of the genus *Fusobacterium* as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. – *Int J Syst Bacteriol*, 41(3): 347-354.
193. Leao, C., R. J. Goldstone, J. Bryant, J. McLuckie, J. Inacio, D. G. Smith, K. Stevenson (2016): Novel single nucleotide polymorphism-based assay for genotyping *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. – *J Clin Microbiol*, 54(3): 556-564.
194. Lee, J. E., S. Lee, H. Lee, Y. M. Song, K. Lee, M. J. Han, J. Sung, G. Ko (2013): Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. – *PLoS One*, 8(5): e63514.
195. Legendre, M., N. Pochet, T. Pak, K. J. Verstrepen (2007): Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. – *Genome Res*, 17(12): 1787-1796.
196. Legout, L., E. Senneville, D. Mulleman, E. Solau-Gervais, R. M. Flipo, Y. Mouton (2005): Rat bite fever mimicking rheumatoid arthritis. – *Scand J Infect Dis*, 37(6-7): 532-533.
197. Lehman, R. M., J. G. Lundgren, L. M. Petzke (2009): Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. – *Microb Ecol*, 57(2): 349-358.
198. Levaditi, C., S. Nicolau, P. Poincloux (1925): Über die ätiologische Rolle von *Streptobacillus moniliformis* (nov. spec.) bei der akuten multifokalen erythematösen Septikämie [in Französisch]. – *C R Acad Sci*, 180: 1188-1190.

9. LITERATURVERZEICHNIS

199. Li, Y., C. G. Zou, Y. Fu, Y. Li, Q. Zhou, B. Liu, Z. Zhang, J. Liu (2016): Oral microbial community typing of caries and pigment in primary dentition. – BMC Genomics, 17: 558.
200. Lim, Y. K., O. J. Kweon, H. R. Kim, M. K. Lee (2016): *Leptotrichia goodfellowii* infection: case report and literature review. – Ann Clin Lab Sci, 46(1): 83-86.
201. Lin, J. Y., L. F. Wang, R. H. Lin (1996): The association between lung innate immunity and differential airway antigen-specific immune responses. – Int Immunol, 8(4): 499-507.
202. Liu, H., X. Guo, R. Gooneratne, R. Lai, C. Zeng, F. Zhan, W. Wang (2016): The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. – Sci Rep, 6: 24340.
203. Liu, P., Y. Liu, J. Wang, Y. Guo, Y. Zhang, S. Xiao (2014): Detection of *Fusobacterium nucleatum* and *fadA* adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. – PLoS One, 9(1): e85280.
204. Liu, T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, T. Yajima, Y. Yoshikai (2002): Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. – Infect Immun, 70(12): 6638-6645.
205. Lo, T. S. (2012): A cavitory pneumonia caused by *Leptotrichia* species in an immunocompetent patient. – Infect Dis Rep, 4(1): e24.
206. Logan, J. M. J., K. J. Edwards, S. E. Gharbia, *Family Leptotrichiaceae, Genus III Sneathia*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N. R., W. Ludwig, W. B. Whitman, B. P. Hedlund, B. J. Paster, J. T. Staley, N. Ward, D. Brown, Editors. 2010, Springer: New York, NY.
207. Loridant, S., M. C. Jaffar-Bandjee, B. La Scola (2011): Shell vial cell culture as a tool for *Streptobacillus moniliformis* "resuscitation". – Am J Trop Med Hyg, 84(2): 306-307.
208. Machado, V. S., G. Oikonomou, M. L. Bicalho, W. A. Knauer, R. Gilbert, R. C. Bicalho (2012): Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. – Vet Microbiol, 159(3-4): 460-469.
209. Mackey, J. R., E. L. Melendez, J. J. Farrell, K. S. Lowery, M. A. Rounds, R. Sampath, R. A. Bonomo (2014): Direct detection of indirect transmission of

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Streptobacillus moniliformis* rat bite fever infection. – J Clin Microbiol, 52(6): 2259-2261.
210. Madhubashini, M., S. George, S. Chandrasekaran (2013): *Streptobacillus moniliformis* endocarditis: case report and review of literature. – Indian Heart J, 65(4): 442-446.
211. Maher, M., R. Palmer, F. Gannon, T. J. Smith (1995): Relationship of a novel bacterial fish pathogen to *Streptobacillus moniliformis* and the Fusobacteria group, based on 16S ribosomal RNA analysis. – Syst Appl Microbiol, 18: 79-84.
212. Mähler, M., M. Berard, R. Feinstein, A. Gallagher, B. Illgen-Wilcke, K. Pritchett-Corning, M. Raspa (2014): FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. – Lab Anim, 48(3): 178-192.
213. Mahmoodi, E., C. Grainge, A. Erdstein, G. O'kane (2016): Septic arthritis caused by pet rodents: A diagnostic dilemma. – Australasian Medical Journal, 9(8): 270-273.
214. Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, B. G. Spratt (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. – Proc Natl Acad Sci USA, 95(6): 3140-3145.
215. Makarova, K. S., Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E. V. Koonin (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. – Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-736.
216. Manhart, L. E., C. M. Khosropour, C. Liu, C. W. Gillespie, K. Depner, T. Fiedler, J. M. Marrazzo, D. N. Fredricks (2013): Bacterial vaginosis-associated bacteria in men: association of *Leptotrichia/Sneathia* spp. with nongonococcal urethritis. – Sex Transm Dis, 40(12): 944-949.
217. Manson McGuire, A., K. Cochrane, A. D. Griggs, B. J. Haas, T. Abeel, Q. Zeng, J. B. Nice, H. MacDonald, B. W. Birren, B. W. Berger, E. Allen-Vercoe,

