

**MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN AN
MUTMASSLICHEN VIRULENZMECHANISMEN
UND ANTIBIOTIKARESISTENZEN VON BAKTERIEN
DER GATTUNG *STAPHYLOCOCCUS***

TALAH KANBAR

طلة وليد قنبر

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2009

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 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Lämmler

**Molekulare Untersuchungen an mutmaßlichen
Virulenzmechanismen und Antibiotikaresistenzen
von Bakterien der Gattung *Staphylococcus***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Talah Kanbar

Tierärztin aus Hama, Syrien

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. C. Lämmler

Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

Tag der Disputation: 19.06.2009

إلى أبي وأمي

Meinen Eltern

Erklärung nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität
Gießen:

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Eigenschaften von Bakterien der Gattung <i>Staphylococcus</i>	2
2.2	Bedeutung von Staphylokokken als Krankheitserreger bei Mensch und Tier	2
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.4	<i>Staphylococcus intermedius</i> -Gruppe (SIG).....	5
2.4.1	<i>Staphylococcus intermedius</i>	6
2.4.2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	6
2.4.3	<i>Staphylococcus delphini</i>	7
2.5	<i>Staphylococcus hyicus</i>	7
2.6	Exfoliative Toxine.....	8
2.6.1	Exfoliative Toxine bei <i>S. aureus</i>	8
2.6.2	Exfoliative Toxine bei SIG	10
2.6.3	Exfoliative Toxine bei <i>S. hyicus</i> und <i>S. chromogenes</i>	10
2.7	Zielgene zur molekularen Identifizierung von Staphylokokken	12
3	Material und Methoden	18
3.1	Bakterienkulturen	18
3.2	Anzüchtungsmedien	21
3.3	Subkultivierung der Kulturen.....	21
3.4	Konservierung der Kulturen.....	21
3.5	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller Verfahren.....	22
3.5.1	Differenzierung der Hämolyseformen	22
3.5.2	Nachweis des Enzyms Katalase	22
3.5.3	Nachweis der Koagulasereaktion	23
3.5.4	Nachweis des Clumping-Factors.....	23
3.5.5	Nachweis des Enzyms β -Galactosidase	23
3.5.6	Nachweis des Enzyms Hyaluronidase.....	24
3.5.7	Voges-Proskauer-Test	24
3.5.8	Empfindlichkeit gegenüber Colistin.....	24
3.6	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten.....	25
3.6.1	Agardiffusionstest	25
3.6.2	Wachstum auf Oxacillinresistenz-Screening-Agar-Basis (ORSAB)	25
3.7	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren	26
3.7.1	DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“	26
3.7.2	Vereinfachte Präparation der bakteriellen DNA	26
3.7.3	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.7.4	Agarosegelelektrophorese	27
3.7.5	Ethidiumbromidfärbung	27
3.7.6	DNA Präparation aus Agarosegelen und Sequenzierung.....	28
3.7.7	Untersuchung der <i>S. aureus</i> -Kulturen	28
3.7.7.1	Identifizierung	28
3.7.7.1.1	Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i>	28
3.7.7.1.2	Nachweis eines <i>S. aureus</i> -spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA.....	29
3.7.7.1.3	Nachweis des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens <i>spa</i>	29
3.7.7.2	Weitergehende Charakterisierung	29
3.7.7.2.1	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>eta</i> und <i>etb</i> durch Multiplex-PCR	29

3.7.7.2.2	Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i>	30
3.7.7.2.3	Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i>	31
3.7.8	Untersuchung der <i>S. intermedius</i> -Kulturen	31
3.7.8.1	Identifizierung	31
3.7.8.1.1	Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i> durch Multiplex-PCR	31
3.7.8.1.2	Nachweis des <i>dnaJ</i> -Gens von <i>S. intermedius</i>	32
3.7.8.2	Weitergehende Charakterisierung	32
3.7.8.2.1	Nachweis des Exfoliativen Toxingens <i>siet</i>	32
3.7.8.2.2	Nachweis des Enterotoxingens <i>se-int</i>	33
3.7.8.2.3	Nachweis der Leukotoxin-kodierenden Gene <i>lukS</i> und <i>lukF</i> durch Multiplex-PCR	33
3.7.8.2.4	Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i>	34
3.7.8.2.5	Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i>	34
3.7.8.2.6	Nachweis von Resistenzgenen durch Multiplex-PCR	34
3.7.9	Untersuchung der <i>S. hyicus</i> -Kulturen	35
3.7.9.1	Identifizierung	35
3.7.9.1.1	Nachweis eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens <i>sodA</i>	35
3.7.9.1.2	Nachweis eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR)	35
3.7.9.2	Weitergehende Charakterisierung	36
3.7.9.2.1	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>exhA</i> , <i>exhB</i> , <i>exhC</i> und <i>exhD</i> durch Multiplex-PCR	36
3.7.9.2.2	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>sheta</i> und <i>shetb</i> von <i>S. hyicus</i> ...	37
3.7.10	Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese	37
3.7.10.1	Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA	37
3.7.10.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Staphylokokkenkulturen mittels konventioneller Verfahren	39
4.1.1	Differenzierung der Hämolyseformen	39
4.1.2	Phänotypische Eigenschaften	40
4.1.3	Empfindlichkeit gegenüber Colistin	41
4.2	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten	42
4.2.1	Agardiffusionstest	42
4.2.2	Wachstum auf Oxacillinresistenz-Screening-Agar-Basis (ORSAB)	42
4.3	Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren	43
4.3.1	Untersuchung der <i>S. aureus</i> -Kulturen	43
4.3.1.1	Identifizierung	43
4.3.1.1.1	Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i>	43
4.3.1.1.2	Nachweis des <i>S. aureus</i> -spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA	43
4.3.1.1.3	Nachweis des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens <i>spa</i>	44
4.3.1.2	Weitergehende Charakterisierung	46