9. LITERATURVERZEICHNIS

- A. M. Earl (2014): Evolution of invasion in a diverse set of *Fusobacterium* species. – MBio, 5(6): e01864.
218. Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, S. H. Bryant (2015): CDD: NCBI's conserved domain database. – Nucleic Acids Res, 43(Database issue): D222-226.
219. Marraffini, L. A. (2015): CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. – Nature, 526(7571): 55-61.
220. Mayer-Scholl, A., J. A. Hammerl, S. Schmidt, R. G. Ulrich, M. Pfeffer, D. Woll, H. C. Scholz, A. Thomas, K. Nockler (2014): *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. – Int J Environ Res Public Health, 11(8): 7562-7574.
221. Maynard, J. H., W. M. McNaughton, T. Travis (1986): *Streptobacillus moniliformis* cellulitis and bacteraemia following a dog bite. – Commun Dis Intell: 10.
222. McCutcheon, J. P., N. A. Moran (2011): Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. – Nat Rev Microbiol, 10(1): 13-26.
223. McEvoy, M. B., N. D. Noah, R. Pilsworth (1987): Outbreak of fever caused by *Streptobacillus moniliformis*. – Lancet, 2(8572): 1361-1363.
224. McInerney, J. O., D. Pisani (2007): Genetics. Paradigm for life. – Science, 318(5855): 1390-1391.
225. McInerney, J. O., J. A. Cotton, D. Pisani (2008): The prokaryotic tree of life: past, present... and future? – Trends Ecol Evol, 23(5): 276-281.
226. McMillan, B., L. R. Boulger (1968): Squirrel-bite fever. – Trans R Soc Trop Med Hyg, 62(4): 567.
227. Meier-Kolthoff, J. P., A. F. Auch, H. P. Klenk, M. Goker (2013): Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. – BMC Bioinformatics, 14: 60.
228. Mende, D. R., A. S. Waller, S. Sunagawa, A. I. Jarvelin, M. M. Chan, M. Arumugam, J. Raes, P. Bork (2012): Assessment of metagenomic assembly using simulated next generation sequencing data. – PLoS One, 7(2): e31386.
229. Messiaen, T., C. Lefebvre, A. Geubel (1996): Hepatic abscess likely related to *Leptotrichia buccalis* in an immunocompetent patient. – Liver, 16(5): 342-343.

9. LITERATURVERZEICHNIS

230. Mirafior, A. P., L. Davallow Ghajar, S. Subramaniam, F. B. de Abreu, M. P. Castanedo-Tardan, F. H. Samie, J. A. Mann, A. V. Holmes, G. J. Tsongalis, S. Yan (2015): Rat-bite fever: An uncommon cause of fever and rash in a 9-year-old patient. – *JAAD Case Rep*, 1(6): 371-374.
231. Mitchell, C., J. E. Balkus, D. Fredricks, C. Liu, J. McKernan-Mullin, L. M. Frenkel, C. Mwachari, A. Luque, S. E. Cohn, C. R. Cohen, R. Coombs, J. Hitti (2013): Interaction between lactobacilli, bacterial vaginosis-associated bacteria, and HIV Type 1 RNA and DNA genital shedding in U.S. and Kenyan women. – *AIDS Res Hum Retroviruses*, 29(1): 13-19.
232. Miyairi, I., V. R. Tatireddigari, O. S. Mahdi, L. A. Rose, R. J. Belland, L. Lu, R. W. Williams, G. I. Byrne (2007): The p47 GTPases *ligp2* and *Irgb10* regulate innate immunity and inflammation to murine *Chlamydia psittaci* infection. – *J Immunol*, 179(3): 1814-1824.
233. Mohamed, Y. S., P. D. Moorhead, E. H. Bohl (1969): Natural *Streptobacillus moniliformis* infection of turkeys, and attempts to infect turkeys, sheep, and pigs. – *Avian Dis*, 13(2): 379-385.
234. Monot, M., N. Honore, T. Garnier, N. Zidane, D. Sherafi, A. Paniz-Mondolfi, M. Matsuoka, G. M. Taylor, H. D. Donoghue, A. Bouwman, S. Mays, C. Watson, D. Lockwood, A. Khamesipour, Y. Dowlati, S. Jianping, T. H. Rea, L. Vera-Cabrera, M. M. Stefani, S. Banu, M. Macdonald, B. R. Sapkota, J. S. Spencer, J. Thomas, K. Harshman, P. Singh, P. Busso, A. Gattiker, J. Rougemont, P. J. Brennan, S. T. Cole (2009): Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. – *Nat Genet*, 41(12): 1282-1289.
235. Morand, S., F. Bordes, H. W. Chen, J. Claude, J. F. Cosson, M. Galan, G. A. Czirjak, A. D. Greenwood, A. Latinne, J. Michaux, A. Ribas (2015): Global parasite and *Rattus* rodent invasions: The consequences for rodent-borne diseases. – *Integr Zool*, 10(5): 409-423.
236. Nagaraja, T. G., S. K. Narayanan, G. C. Stewart, M. M. Chengappa (2005): *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. – *Anaerobe*, 11(4): 239-246.
237. Nakagaki, H., S. Sekine, Y. Terao, M. Toe, M. Tanaka, H. O. Ito, S. Kawabata, S. Shizukuishi, K. Fujihashi, K. Kataoka (2010): *Fusobacterium nucleatum* envelope protein FomA is immunogenic and binds to the salivary statherin-derived peptide. – *Infect Immun*, 78(3): 1185-1192.