4.3.1.2.1	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>eta</i> und <i>etb</i> durch Multiplex-PCR	46
4.3.1.2.2	Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i>	47
4.3.1.2.3	Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i>	50
4.3.2	Untersuchung der SIG-Kulturen	54
4.3.2.1	Identifizierung	54
4.3.2.1.1	Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i> durch Multiplex-PCR	54
4.3.2.1.2	Nachweis des <i>dnaJ</i> -Gens von SIG	55
4.3.2.2	Weitergehende Charakterisierung	56
4.3.2.2.1	Nachweis des Exfoliativen Toxingens <i>siet</i>	56
4.3.2.2.2	Nachweis des Enterotoxingens <i>se-int</i>	60
4.3.2.2.3	Nachweis der Leukotoxin-kodierenden Gene <i>lukS</i> und <i>lukF</i> durch Multiplex-PCR	62
4.3.2.2.4	Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i>	63
4.3.2.2.5	Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i>	65
4.3.2.2.6	Nachweis von Resistenzgenen durch Multiplex-PCR	67
4.3.2.2.7	Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse	69
4.3.3	Untersuchung der <i>S. hyicus</i> -Kulturen	71
4.3.3.1	Identifizierung	71
4.3.3.1.1	Nachweis eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens <i>sodA</i>	71
4.3.3.1.2	Nachweis eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR)	72
4.3.3.2	Weitergehende Charakterisierung	73
4.3.3.2.1	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>exhA</i> , <i>exhB</i> , <i>exhC</i> und <i>exhD</i> durch Multiplex-PCR	73
4.3.3.2.2	Nachweis der Exfoliativen Toxingene <i>sheta</i> und <i>shetb</i> von <i>S. hyicus</i>	81
4.3.4	Dendrogrammanalyse der Exfoliativen Toxingene	81
5	Diskussion	87
5.1	Differenzierung der Hämolyseformen	87
5.2	Phänotypische Eigenschaften	89
5.3	Empfindlichkeit gegenüber Colistin	91
5.4	Untersuchung der <i>S. aureus</i> -Kulturen	91
5.4.1	Identifizierung	91
5.4.2	Weitergehende Charakterisierung	93
5.5	Untersuchung der <i>S. intermedius</i> -Gruppe (SIG)	94
5.5.1	Identifizierung	94
5.5.2	Weitergehende Charakterisierung	95
5.6	Antibiotische Resistenzgene	97
5.7	Untersuchung der <i>S. hyicus</i> -Kulturen	99
5.7.1	Identifizierung	99
5.7.2	Weitergehende Charakterisierung	99
6	Zusammenfassung	101
7	Summary	102
8	Literaturverzeichnis	103
9	Anhang	118
9.1	Tabellenverzeichnis	118
9.2	Abbildungsverzeichnis	119

Abkürzungsverzeichnis

Übersicht der häufig verwendeten Abkürzungen oder Einheiten

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d.h.	das heißt
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
ETA-D	Exfoliative Toxine von <i>S. aureus</i>
<i>eta bis etd</i>	Exfoliative Toxine A bis D-kodierende Gene von <i>S. aureus</i>
ExhA-D	Exfoliative Toxine von <i>S. hyicus</i>
<i>exhA bis exhD</i>	Exfoliative Toxine A bis D-kodierende Gene von <i>S. hyicus</i>
g	Gramm
G	Guanin
h	hora (Stunde)
Ig	Immunglobuline
ISR	intergenic spacer region
Kb	1000 Basen
kDa	1000 Da
l	Liter
m	Milli (10^{-3})
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mm	Millimeter
Mol	absolute Menge einer Substanz
nm	Nanometer
p	Pico (10^{-12})
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RNA	Ribonucleinsäure
s	Sekunde(n)
SHETA und SHETB	Exfoliative Toxine von <i>S. hyicus</i>
<i>sheta und shetb</i>	Exfoliative Toxine SHETA und SHETB-kodierende Gene von <i>S. hyicus</i>
SIET	Exfoliatives Toxin von <i>S. intermedius</i>
<i>siet</i>	Exfoliatives Toxin SIET- kodierendes Gen von <i>S. intermedius</i>
<i>spa</i>	Protein A-kodierendes Gen
T	Thymin
Tab.	Tabelle

U	Unit (Internationale Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
≤	kleiner als oder gleich
≥	größer als oder gleich
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Bakterien der Gattung *Staphylococcus* (S) sind eine häufige Ursache für meist eitrig-entzündliche Krankheitsprozesse bei Tier und Mensch. Aus der ubiquitären Verbreitung dieser Mikroorganismen, beispielsweise als Besiedler gesunder Haut und Schleimhaut, und der Vermehrung auch außerhalb des Wirtsorganismus, ergeben sich vielfältige Ansteckungsmöglichkeiten. Die Gattung *Staphylococcus* umfasst derzeit mehr als 60 Spezies und Subspezies (<http://www.dsmz.de>), wobei allerdings nur einigen Spezies eine gesicherte pathogene Bedeutung zukommt.

Unbestritten ist die pathogene Bedeutung der koagulasepositiven Spezies *S. aureus*, die bei Tieren in Rahmen zahlreicher Erkrankungen isoliert werden kann (ROLLE und MAYR, 2002). Die überwiegend beim Tier vorkommenden Spezies *S. intermedius* und *S. hyicus* spielen eine besondere Rolle als Erreger von Hauterkrankungen (BRÜCKLER et al., 1994).

Exfoliative Toxine oder Epidermolysine sind eine seit langem bekannte Toxingruppe von *S. aureus*, die, insbesondere bei Kindern, zu intraepidermalen Spaltbildungen zwischen dem Stratum spinosum und dem Stratum granulosum der Epidermis führen und so das Krankheitsbild des Staphylococcal Scaled Skin Syndrome (SSSS) manifestieren (PRÉVOST et al., 2003). Die Exsudative Epidermitis des Schweins, ausgelöst durch *S. hyicus*, stellt ein ähnliches Krankheitsbild dar und wird ebenso auf das Vorkommen unterschiedlicher Exfoliativer Toxine zurückgeführt (ANDRESEN, 1998; SATO et al., 2000; ANDRESEN und AHRENS, 2004). Ein vergleichbares Exfoliatives Toxin konnte auch bei *S. intermedius*, isoliert aus Pyodermien von Hunden, nachgewiesen werden (TERAUCHI et al., 2003a).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, *S. aureus*-, *S. intermedius*- und *S. hyicus*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft zu identifizieren und aufgrund phäno- und genotypischer Eigenschaften weitergehend zu charakterisieren. Eine molekulare Identifizierung erfolgte durch PCR-vermittelten Nachweis unterschiedlicher speziesspezifischer Genomabschnitte. Zur weitergehenden Charakterisierung der Staphylokokken wurde das Vorkommen von Exfoliativen Toxingenen, weiteren mutmaßlichen Virulenzgenen und für *S. intermedius* der Nachweis von Antibiotika-Resistenzgenen geprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Eigenschaften von Bakterien der Gattung *Staphylococcus*

Staphylokokken sind grampositive, unbewegliche, aerob bzw. fakultativ anaerob wachsende, katalasepositive, nichtsporenbildende Kokken (SCHLEIFER, 1986). Eine Ausnahme bilden die als katalasenegativ und strikt anaerob beschriebenen Spezies *S. saccharolyticus* und *S. aureus* subsp. *anaerobius* (KILPPER-BÄLZ und SCHLEIFER, 1981; DE LA FUENTE et al., 1985).

Im mikroskopischen Präparat sind Staphylokokken etwa 0,5-1,5 µm große Kugelbakterien, meist unregelmäßig in Haufen angeordnet (SCHLEIFER, 1986).

Die Zellwand der Staphylokokken enthält neben Teichonsäuren auch Peptidoglycane mit Glycyl-Glycin-Interpeptidbrücken, die durch die Glycinase des Lysostaphins gespalten werden können (IVERSEN und GROV, 1973). Nach FALK und GUERING (1983) zeigen Staphylokokken im Gegensatz zu den Mikrokokken neben dieser Lysostaphinempfindlichkeit auch eine Resistenz gegenüber Bacitracin. Beide Eigenschaften können ebenso zur Gattungsdifferenzierung herangezogen werden, wie die von SCHLEIFER und KLOOS (1975) beschriebene Resistenz der Staphylokokken gegenüber Erythromycin. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen können Staphylokokken, mit Ausnahme von *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* und *S. xylosus*, Glucose unter Bildung von Milchsäure abbauen (SCHLEIFER, 1986; WEBSTER et al., 1994; TRÜPER und DÉ CLARI, 1998). Als Elektronenüberträger in der Atmungskette verfügen Staphylokokken über Cytochrome vom b-Typ und in geringen Konzentrationen auch vom a-Typ; als Ausnahmen sind bei den Spezies *S. caseolyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri* und *S. vitulinus* Cytochrome vom c-Typ nachweisbar (FALLER et al., 1980; FALLER und SCHLEIFER, 1981; SCHLEIFER et al., 1982; WEBSTER et al., 1994; TRÜPER und DÉ CLARI, 1998). Der prozentuale Anteil der Guanin- und Cytosinreste am Gesamtbasengehalt der DNA liegt bei Staphylokokken mit 30-39 mol % relativ niedrig (ROSYPAL et al., 1966).

2.2 Bedeutung von Staphylokokken als Krankheitserreger bei Mensch und Tier

Der Name „Staphylococcus“ stammt von dem griechischen Wort „staphyle“ (Bündel von Weintrauben), bzw. „coccus“ (Beere) (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Bedingt durch ihre Teilung in mehreren Ebenen entstehen Haufenformen. Die traubenförmige Anordnung der Zellen, die der Gattung ihren Namen gegeben hat, wird dagegen nicht so regelmäßig beobachtet, dass sie ein sicheres diagnostisches Kriterium wäre. Nach den Angaben von FITZGERALD und PENADÉS (2008) gelten etwa 40 verschiedene Staphylokokkenarten bei Tieren als potentiell pathogen. Die wichtigsten dieser tierpathogenen Staphylokokkenspezies und die entsprechenden Krankheitsbilder sind in Tab. 1 dargestellt.

Ursprünglich erfolgte die Einteilung der Staphylokokken aufgrund der Koagulasereaktion in koagulasepositive, pathogene und koagulasenegative, wenig oder apathogene Spezies. Eine solche Einteilung erwies sich zunehmend als unzureichend.

Unbestritten ist die pathogene Bedeutung der koagulasepositiven Spezies *S. aureus*, die bei Menschen und Tieren im Rahmen zahlreicher Erkrankungen isoliert werden konnte (ROLLE und MAYR, 2002; BRÜCKLER et al., 1994). Den überwiegend beim Tier vorkommenden koagulasepositiven Spezies *S. intermedius* und *S. hyicus* kommt insbesondere eine pathogene Bedeutung als Erreger von Hauterkrankungen zu (BRÜCKLER et al., 1994). Eine weitere koagulasepositive Spezies konnte von der erkrankten Haut zweier Delfine isoliert und als *S. delphini* identifiziert werden (VARALDO et al., 1988). Die von FOSTER et al. (1997) beschriebene, als *S. lutrae* bezeichnete, koagulasepositive Staphylokokkenspezies wurde von drei tot aufgefundenen Ottern isoliert.

Neben den koagulasepositiven Staphylokokkenspezies werden in zunehmendem Maß auch koagulasenegative Staphylokokkenspezies (CNS) bei Krankheitsprozessen nachgewiesen.

PULVERER und HALSWICK (1967) berichteten über das seit 1939 wiederholte Vorkommen von CNS bei Endocarditiden des Menschen. CNS konnten des weiteren auch als Erreger von Septikämien (OEDING und DIGRANES, 1977), als Erreger bei Komplikationen neurochirurgischer Operationen und Wundinfektionen (GLIMAKER et al., 1988) sowie als Erreger von Harnwegsinfektionen des Menschen isoliert werden (LEIGHTON und LITTLE, 1986; PULVERER et al., 1987; BEUTH et al., 1992). CNS waren ferner die häufigste Ursache für Septikämien bei Neugeborenen und bei unreif Frühgeborenen (MUNSON et al., 1982; BAUMGART et al., 1983; FLEER et al., 1983) sowie bei Menschen mit malignen hämatologischen Erkrankungen (LOWDER et al., 1982; WADE et al., 1982; WINSTON et al., 1983). Nach FLEER und VERHOEF (1984) sowie PULVERER et al. (1987) bildeten CNS die dominierenden Erreger bei polymerassozierten Infektionen, also Infektionen, die durch kontaminierte Implantate aus Polymer-Kunststoffen, wie intravasale Katheter, Gefäßprothesen, Schrittmacherelektroden u.a., verursacht werden.