9. LITERATURVERZEICHNIS

238. Naumann, D., *Infrared spectroscopy in microbiology*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Meyers, R. A., Editor. 2000, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester. p. 102–131.
239. Nawrot, R., K. Kamieniarz, M. Malinowska, A. Jozefiak, W. Kedzia, A. Kwasniewska, D. Kuzma, A. Gozdzicka-Jozefiak (2010): The prevalence of *Leptotrichia amnionii* in cervical swabs of HPV positive and negative women. – Eur J Gynaecol Oncol, 31(4): 425-428.
240. Nelson, D. B., L. C. Rockwell, M. D. Prioleau, L. Goetzl (2016): The role of the bacterial microbiota on reproductive and pregnancy health. – Anaerobe, 42: 67-73.
241. Nelson, D. E., B. Van Der Pol, Q. Dong, K. V. Revanna, B. Fan, S. Easwaran, E. Sodergren, G. M. Weinstock, L. Diao, J. D. Fortenberry (2010): Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. – PLoS One, 5(11): e14116.
242. Nolan, M., S. Gronow, A. Lapidus, N. Ivanova, A. Copeland, S. Lucas, T. G. Del Rio, F. Chen, H. Tice, S. Pitluck, J. F. Cheng, D. Sims, L. Meincke, D. Bruce, L. Goodwin, T. Brettin, C. Han, J. C. Detter, G. Ovchinnikova, A. Pati, K. Mavromatis, N. Mikhailova, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, M. Rohde, C. Sproer, M. Goker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk, P. Chain (2009): Complete genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901). – Stand Genomic Sci, 1(3): 300-307.
243. Ojukwu, I. C., C. Christy (2002): Rat-bite fever in children: case report and review. – Scand J Infect Dis, 34(6): 474-477.
244. Okamori, S., M. Nakano, M. Nakamura, E. Takahashi, T. Hasuike, Y. Nakamura, D. Aizawa (2015): A Japanese patient with a rare case of *Streptobacillus moniliformis* bacteremia. – J Infect Chemother, 21(12): 877-878.
245. Ordog, G. J., S. Balasubramaniam, J. Wasserberger (1985): Rat bites: fifty cases. – Ann Emerg Med, 14(2): 126-130.
246. Osaghae, D. O. (2011): Animal and human bites in children. – West Afr J Med, 30(6): 421-424.
247. Overbeek, R., T. Begley, R. M. Butler, J. V. Choudhuri, H. Y. Chuang, M. Cohoon, V. de Crecy-Lagard, N. Diaz, T. Disz, R. Edwards, M. Fonstein, E. D.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Frank, S. Gerdes, E. M. Glass, A. Goesmann, A. Hanson, D. Iwata-Reuyl, R. Jensen, N. Jamshidi, L. Krause, M. Kubal, N. Larsen, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, H. Neuweger, G. Olsen, R. Olson, A. Osterman, V. Portnoy, G. D. Pusch, D. A. Rodionov, C. Ruckert, J. Steiner, R. Stevens, I. Thiele, O. Vassieva, Y. Ye, O. Zagnitko, V. Vonstein (2005): The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. – *Nucleic Acids Res*, 33(17): 5691-5702.
248. Palmer, R., E. Drinan, T. Murphy (1994): A previously unknown disease of farmed Atlantic salmon: pathology and establishment of bacterial aetiology. – *Dis Aquat Org*, 19: 7-14.
249. Parker, F., N. P. Hudson (1926): The etiology of Haverhill fever (*Erythema arthriticum epidemicum*). – *Am J Pathol*, 2(5): 357-380 357.
250. Pearson, T., J. D. Busch, J. Ravel, T. D. Read, S. D. Rhoton, J. M. U'Ren, T. S. Simonson, S. M. Kachur, R. R. Leadem, M. L. Cardon, M. N. Van Ert, L. Y. Huynh, C. M. Fraser, P. Keim (2004): Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. – *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(37): 13536-13541.
251. Peel, M. M. (1993): Dog-associated bacterial infections in humans: isolates submitted to an Australian reference laboratory, 1981-1992. – *Pathol*, 25(4): 379-384.
252. Pineda, F. J., M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker, J. S. Lin (2003): Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. – *Anal Chem*, 75(15): 3817-3822.
253. Pins, M. R., J. M. Holden, J. M. Yang, S. Madoff, M. J. Ferraro (1996): Isolation of presumptive *Streptobacillus moniliformis* from abscesses associated with the female genital tract. – *Clin Infect Dis*, 22(3): 471-476.
254. Place, E. H., L. E. Sutton, O. Willner (1926): *Erythema arthriticum epidemicum* — Preliminary Report. – *Boston Med Surg J*, 194: 285-287.
255. Place, E. H., L. E. Sutton, O. Willner (1934): *Erythema arthriticum epidemicum* (Haverhill fever) — *Arch Intern Med (Chic)*, 54(5): 659-684.
256. Potrikus, C. J., J. A. Breznak (1980a): Anaerobic degradation of uric acid by gut bacteria of termites. – *Appl Environ Microbiol*, 40(1): 125-132.

9. LITERATURVERZEICHNIS

257. Potrikus, C. J., J. A. Breznak (1980b): Uric acid-degrading bacteria in guts of termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. – Appl Environ Microbiol, 40(1): 117-124.
258. Pourcel, C., G. Vergnaud, *Strain typing using multiple "Variable Number of Tandem Repeat" analysis and genetic element CRISPR*, in *Molecular Microbiology: Diagnostics, Principles and Practice*, Persing, D., F. Tenover, Y. Tang, F. Nolte, R. Hayden, A. van Belkum, Editors. 2011, ASM Press: Washington, DC. p. 179-197.
259. Prager, L., R. W. Frenck, Jr. (1994): *Streptobacillus moniliformis* infection in a child with chickenpox. – Pediatr Infect Dis J, 13(5): 417-418.
260. Puri, K., D. H. Taft, N. Ambalavanan, K. R. Schibler, A. L. Morrow, S. G. Kallapur (2016): Association of chorioamnionitis with aberrant neonatal gut colonization and adverse clinical outcomes. – PLoS One, 11(9): e0162734.
261. Qin, Q. L., B. B. Xie, X. Y. Zhang, X. L. Chen, B. C. Zhou, J. Zhou, A. Oren, Y. Z. Zhang (2014): A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. – J Bacteriol, 196(12): 2210-2215.
262. Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F. O. Glockner (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. – Nucleic Acids Res, 41(Database issue): D590-596.
263. Quinn, R. A., J. A. Navas-Molina, E. R. Hyde, S. J. Song, Y. Vazquez-Baeza, G. Humphrey, J. Gaffney, J. J. Minich, A. V. Melnik, J. Herschend, J. DeReus, A. Durant, R. J. Dutton, M. Khosroheidari, C. Green, R. da Silva, P. C. Dorrestein, R. Knight (2016): From sample to multi-omics conclusions in under 48 hours. – mSystems, 2016 Apr 26;1(2). pii: e00038-16.
264. Razin, S., C. Boschwitz (1968): The membrane of the *Streptobacillus moniliformis* L-phase. – J Gen Microbiol, 54(1): 21-32.
265. Regnath, T., N. Kurb, M. Wolf, R. Ignatius (2015): Rattenbissfieber – zwei Fälle von Infektionen mit *Streptobacillus moniliformis* innerhalb von zwei Monaten. – Dtsch Med Wochenschr 140(10): 741-743.
266. Ren, W., Q. Zhang, X. Liu, S. Zheng, L. Ma, F. Chen, T. Xu, B. Xu (2016a): Supragingival plaque microbial community analysis of children with halitosis. – J Microbiol Biotechnol, 26(12): 2141-2147.

9. LITERATURVERZEICHNIS

267. Ren, W., Z. Xun, Z. Wang, Q. Zhang, X. Liu, H. Zheng, Q. Zhang, Y. Zhang, L. Zhang, C. Wu, S. Zheng, N. Qin, S. D. Ehrlich, Y. Li, X. He, T. Xu, T. Chen, F. Chen (2016b): Tongue coating and the salivary microbial communities vary in children with halitosis. – *Sci Rep*, 6: 24481.
268. Richter, M., R. Rossello-Mora (2009): Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. – *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(45): 19126-19131.
269. Riviere, D., V. Desvignes, E. Pelletier, S. Chaussonnerie, S. Guermazi, J. Weissenbach, T. Li, P. Camacho, A. Sghir (2009): Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. – *ISME J*, 3(6): 700-714.
270. Rodriguez-Campos, S., N. H. Smith, M. B. Boniotti, A. Aranaz (2014): Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. – *Res Vet Sci*, 97 Suppl: S5-S19.
271. Rohde, J., C. Rapsch, M. Fehr (2008): Fallbericht: Abszess durch *Streptobacillus moniliformis* bei einer Ratte – *Prakt Tierarzt*, 89(6): 466-473.
272. Rothe, K., M. Tsokos, W. Handrick (2015): Animal and human bite wounds. – *Dtsch Ärztebl Int*, 112(25): 433-442; quiz 443.
273. Roughgarden, J. W. (1965): Antimicrobial therapy of ratbite fever. A review. – *Archives of Internal Medicine*, (116): 39-54.
274. Row, R. (1918): Cutaneous spirochetosis produced by rat bite in Bombay. – *Bulletin de la Societe´ de Pathologie Exotique*, 11: 188-195.
275. Rowbotham, T. J. (1983): Rapid identification of *Streptobacillus moniliformis*. – *Lancet*, 2(8349): 567.
276. Rumley, R. L., N. A. Patrone, L. White (1987): Rat-bite fever as a cause of septic arthritis: a diagnostic dilemma. – *Ann Rheum Dis*, 46(10): 793-795.
277. Rupp, M. E. (1992): *Streptobacillus moniliformis* endocarditis: case report and review. – *Clin Infect Dis*, 14(3): 769-772.
278. Russell, E. G., E. F. Straube (1979): Streptobacillary pleuritis in a koala (*Phascolarctos cinereus*). – *J Wildl Dis*, 15(3): 391-394.
279. Ruths, D., L. Nakhleh (2005): Recombination and phylogeny: effects and detection. – *Int J Bioinform Res Appl*, 1(2): 202-212.

9. LITERATURVERZEICHNIS

280. Rygg, M., C. F. Bruun (1992): Rat bite fever (*Streptobacillus moniliformis*) with septicemia in a child. – Scand J Infect Dis, 24(4): 535-540.
281. Saitou, N., M. Nei (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – Mol Biol Evol, 4(4): 406-425.
282. Saltykova, I. V., V. A. Petrov, M. D. Logacheva, P. G. Ivanova, N. V. Merzlikin, A. E. Sazonov, L. M. Ogorodova, P. J. Brindley (2016): Biliary microbiota, gallstone disease and infection with *Opisthorchis felineus*. – PLoS Negl Trop Dis, 10(7): e0004809.
283. Sartor, R. B., G. D. Wu (2016): Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. – Gastroenterology, 152(2): 327-339.e4.
284. Sato, R., A. Kuriyama, M. Nasu (2016): Rat-bite fever complicated by vertebral osteomyelitis: A case report. – J Infect Chemother, 22(8): 574-576.
285. Savage, N., *Genus Streptobacillus Levaditi, Nicolau and Poincloux 1925*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N. R., J. G. Holt, Editors. 1984, Williams and Wilkins: Baltimore, USA. p. 598-600.
286. Savage, N. L. (1972): Host-parasite relationships in experimental *Streptobacillus moniliformis* arthritis in mice. – Infect Immun, 5(2): 183-190.
287. Sawicki, L., H. M. Bruce, C. H. Andrewes (1962): *Streptobacillus moniliformis* infection as a probable cause of arrested pregnancy and abortion in laboratory mice. – Br J Exp Pathol, 43: 194-197.
288. Schabereiter-Gurtner, C., S. Maca, S. Kaminsky, S. Rolleke, W. Lubitz, T. Barisani-Asenbauer (2002): Investigation of an anaerobic microbial community associated with a corneal ulcer by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. – Diagn Microbiol Infect Dis, 43(3): 193-199.
289. Schleifer, K. H. (2009): Classification of bacteria and archaea: past, present and future. – Syst Appl Microbiol, 32(8): 533-542.
290. Schottmüller, H. (1914): Zur Ätiologie und Klinik der Bisskrankheit (Ratten-, Katzen-, Eichhörnchen-Bisskrankheit). – Dermatol Wochenschr Ergänzungsh, 58: 77-103.
291. Sebald, M., *Etude sur les bacteries anaerobies gram-negatives asporulees 1962*, Theses de L'universite Paris, Imprimerie Barneoud S. A. Laval, France. p. 171.