DEVRIESE et al. (1978) stellten bei Kühen mit subklinischer Mastitis *S. hyicus* subsp. *chromogenes* als Erreger fest, der nach Untersuchungen von HÁJEK et al. (1986) als eigenständige Spezies *S. chromogenes* geführt wurde.

Als koagulasenegative Mastitiserreger bei der Ziege konnten von POUTREL (1984a, b) neben *S. epidermidis* auch *S. caprae* und *S. simulans* isoliert werden. CHESNEAU et al. (1993) wiesen *S. pasteurii* in Ziegenmilch nach.

FTHENAKIS et al. (1994) untersuchten Mastitismilch von Schafen und konnten *S. auricularis*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* und *S. xylosus* als Erreger feststellen.

Nach den Angaben von BRÜCKLER et al. (1994) wurden bei Tieren neben den koagulasepositiven Staphylokokkenarten *S. aureus*, *S. intermedius* und *S. hyicus*, die koagulasenegativen Arten *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* und *S. warneri* als potentiell pathogen beschrieben. Als fakultativ pathogen wurden *S. hominis*, *S. kloosii*, *S. lentus* und *S. xylosus* und als Haut- und Schleimhautbesiedler *S. arlettae*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. equorum* und *S. gallinarum* angesehen.

Die Bedeutung der koagulasepositiven und -negativen Staphylokokken als Infektions- bzw. Krankheitserreger liegt nicht nur an der ubiquitären Verbreitung, der hohen Tenazität und ihrer Vermehrung selbst unter ungünstigen Bedingungen sondern auch in der Fähigkeit, durch zelluläre und extrazelluläre Substanzen Abwehrmechanismen des Wirtes zu „überlisten“, ihnen zu widerstehen und den Wirtsorganismus zu schädigen. Die zunehmende Verbreitung multiresistenter *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämme erschwert die Behandlung von Staphylokokkeninfektionen. Daher ist eine umfassende Erforschung der Staphylokokken-Virulenz und -Antibiotikaresistenz und die Suche nach neuen Anti-Staphylokokken-Antibiotika bzw. -Therapeutika dringend erforderlich (RAAD et al., 1998; LOWY, 1998).

Tab. 1: Einige bedeutende tierpathogene Staphylokokkenspezies nach FITZGERALD und PENADÉS (2008)

Staphylokokkenspezies	Tierart	Infektionstyp
<i>S. aureus</i>	Rind; Schafe; Ziege	Mastitis
	Pferd	Hautinfektion
	Kaninchen	Mastitis
	Geflügel	„Bumble foot“ ; Chondronecrosis; Septische Arthritis
<i>S. pseudintermedius</i>	Hund	Kommensale; Pyodermie
<i>S. delphini</i>	Pferd; Nerz; Rind; Delphin; Taube	Pyodermie
<i>S. intermedius</i>	Taube	Pyodermie
<i>S. epidermidis</i>	Rind; Schafe; Ziege	Mastitis
<i>S. hyicus</i>	Schwein	Exsudative Epidermitis
<i>S. sciuri</i>	Schwein	Exsudative Epidermitis
<i>S. simulans</i>	Rind; Schafe; Ziege	Mastitis

2.3 *Staphylococcus aureus*

Eine Anzüchtung von *S. aureus* unter aeroben Bedingungen auf Rinder- oder Schafblutagar, lässt nach etwa 18h Bebrütung bei 37 °C pigmentierte, meist glatte, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-3 mm erkennen. Der Name *S. aureus* leitet sich von der oft goldfarbenen Pigmentierung der Kolonien ab. Pigmentierungen von grauweiß, weiß über gelb bis gelborange kommen ebenfalls vor (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; BRÜCKLER et al., 1994; BOERLIN und NICOLET, 2002). *S. aureus* benötigt zum Leben und zur Vermehrung eine geeignete Umgebung, in der Salze, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren enthalten sind ebenso ein bestimmter Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt und die richtige Temperatur. *S. aureus* zeichnet sich durch ein schnelles aerobes oder anaerobes Wachstum auf einem breiten Spektrum von Nährmedien aus (BRÜCKLER et al., 1994). Der Keim stellt keine besonderen Wachstumsansprüche, so dass seine Anzüchtung auch auf einfachen Nährböden gelingt. Innerhalb von 12 bis 24h wächst er in einer einfachen Bouillon unter Trübung und Bodensatzbildung.

Auf festen Nährböden bilden sich mittelgroße, glatte, unregelmäßig goldgelbe und feucht glänzende, ca. 1-3 mm große Kolonien mit verschiedenen Hämolyseformen: *S. aureus* bildet 4 verschiedene Hämolsine (Toxine), die als α , β , γ und δ -Toxine bezeichnet werden. α - und β -Toxin scheinen eine Hauptrolle bei der Virulenz von *S. aureus* zu spielen; α -Toxin wird von 20 bis 50 % der Stämme (ELEK und LEVY, 1950), β -Toxin von 75 bis 100 % der Stämme produziert (POUTREL und DUCCELLIEZ, 1979). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf Erythrozyten bestimmter Spezies und führen auf Blutagar zu unterscheidbaren Hämolysezonen (ROLLE und MAYR, 2002). Das α -Hämolysin kommt hauptsächlich bei Staphylokokkenstämmen humaner Herkunft vor und verursacht eine breite, vollständige Hämolyse. Das β -Hämolysin findet sich besonders bei bovinen Stämmen und verursacht bei 37 °C eine unvollständige Hämolyse. Das δ -Hämolysin bewirkt eine schmale, scharf begrenzte, vollständige Hämolyse bei *S. aureus*, isoliert von Mensch und Tier (BISPING und AMTSBERG, 1988).

S. aureus besitzt darüber hinaus sekretorische und zellwandgebundene Faktoren, die zur Fähigkeit des Bakteriums beitragen, im Wirt zu überleben und Erkrankungen hervorzurufen. Die Virulenz einzelner *S. aureus*-Stämme beruht auf der kombinierten Wirkung von mehr als 40 dieser extrazellulären Toxine, Enzyme und Oberflächenproteine (DEGO et al., 2002; PEACOCK et al., 2002). Auch nach DINGES et al. (2000) produziert *S. aureus* verschiedene Exoproteine, die zu der Fähigkeit des Mikroorganismus beitragen Krankheiten hervorzurufen. Diese Exotoxine umfassen die bereits genannten Hämolsine, verschiedene Enzyme und eine Substanzgruppe, die verwandt ist mit pyrogenen Toxinen, insbesondere die Staphylokokken-Enterotoxine, das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin und die Exfoliativen Toxine.

Neben der großen Bedeutung, die *S. aureus* bei Wiederkäuern zugewiesen wird, spielt der Keim aber auch bei anderen Tierarten eine herausragende Rolle als Krankheitserreger. Bei *S. aureus* handelt es sich um einen fakultativ pathogenen Keim, der durch begünstigende Umstände (z.B. Immunsuppression, Hygienemangel) eine lokale oder systemische Erkrankung auslösen kann, die unbehandelt nicht selten auch zum Tod des erkrankten Individuums führt. In der Veterinärmedizin ist *S. aureus* bekannt als Verursacher von pyogenen und invasiven Prozessen (Abszessen, Furunkeln, Empyemen, Wundinfektionen, Otitis media, Parotitis, Pneumonie, Endokarditis, Sepsis, Botryomykose, Osteomyelitis oder Zystitis), sowie von toxinvermittelten Erkrankungen (McNAMEE et al., 1999; FITZGERALD et al., 2001).

2.4 *Staphylococcus intermedius*-Gruppe (SIG)

Aufgrund der engen Verwandtschaft von *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* und *S. delphini* und der im Moment fehlenden zuverlässigen Unterscheidbarkeit der drei Spezies werden diese drei Spezies, nach SASAKI et al. (2007), auch als *S. intermedius*-Gruppe (SIG) bezeichnet.

2.4.1 *Staphylococcus intermedius*

S. intermedius wurde erstmalig 1976 von HAJEK beschrieben. Der Name „intermedius“ leitet sich von den biochemischen Eigenschaften dieser Spezies ab, d.h. zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* stehend. *S. intermedius* hat Eigenschaften von beiden Spezies und wurde in älterer Literatur als *S. aureus* Biotyp E und F bezeichnet (HÁJEK und MARŠÁLEK, 1971). Die Bakterien sind fakultativ anaerob, wachsen jedoch am besten unter aeroben Bedingungen. Die Kolonien sind leicht konvex, rund, glatt, glänzend, durchscheinend, grau-weiß und unpigmentiert. *S. intermedius* ist katalase- und koagulase-positiv. Clumping-Factor wird von einigen wenigen Kulturen gebildet (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Andere Autoren berichten von ca. 84 % (BIBERSTEIN et al., 1984) bzw. 52 % (COX et al., 1985) Clumping-Factor-positiven *S. intermedius*.

Unter den verschiedenen koagulasepositiven Staphylokokken, die von kranken und gesunden Hunden isoliert werden, kann *S. intermedius* als die wichtigste Spezies betrachtet werden (BIBERSTEIN et al., 1984). Diese Bakterienart wird des Weiteren aus Untersuchungsmaterialien verschiedener Vogelarten, von Nerz, Pferd, Katze und Ziege, seltener vom Mensch nachgewiesen (BES et al., 2002).

S. intermedius kommt als Bestandteil der natürlichen Hautflora auf der Haut, insbesondere der Analregion auch bei gesunden Tieren vor. Das Bakterium wurde auch von Schleimhäuten, z.B. äußerer Gehörgang, Nase, Pharynx, Präputium, Vagina, Rektum, Augen und Mundhöhle klinisch unauffälliger Hunde isoliert (DEVRIESE und DEPELSMAECKER, 1987; OLUOCH, 1996). *S. intermedius* spielt ferner eine wichtige Rolle bei der Otitis externa bei Hunden und ist charakterisiert durch Erythem, Pusteln, gelb-braunen Krusten und durch Verschwinden der Hornschicht der Epidermis (IHRKE et al., 1978; HILL und MORIELLO, 1994). COX et al. (1988) betrachteten *S. intermedius* als gewöhnlichen Bewohner bei gesunden Hunden, stellten jedoch fest, dass nicht alle Hunde *S. intermedius* beherbergten. Laut DEVRIESE und DEPELSMAECKER (1987) und OLUOCH (1996) könnte *S. intermedius* ein primärer oder opportunistisch pathogener Keim bei verschiedenen Erkrankungen von Hunden sein. DEBOER (1990) und BÖHM et al. (1993) bezeichneten *S. intermedius* als obligat pathogen, AMTSBERG et al. (1979) und BJURSTRÖM und LINDEFORSBERG (1992a und b) dagegen als fakultativ pathogen.

2.4.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

DEVRIESE et al. (2005) fanden vier koagulasepositive Staphylokokkenstämme bei Erkrankungen von Katze, Hund, Pferd und Papagei, die sie aufgrund der engen Verwandtschaft mit *S. intermedius* in die neue Spezies *S. pseudintermedius* einordneten. *S. pseudintermedius* produziert verschiedene Enzyme, wie zum Beispiel Koagulase, Protease, Thermo-nuclease und Toxine, wie Hämolyse, Exfoliative Toxine und Enterotoxine (FITZGERALD und PENADÉS, 2008).

Über mögliche pathogene Eigenschaften von *S. pseudintermedius* ist bisher wenig bekannt. VAN HOOVELS et al. (2006) konnten erstmals einen Zusammenhang bei einer Infektion beim Menschen herstellen. *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* und *S. delphini* haben

ähnliche phänotypische Eigenschaften, weswegen eine Differenzierung dieser Gattungen bislang schwierig ist (DEVRIESE et al., 2008). Nach DEVRIESE et al. (2008) sollten SIG, isoliert vom Hund, als *S. pseudintermedius* und SIG, isoliert von der Taube, als *S. intermedius* bezeichnet werden (siehe auch Tab. 1).