9. LITERATURVERZEICHNIS

292. Seifert, L., I. Wiechmann, M. Harbeck, A. Thomas, G. Grupe, M. Projahn, H. C. Scholz, J. M. Riehm (2016): Genotyping *Yersinia pestis* in historical plague: evidence for long-term persistence of *Y. pestis* in Europe from the 14th to the 17th century. – PLoS One, 11(1): e0145194.
293. Seijo, A., J. Monroig, C. Romer, H. Coto (2009): Clinical and epidemiological analysis of rat bites in Buenos Aires [in Spanish]. – Medicina (B Aires), 69(2): 259-264.
294. Senderovich, Y., M. Halpern (2012): Bacterial community composition associated with chironomid egg masses. – J Insect Sci, 12: 149.
295. Sens, M. A., E. W. Brown, L. R. Wilson, T. P. Crocker (1989): Fatal *Streptobacillus moniliformis* infection in a two-month-old infant. – Am J Clin Pathol, 91(5): 612-616.
296. Shabalina, S. A., A. Y. Ogurtsov, V. A. Kondrashov, A. S. Kondrashov (2001): Selective constraint in intergenic regions of human and mouse genomes. – Trends Genet, 17(7): 373-376.
297. Shah, H. N., I. Olsen, K. Bernard, S. M. Finegold, S. Gharbia, R. S. Gupta (2009): Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. – Anaerobe, 15(5): 179-194.
298. Shanson, D. C., B. G. Gazzard, J. Midgley, J. Dixey, G. L. Gibson, J. Stevenson, R. G. Finch, J. Cheesbrough (1983): *Streptobacillus moniliformis* isolated from blood in four cases of Haverhill fever. – Lancet, 2(8341): 92-94.
299. Sheikholeslami, N. Z., M. Rezaeian, Z. Salem (2009): Epidemiology of animal bites in Rafsanjan, southeast of Islamic Republic of Iran, 2003-05. – East Mediterr Health J, 15(2): 455-457.
300. Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery, D. H. Smith, M. Waddington, D. E. Dodge, D. A. Bost, M. Riehm, S. Naidich, B. N. Kreiswirth (1999): Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. – J Clin Microbiol, 37(11): 3556-3563.
301. Shukla, S. K., P. R. Meier, P. D. Mitchell, D. N. Frank, K. D. Reed (2002): *Leptotrichia amnionii* sp. nov., a novel bacterium isolated from the amniotic fluid of a woman after intrauterine fetal demise. – J Clin Microbiol, 40(9): 3346-3349.

9. LITERATURVERZEICHNIS

302. Shvartsblat, S., M. Kochie, P. Harber, J. Howard (2004): Fatal rat bite fever in a pet shop employee. – *Am J Ind Med*, 45(4): 357-360.
303. Sigge, A., A. Essig, B. Wirths, K. Fickweiler, N. Kaestner, N. Wellinghausen, S. Poppert (2007): Rapid identification of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* by fluorescence in situ hybridization. – *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(2): 255-259.
304. Smallwood, R. P. (1929): Rat bite fever from the bite of a pig. – *Brit Med J*, 29: 1159.
305. Smith, C. D., C. C. Sampson (1960): Studies of *Streptobacillus moniliformis* from a case of human rat-bite fever. – *Am J Med Technol*, 26: 47-50.
306. Smith, S. H., R. G. Murray, M. Hall (1994): The surface structure of *Leptotrichia buccalis*. – *Can J Microbiol*, 40(2): 90-98.
307. Smith, T. (1918): A pleomorphic bacillus from pneumonic lungs of calves simulating actinomyces. – *J Exp Med*, 28(3): 333-344.
308. Smith, W. (1941): Cervical abscesses of guinea-pigs. – *Journal of Pathology and Bacteriology*, 37: 29-37.
309. Sober, E., *Reconstructing the past: parsimony, evolution, and inference*. 1988, Cambridge: MIT Press.
310. Söderberg, G., A. A. Lindberg, C. E. Nord (1979): *Bacteroides fragilis* in acute salpingitis. – *Infection*, 7(5): 226-230.
311. Spear, G. T., M. Sikaroodi, M. R. Zariffard, A. L. Landay, A. L. French, P. M. Gillevet (2008): Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis. – *J Infect Dis*, 198(8): 1131-1140.
312. Spear, G. T., E. Kersh, P. Guenther, S. A. Vishwanathan, D. Gilbert, M. R. Zariffard, P. Mirmonsef, A. Landay, L. Zheng, P. Gillevet (2012): Longitudinal assessment of pigtailed macaque lower genital tract microbiota by pyrosequencing reveals dissimilarity to the genital microbiota of healthy humans. – *AIDS Res Hum Retroviruses*, 28(10): 1244-1249.
313. Sprecher, M. H., J. R. Copeland (1947): Haverhill fever due to *Streptobacillus moniliformis* treated with streptomycin. – *J Am Med Assoc*, 134(12): 1014-1016.