2.4.3 *Staphylococcus delphini*

VARALDO et al. 1988 isolierten *S. delphini* aus Eiterproben von in Aquarien gehaltenen Delphinen. Die Bakterien erwiesen sich als fakultativ anaerob, wuchsen aber besser unter aeroben Bedingungen. Bis heute wurde *S. delphini* bei Wundinfektionen von Pferden, Rindern, Nerzen, Tauben und Delphinen isoliert (SASAKI et al., 2007). Die Kolonien waren, nach BRÜCKLER et al. (1994), leicht konvex, rund, glatt, glänzend, opak bis leicht durchscheinend pigmentiert mit einem Durchmesser von 5 bis 7 mm. Katalase und Koagulase werden gebildet, Clumping-Factor dagegen nicht, Glucose und Mannit wird abgebaut. Die Kulturen sind empfindlich gegenüber Novobiocin. Das Peptidoglycan ist vom Typ Lys-Gly₅₋₆. Die Zellwandteichonsäure enthält Glycerol und N-Acetylglucosamin. Der G+C-Gehalt der DNA liegt bei 39 % (BRÜCKLER et al., 1994).

Da *S. delphini* aus multiplen eitrigigen Hautentzündungen isoliert wurde, dürfte diese Spezies auch ursächlich mit Hautinfektionen in Zusammenhang gebracht werden. Der Typ-Stamm hat die Bezeichnung *S. delphini* DSM 20771.

2.5 *Staphylococcus hyicus*

S. hyicus ist eine Bakterienart der Gattung *Staphylococcus*, die natürlicherweise die Haut von Schweinen besiedelt und bei Abwehrschwäche die Hautkrankheit Ferkelruß verursachen kann. (SOMPOLINSKY, 1953; DEVRIESE, 1977; DEVRIESE et al., 1978; KLOOS und SCHLEIFER, 1986; LÄMMLER, 1990; 1991a, b) *S. hyicus* wurde von der Haut gesunder und kranker Schweine sowie gelegentlich von der Haut gesunder Rinder, Pferde, Esel und von Geflügel isoliert. Der Name leitet sich von der ursprünglichen Isolierung „vom Schwein“ ab. Die Bakterien wachsen fakultativ anaerob, besser jedoch aerob. Die Kolonien sind leicht konvex, rund, glänzend, opak sowie unpigmentiert. Einzelkolonien können einen Durchmesser von 4 bis 7 mm erreichen. Katalase wird gebildet. Koagulase (mit Kaninchenplasma) kann bei 24 bis 56 % der Kulturen nachgewiesen werden. Wird jedoch Schweineplasma zum Nachweis verwendet, dann erwiesen sich alle *S. hyicus*-Kulturen als koagulasepositiv (ODENWÄLLER, 1988; LÄMMLER, 1990). Gleiches gilt auch für den Nachweis des Clumping-Factor. Mit Kaninchenplasma ist kein Clumping-Factor nachweisbar. Bei Verwendung von Schweineplasma reagierten ca. 6 % der Kulturen positiv (ODENWÄLLER, 1988). Aus Glucose wird anaerob und aerob Säure gebildet. Mannit kann nur von wenigen Kulturen zu Säure abgebaut werden. *S. hyicus* ist empfindlich gegenüber Novobiocin (MIC 0,05-0,2 µg/ml). Das Peptidoglycan ist vom Typ L-Lys-Gly₄₋₅, L-Ser_{0-0,3}. Die Zellwandteichonsäure setzt sich aus Glycerol und N-Acetylglucosamin zusammen (BRÜCKLER et al., 1994). Aufgrund serologischer Verschiedenheiten werden die

Teichonsäuren von *S. hyicus* mit C α oder C β bezeichnet (OSLAND et al., 1979). *S. hyicus* ist, wie bereits oben genannt, der Erreger des Ferkelrußes bzw. der Exsudativen Epidermitis des Schweins, insbesondere bei Saugferkeln und Läufern (AMTSBERG und HAZEM, 1978; AMTSBERG, 1979a, b; BLOBEL und BRÜCKLER, 1984; LÄMMLER, 1990). Ferner wurde *S. hyicus* bei septischen Polyarthritiden des Schweins (PHILLIPS et al., 1980) isoliert. Darüber hinaus ist der Keim als Infektionserreger und Besiedler bei verschiedenen Haustieren nachgewiesen worden (TAKEUCHI et al., 1985).

2.6 Exfoliative Toxine

Exfoliative Toxine oder Epidermolysine sind eine seit langem bekannte Toxingruppe von *S. aureus*, die, insbesondere bei Kindern, zu intraepidermalen Spaltbildungen zwischen dem Stratum spinosum und dem Stratum granulosum der Epidermis führen und so das Krankheitsbild des Staphylococcal Scaled Skin Syndrome (SSSS) manifestieren. Die Exsudative Epidermitis des Schweins, ausgelöst durch *S. hyicus*, stellt ein ähnliches Krankheitsbild dar und wird ebenso auf das Vorkommen unterschiedlicher Exfoliativer Toxine zurückgeführt. Ein vergleichbares Exfoliatives Toxin konnte auch bei *S. intermedius*, isoliert von Pyodermien von Hunden, nachgewiesen werden.

2.6.1 Exfoliative Toxine bei *S. aureus*

Das Exfoliative bzw. Epidermolytische Staphylokokkentoxin (ET) kommt nach DAJANI (1972) vorzugsweise bei *S. aureus*-Stämmen vor, die im Zusammenhang mit Hautinfektionen des Menschen (Impetigo contagiosa bei Erwachsenen oder Toxische Nekrose bei Kindern) isoliert wurden. Bisher wurden vier Serotypen beschrieben: ETA, ETB, ETC und ETD (KONDO et al., 1973; SATO et al., 1994; YAMAGUCHI et al., 2002). Laut SATO et al. (1994), LADHANI et al. (1999) und YAMAGUCHI et al. 2002 haben diese vier Toxine ähnliche Molekulargewichte (27 kDa).

ETA und ETB stehen im Zusammenhang mit einer Erkrankung, die als Staphylococcal Scaled Skin Syndrom (SSSS) bezeichnet wird. Diese Erkrankung betrifft besonders die Haut von Neugeborenen (Exfoliative Dermatitis der Neugeborenen), Kindern oder Patienten mit Immunsuppression oder mit hochgradiger Niereninsuffizienz und hat eine generalisierte Trennung des Stratum corneum vom Stratum spinosum zur Folge (AMAGAI et al., 2000). Das klinische Bild beinhaltet eine Blasenbildung der geröteten Haut, ähnlich einer Verbrühung durch kochendes Wasser und geht mit Fieber einher. Diese Blasen sind mit erregerfreier Flüssigkeit gefüllt und heilen innerhalb von sieben bis 10 Tagen meist narbenfrei ab (PIÉMONT et al., 1988). Untersuchungen von PIÉMONT et al. (1988) ergaben, dass der äußere Anteil der Epidermis bei diesen Läsionen zunächst teilweise noch intakt ist. Nach Berührung zeigte sich jedoch, dass zwischen der Epidermis und den tiefer liegenden

elastischen Fasern keine Verbindung mehr besteht. Diese Eigenschaft trägt den Namen „Nikolsky-Zeichen“.

Obwohl die Exfoliative Dermatitis vorwiegend als Hospitalinfektion auftritt, ist darauf hinzuweisen, dass toxinbildende *S. aureus*-Stämme offensichtlich auch in der gesunden Bevölkerung verbreitet sind (JOHNSON et al., 1991).

ETA und ETB haben identische biologische Eigenschaften sowie Ähnlichkeiten in den Gensequenzen, unterscheiden sich aber in der Hitzeresistenz. Nach SATO et al. (1994) bleibt ETA bei 100 °C für 20 Minuten und ETB bei 60 °C für 15 Minuten ohne Aktivitätsverlust. Das *eta*-kodierende Gen ist chromosomalen Ursprungs, das *etb*-kodierende Gen dagegen ist an ein Plasmid gebunden. Die Toxine ETA und ETB zeigen eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 41%. ETC wurde erstmals nach SATO et al. (1994) von einer *S. aureus*-Kultur, isoliert aus einem Pferd, beschrieben. Dieses Toxin hatte die identischen biologischen Eigenschaften wie ETA und ETB, erwies sich aber als hitzeempfindlich. Das Toxin ETC hat zu den Toxinen ETA und ETB eine Sequenzähnlichkeit von 12 % und zu ETD von 13 % (YAMAGUCHI et al., 2002).

ETD beschrieben erstmals YAMAGUCHI et al. (2002) als Element einer „*S. aureus*-Pathogenitätsinsel“. ETD zeigte die gleichen Eigenschaften wie die Toxine ETA und ETB. Das ETD-Toxin wies mit den Toxinen ETA, ETB und ETC eine Sequenzähnlichkeit von 40 %, 59 % und 13% auf (YAMAGUCHI et al., 2002).

ETs gelten als sehr spezies- und gewebespezifisch und reagieren ausschließlich mit keratinisierten Epithelien, die vorzugsweise von neugeborenen Tieren bzw. Menschen stammen. Sie spalten die Desmosomen, die normalerweise die Zellen des Stratum spinosum der Haut verbinden, und vergrößern somit die interzellulären Zwischenräume (LADHANI et al., 1999).

Zellläsionen sowie enzymatische oder metabolische Aktivitäten durch Exfoliative Toxine konnten bislang nicht beobachtet werden (JOHNSON et al., 1979; BAILEY et al., 1980; PIÉMONT et al., 1988).

2.6.2 Exfoliative Toxine bei SIG

Laut HESSELBARTH (1994) kommt das *S. intermedius*-Exfoliative Toxin vorzugsweise bei *S. intermedius*-Stämmen vor, die im Zusammenhang mit Hautinfektionen von Hunden (Pyodermien beim Hund) isoliert wurden. Die Pyodermie äußert sich in einer Reihe von Krankheitsbildern. Bei oberflächlichen Infektionen können Eiterbläschen (Pusteln) beobachtet werden.

Das Exfoliative Toxin SIET von *S. intermedius* wurde ebenso als Serinprotease beschrieben, wobei dessen Zielmolekül bislang noch nicht bekannt ist (TERAUCHI et al., 2003b). Das *siet*-kodierende Gen ist chromosomalen Ursprungs (TERAUCHI et al., 2003b). SIET hat eine relative Molekülmasse von 30 kDa und lässt sich von den Exfoliativen Toxinen ETA, ETB, ETC von *S. aureus* und SHETA und SHETB von *S. hyicus* serologisch abgrenzen (TERAUCHI et al., 2003a).

2.6.3 Exfoliative Toxine bei *S. hyicus* und *S. chromogenes*

Die Exsudative Epidermitis des Schweins, ausgelöst durch *S. hyicus*, stellt ein dem SSSS ähnliches Krankheitsbild dar und wird ebenso auf das Vorkommen unterschiedlicher Exfoliativer Toxine (ExhA, ExhB, ExhC, ExhD, SHETA und SHETB) zurückgeführt. Die Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* wurden in Dänemark eingehend untersucht (AHRENS und ANDRESEN, 2004). Toxinbildende *S. hyicus* führen, ähnlich wie Exfoliative Toxin-bildende *S. aureus*, zu einer Ablösung der oberen Hautschichten zwischen Stratum granulosum und Stratum spinosum der Epidermis, was sich in dem Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis des Schweins manifestiert. Das Auftreten der *S. hyicus* Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* schien mit dem Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis zu korrelieren (AHRENS und ANDRESEN, 2004; ANDRESEN, 2005). Die Krankheit kann perakut, akut oder subakut verlaufen, wobei Häufigkeit und Schweregrad mit zunehmendem Alter abnehmen. Bei der perakuten Form wird schon nach kurzer Zeit die gesamte Körperoberfläche von einem aus Talg, Serum und Schweiß zusammengesetzten Exsudat überzogen. In der Regel treten die ersten Krankheitserscheinungen im Kopfbereich auf. Die zunächst linsengroße Herdchen vergrößern sich rasch. In den Randzonen entstehen gelbliche, hanfkorngroße Bläschen, die rasch platzen. Es bilden sich gelb- bis schwarzbraune Krusten. Bereits nach 1-2 Tagen kommt es zu einem generalisierten Ekzem. Die Körpertemperatur steigt auf etwa 40 °C an. Die erkrankten Tiere bleiben in der Entwicklung zurück, zeigen Fraßunlust, vermehrten Durst und rasche Abmagerung. Sie können am 4-6. Krankheitstag sterben. Die akute Form entwickelt sich nicht so rapide wie die perakute, gleicht ihr aber in den allgemeinen klinischen Erscheinungen. Die Haut ist verdickt und faltig. Bläschen und Pusteln platzen rasch, werden von einem schmierigen Exsudat überzogen und gehen in eingetrocknete rissige Krusten über. Der Tod kann nach 4-8 Tagen eintreten. Von der subakuten Form werden bevorzugt ältere Ferkel betroffen. Die kleinen linsen- bis centgroßen Rötungsbezirke verschorfen rasch und zeigen keine Tendenz zur Generalisation.