9. LITERATURVERZEICHNIS

314. St Geme, J. W., 3rd, D. Cutter (2000): The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. – *J Bacteriol*, 182(21): 6005-6013.
315. Stackebrandt, E., M. Goodfellow, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Stackebrandt, E., M. Goodfellow, Editors. 1991, John Wiley & Sons, Chichester: New York. p. 19-29.
316. Staley, J. T., W. B. Whitman, *Family II. Leptotrichiaceae fam. nov.*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, N. Krieg, J. S., D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig & W. Whitman, Editor. 2011, Springer: New York. p. 766.
317. Stamatakis, A. (2006): RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. – *Bioinformatics*, 22(21): 2688-2690.
318. Stamatakis, A. (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. – *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.
319. Strauss, J., A. White, C. Ambrose, J. McDonald, E. Allen-Vercoe (2008): Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut. – *Anaerobe*, 14(6): 301-309.
320. Strong, T., S. Dowd, A. F. Gutierrez, J. Coffman (2013): Amplicon pyrosequencing of wild duck eubacterial microbiome from a fecal sample reveals numerous species linked to human and animal diseases [v1; ref status: awaiting peer review, <http://f1000r.es/1yy>]. – *F1000Research*, 2(224): 1-7.
321. Stuessy, T. F., *Plant taxonomy. The systematic evaluation of comparative data*. 1990, New York NY Columbia University Press.
322. Sun, D., H. Zhang, S. Lv, H. Wang, D. Guo (2013): Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of other *Fusobacterium* species. – *Res Vet Sci*, 95(1): 27-33.
323. Swartz, J. D., M. Lachman, K. Westveer, T. O'Neill, T. Geary, R. W. Kott, J. G. Berardinelli, P. G. Hatfield, J. M. Thomson, A. Roberts, C. J. Yeoman (2014): Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique

9. LITERATURVERZEICHNIS

- microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. – *Front Vet Sci*, 1: 19.
324. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. – *Mol Biol Evol*, 30(12): 2725-2729.
325. Tatusov, R. L., M. Y. Galperin, D. A. Natale, E. V. Koonin (2000): The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. – *Nucleic Acids Res*, 28(1): 33-36.
326. Terti, R., M. Skurnik, T. Vartio, P. Kuusela (1992): Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. – *Infect Immun*, 60(7): 3021-3024.
327. Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. – *Nucleic Acids Res*, 22(22): 4673-4680.
328. Tindall, B. J., P. Kämpfer, J. P. Euzeby, A. Oren (2006): Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 11): 2715-2720.
329. Tindall, B. J., G. M. Garrity (2008): Proposals to clarify how type strains are deposited and made available to the scientific community for the purpose of systematic research. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 8): 1987-1990.
330. Tindall, B. J., R. Rossello-Mora, H. J. Busse, W. Ludwig, P. Kämpfer (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 1): 249-266.
331. Torres, A., E. Cuende, M. De Pablos, M. J. Lezaun, L. Michaus, J. C. Vesga (2001): Remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema associated with subcutaneous *Streptobacillus moniliformis* abscess. – *J Rheumatol*, 28(7): 1696-1698.
332. Torres, L., A. I. Lopez, S. Escobar, C. Marne, M. L. Marco, M. Perez, J. Verhaegen (2003): Bacteremia by *Streptobacillus moniliformis*: first case described in Spain. – *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(4): 258-260.
333. Ucke, A. (1898): Ein Beitrag zur Kenntnis der Anaëroben. – *Centbl Bakt*, 1 Abt. 23 996-1001

9. LITERATURVERZEICHNIS

334. Valverde, C. R., L. J. Lowenstine, C. E. Young, R. P. Tarara, J. A. Roberts (2002): Spontaneous rat bite fever in non-human primates: a review of two cases. – *J Med Primatol*, 31(6): 345-349.
335. Vemelen, K., I. Mertens, J. Thomas, J. Vandeven, J. Verhaegen, L. Verbist (1996): Bacteraemia with *Leptotrichia buccalis*: report of a case and review of the literature. – *Acta Clin Belg*, 51(4): 265-270.
336. Vergnaud, G., C. Pourcel (2009): Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. – *Methods Mol Biol*, 551: 141-158.
337. Vogler, A. J., P. Keim, D. M. Wagner (2016): A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: from phenotypes to whole genome sequencing. – *Infect Genet Evol*, 37: 21-36.
338. von Mentzer, A., T. R. Connor, L. H. Wieler, T. Semmler, A. Iguchi, N. R. Thomson, D. A. Rasko, E. Joffre, J. Corander, D. Pickard, G. Wiklund, A. M. Svennerholm, A. Sjoling, G. Dougan (2014): Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. – *Nat Genet*, 46(12): 1321-1326.
339. Wang, T. K., S. S. Wong (2007): *Streptobacillus moniliformis* septic arthritis: a clinical entity distinct from rat-bite fever? – *BMC Infect Dis*, 7: 56.
340. Wang, X., T. K. Wood (2011): Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. – *Appl Environ Microbiol*, 77(16): 5577-5583.
341. Wang, X., C. S. Buhimschi, S. Temoin, V. Bhandari, Y. W. Han, I. A. Buhimschi (2013): Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. – *PLoS One*, 8(2): e56131.
342. Washburn, R. G., *Streptobacillus moniliformis* (rat-bite fever), in *Principles and practice of infectious diseases. Vol 2.*, Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. G. Dolin, Editors. 1995, Churchill Livingstone: New York. p. 2084–2086.
343. Washburn, R. G., *Streptobacillus moniliformis* (Rat bite fever), in *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. Dolin, Editors. 2000, Churchill Livingstone: New York. p. 2422-2424.

9. LITERATURVERZEICHNIS

344. Washburn, R. G., *Spirillum minus* (rat bite fever), in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. Dolin, Editors. 2005, Elsevier Churchill Livingstone: Philadelphia, PA. p. 2810.
345. Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, H. G. Trüper (1987): Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. – *Int J Syst Bacteriol* 37: 463–464.
346. Wertz, J., N. Isaacs-Cosgrove, C. Holzman, T. L. Marsh (2008): Temporal shifts in microbial communities in nonpregnant African-American women with and without bacterial vaginosis. – *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2008: 181253.
347. Wilkins, E. G., J. G. Millar, P. M. Cockcroft, O. A. Okubadejo (1988): Rat-bite fever in a gerbil breeder. – *J Infect*, 16(2): 177-180.
348. Wittler, R. G., S. G. Cary, *Genus Streptobacillus Levaditi*, in *Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edition*, Buchanan, R. E., N. E. Gibbons, Editors. 1974, Williams & Wilkins Co.: Baltimore. p. 378-381.
349. Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. – *Microbiol Rev*, 51(2): 221-271.
350. Woo, P. C., S. S. Wong, J. L. Teng, K. W. Leung, A. H. Ngan, D. Q. Zhao, H. Tse, S. K. Lau, K. Y. Yuen (2010): *Leptotrichia hongkongensis* sp. nov., a novel *Leptotrichia* species with the oral cavity as its natural reservoir. – *J Zhejiang Univ Sci B*, 11(6): 391-401.
351. Woo, P. C., A. K. Wu, C. C. Tsang, K. W. Leung, A. H. Ngan, S. O. Curreem, K. W. Lam, J. H. Chen, J. F. Chan, S. K. Lau (2014): *Streptobacillus hongkongensis* sp. nov., isolated from patients with quinsy and septic arthritis, and emended descriptions of the genus *Streptobacillus* and the species *Streptobacillus moniliformis*. – *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 9): 3034-3039.
352. Wouters, E. G., H. T. Ho, L. J. Lipman, W. Gaastra (2008): Dogs as vectors of *Streptobacillus moniliformis* infection? – *Vet Microbiol*, 128(3-4): 419-422.
353. Wullenweber, M., J. Kaspereit-Rittinghausen, M. Farouq (1990): *Streptobacillus moniliformis* epizootic in barrier-maintained C57BL/6J mice and susceptibility to infection of different strains of mice. – *Lab Anim Sci*, 40(6): 608-612.

9. LITERATURVERZEICHNIS

354. Wullenweber, M., H. J. Hedrich, I. C. Reetz (1991): Susceptibility to streptobacillosis of mice is highly influenced by genetic factors. – AALAS Bulletin, 30: 43.
355. Wullenweber, M., C. Jonas, I. Kunstyr (1992): *Streptobacillus moniliformis* isolated from otitis media of conventionally kept laboratory rats. – J Exp Anim Sci, 35(1): 49-57.
356. Wullenweber, M. (1995): *Streptobacillus moniliformis* - a zoonotic pathogen. Taxonomic considerations, host species, diagnosis, therapy, geographical distribution. – Lab Anim, 29(1): 1-15.
357. Xenoulis, P. G., B. Palculict, K. Allenspach, J. M. Steiner, A. M. Van House, J. S. Suchodolski (2008): Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. – FEMS Microbiol Ecol, 66(3): 579-589.
358. Xu, H., W. Hao, Q. Zhou, W. Wang, Z. Xia, C. Liu, X. Chen, M. Qin, F. Chen (2014): Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. – PLoS One, 9(2): e89269.
359. Xu, J., X. Chen, S. Yu, Y. Su, W. Zhu (2016): Effects of early intervention with sodium butyrate on gut microbiota and the expression of inflammatory cytokines in neonatal piglets. – PLoS One, 11(9): e0162461.
360. Yadav, J. S., S. Pradhan, R. Kapoor, H. Bangar, B. B. Burzynski, D. R. Prows, L. Levin (2011): Multigenic control and sex bias in host susceptibility to spore-induced pulmonary anthrax in mice. – Infect Immun, 79(8): 3204-3215.
361. Yamamoto, R., G. T. Clark (1966): *Streptobacillus moniliformis* infection in turkeys. – Vet Rec, 79(4): 95-100.
362. Yarza, P., M. Richter, J. Peplies, J. Euzeby, R. Amann, K. H. Schleifer, W. Ludwig, F. O. Glockner, R. Rossello-Mora (2008): The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. – Syst Appl Microbiol, 31(4): 241-250.
363. Young, C., A. Hill (1974): Conjunctivitis in a colony of rats. – Lab Anim, 8(3): 301-304.
364. Zhang, D., W. He, Q. Tong, J. Zhou, X. Su (2016): Multi-omics analysis on the pathogenicity of *Enterobacter cloacae* ENHKU01 isolated from sewage outfalls along the Ningbo coastline. – Proteome Sci, 14: 15.

9. LITERATURVERZEICHNIS

365. Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. – J Comput Biol, 7(1-2): 203-214.

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich vornehmlich und besonders herzlich bei meiner Frau Mariam und meinem Sohn Massih, denn sie haben mich stets bei dem Vorhaben zur Habilitation unterstützt, auf viele Stunden gemeinsamer Freizeit verzichtet und mir in unzähligen anderen Dingen den Rücken freigehalten. Dies gilt auch insbesondere für meine Eltern und Schwiegereltern sowie alle übrigen Familienmitglieder, die mich durch ihr Korrekturlesen sowie ein unermüdliches Interesse und ihre Freude an diesem Projekt angespornt haben.

Den zündenden Funken hat vor einigen Jahren der Direktor des Hessischen Landeslabors, Herr Professor Dr. Hubertus Brunn, gespendet, der mich stets bei meiner Forschung unterstützte. Er stand mir aber auch während der vergangenen Jahre wohlwollend mit Rat und Tat zur Seite und hat gemeinsam mit meinem vorgesetzten Abteilungsleiter, Herrn Dr. Michael Zschöck, diesen Weg erst ermöglicht. Ich danke beiden, aber auch allen Kolleginnen und Kollegen des Hessischen Landeslabors sowie dem Tierseuchenreferenten im hessischen Umweltministerium, Herrn Dr. Thomas Fröhlich, sehr für das in mich gesetzte Vertrauen, die gewährte Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit.

Am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität (JLU) verdient meine Mentorin, Frau Professorin Dr. Christa Ewers, ein besonders herzliches Dankeschön, denn sie ist mir von Anfang an mit wohlwollender Bereitschaft, fachlichem Rat und ihrem freundlichen und unkomplizierten Wesen entgegengekommen und hat das Gelingen dieser Arbeit auf diese Weise überhaupt erst möglich gemacht. Die offene Tür in mein „Heimatinstitut“ bedeutet mir sehr viel, und ich habe die gemeinsame Zusammenarbeit als sehr produktiv erlebt. Dafür und für die freien Gestaltungsmöglichkeiten bin ich ihr sehr dankbar.

Weiterhin danke ich besonders Herrn Dekan Professor Dr. Dr. (h.c.) Martin Kramer, der mir in ausgesprochen freundlicher Weise den Quereinstieg als externer Habilitand am Fachbereich Veterinärmedizin gestattete. Mein Doktorvater, Herr Professor emerit. Dr. Dr. habil. Georg Baljer, Herr Professor Dr. Christian Menge (inzwischen Friedrich-Loeffler-Institut, Jena), Herr Dr. Reinhard Weiss und schließlich

DANKSAGUNG

Herr Professor Dr. Ernst Petzinger (†) als Leiter des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“ begeisterten mich für die Mikrobiologie sowie die Forschung an sich. Sie haben mir maßgeblich meinen beruflichen Weg ermöglicht, sodass ich ihnen gleichfalls sehr dankbar bin. Darüber hinaus bin ich folgenden Herrschaften am Fachbereich Veterinärmedizin für ihre gute Unterstützung, exzellente und freundliche Beratung, fachliche Zusammenarbeit und wohlmeinende Empfehlungen zu Dank verpflichtet: Professor Dr. Rolf Bauerfeind, Professor Dr. Dr. habil. Gerald Reiner, Professor Dr. Axel Wehrend, Professor Dr. Michael Bülte, Professor Dr. Joachim Geyer, Professor Dr. Christoph Lämmler, Professor Dr. Michael Lierz, Professorin Dr. Anja Taubert, Professor Dr. Carlos Hermosilla, Privatdozent Dr. Christoph Rummel, Privatdozent Dr. Martin Schmidt, Dr. Ellen Prenger-Berninghoff, Dr. Werner Herbst und Dr. Carsten Heydel.

Meinen Kolleginnen und Kollegen des Fachgebiets bakteriologische und mykologische Diagnostik am Hessischen Landeslabors danke ich für die durchgängig gute, freundliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit und die nicht immer einfach zu bewältigenden Sonderwünsche, die ich ihnen zum Gelingen dieser Arbeit zugemutet habe. Besonders erwähnt seien in diesem Zusammenhang für ihre exzellente Unterstützung die Damen und Herren Anna Mohr, Ulrike Kling, Katharina Engel, Asmahan Omar, Jens Heinbächer, Mersiha Curić, Michaela Fdil, Holger Emmrich, Barbara Gamb, Ahmad Fawzy, Dr. Karen Schlez und Dr. Viola Spamer.

Es war aufregend und zugleich sehr zufriedenstellend, im Rahmen dieser Arbeiten Netzwerke aufbauen und gute und zukunftsweisende wissenschaftliche Kooperationen eingehen zu können. Ich bin folgenden Kolleginnen und Kollegen daher besonders dankbar: Herrn Dr. Werner Nicklas (ehemals Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg), Herrn Dr. Jörg Rau (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart), Herrn Dr. Torsten Semmler (Robert Koch-Institut, Berlin), Frau Dr. Stefanie Glaeser (AG Prof. Kämpfer, JLU), Herrn Vizepräsident der JLU, Professor Dr. Peter Kämpfer, Frau Dr. Nicola Hofmann (Institut für Mehrphasenprozesse, Hannover), Frau Dr. Sabine Gronow (Leibniz-Institut – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [DSMZ], Braunschweig), Frau Ursula Leidner (AG Prof. Ewers, JLU), Herrn Dr. Norman Mauder (inzwischen Bruker Daltonik, Bremen), Herrn Dr. Koichi Imaoka (National Institute of Infectious Diseases, Tokio, Japan), Herrn Dr. Roy Palmer (Maribio

DANKSAGUNG

Consultants, Irland), Herrn Dr. Antoine Guillon (CHU Tours, Service de Réanimation Polyvalente, Tours, France), Frau Dr. Birgit Drescher (Stuttgart) und Frau Khayrieh Aledelbi (Merlin Micronaut, Bornheim).

Die folgenden Personen trugen ferner zum Gelingen dieser Arbeiten bei, indem sie freundlicherweise bakterielle Stämme bzw. Bildmaterial zur Verfügung stellten: Dr. Walter Geißdörfer (Universitätsklinikum Erlangen), Dr. Judith Rohde (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), Professor Dr. Bernard La Scola (Hôpital de la Timone, Marseille), Dr. Koichi Imaoka (Tokio), Dr. Nobuhito Hayashimoto (ICLAS Monitoring Centre, Kawasaki, Japan), Frau Ingrid Bunse (Köln), Dr. Larry Jon Friesen (Santa Barbara City College, USA) und Simon Tonge (Whitley Wildlife Conservation Trust, Devon, UK).

Nicht zuletzt geht mein Dank an meinen Freund Oliver Büttner für Ratschläge und Hilfestellungen bei der Erstellung der Printversion dieser Habilitationsschrift sowie für seine langjährige Freundschaft.

Allen nicht im Einzelnen namentlich erwähnten Personen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Habilitation beitrugen, danke ich abschließend.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6667-3



9 7 8 3 8 3 5 9 6 6 6 7 3