Nach den Untersuchungen von AMAGAI et al. (2000) und NISHIFUJI et al. (2005) ist das Krankheitsbild bei Mensch (SSSS, verursacht durch *S. aureus*) und Schwein (Exsudative

Epidermitis, verursacht durch *S. hyicus*) auf eine proteolytische Spaltung des Desmogleins, einem desmosomalen Adhärenzmoleküls, zurückzuführen (Abb. 1).

Die Exfoliativen Toxingene *sheta* und *shetb* bzw. die Toxine SHETA und SHETB von *S. hyicus* wurden erstmalig in Japan beschrieben (SATO et al., 1991; SATO et al., 1999). SHETA und SHETB haben eine relative Molekülmasse von 27 kDa (SATO et al., 1999). Das *sheta*-kodierende Gen ist chromosomal Ursprungs, das *shetb*-kodierende Gen dagegen ist an ein Plasmid gebunden (SATO et al., 2000). Das Auftreten der *S. hyicus-sheta*- und *shetb*-Gene- bzw. die Expressionen von SHETA und SHETB schienen ebenso für das Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis verantwortlich zu sein (SATO et al., 2000).

S. chromogenes besiedelt natürlicherweise die Haut von Schweinen und kann bei Abwehrschwäche ebenso die Exsudative Epidermitis verursachen (ANDRESEN et al., 2005). *S. chromogenes* produziert nach ANDRESEN et al. (2005) ebenso ein Exfoliatives Toxin. Dieses Toxin unterscheidet sich von ExhB von *S. hyicus* in zwei Aminosäuren.

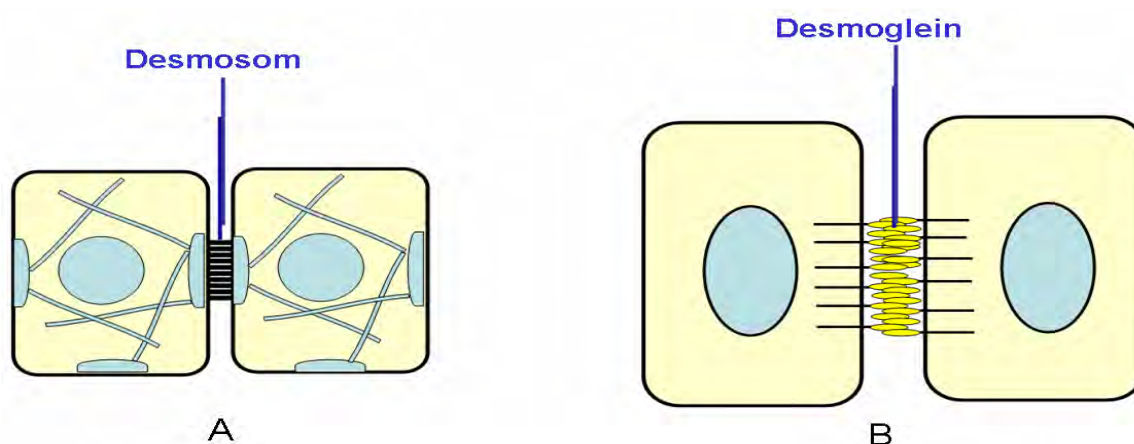


Abb. 1: Interzellulärer Zusammenhalt epithelialer Strukturen durch Punktdesmosomen (Macula adherens) (A); Desmosomale Verbindung von zwei Zellen durch das Cadherin Desmoglein (B).

2.7 Zielgene zur molekularen Identifizierung von Staphylokokken

Die Gattung *Staphylococcus* umfasst bislang, wie bereits in der Einleitung beschrieben, mehr als 45 Spezies und Subspezies. Zur Erkennung der Bedeutung einzelner Staphylokokkenspezies für Krankheitsbilder von Mensch und Tier wäre eine über die konventionelle Identifizierung hinausgehende molekulare Charakterisierung einzelner Spezies sinnvoll. Für eine solche genaue Einordnung wurden bereits einige Zielgene mit speziesspezifischen Eigenschaften beschrieben. Eine Sequenzierung solcher Zielgene ermöglichte bereits eine eindeutige Erkennung einzelner Spezies. Zu diesen Zielgenen gehörten unter anderem die 16S rDNA- (DE BUYSER et al., 1992 und BECKER et al., 2004) und die 16S-23S rDNA- intergenic spacer Region (MAES et al., 1997). Als weitere Zielgene eigneten sich das Co-Chaperon-DnaJ-kodierende Gen *dnaJ* (SHAH et al., 2007), das die Superoxid Dismutase A-kodierende Gen *sodA* (POYART et al., 2001), das den Elongationsfaktor Tu-kodierende Gen *tuf* (MARTINEAU et al., 2001) und das Hitzeschockprotein 60 kDa-kodierende Gen *hsp60* (GOH et al., 1996 und GOH et al., 1997). Die 16S rRNA ist in aktiv wachsenden Zellen in großer Anzahl vorhanden. Das die 16S rRNA-kodierende Gen hat nach LANE et al. (1985) und LEWIN (1998) eine Länge von ca. 1540 Bp. Dieses Gen kann in der Routinediagnostik genutzt werden, um bestimmte Bakterien schnell und auch direkt aus klinischem Untersuchungsmaterial zu charakterisieren. Die 16 rDNA hat, nach KWOK et al. (1999), innerhalb der Staphylokokken eine Sequenzähnlichkeit von 92 % bis 99 %.

Eine Dendogrammanalyse der in der Datenbank für Staphylokokken verfügbaren Zielgene mit den jeweiligen Datenbankzugangsnummern ist den Abb. 2, 3, 4, 5 und 6 zu entnehmen.

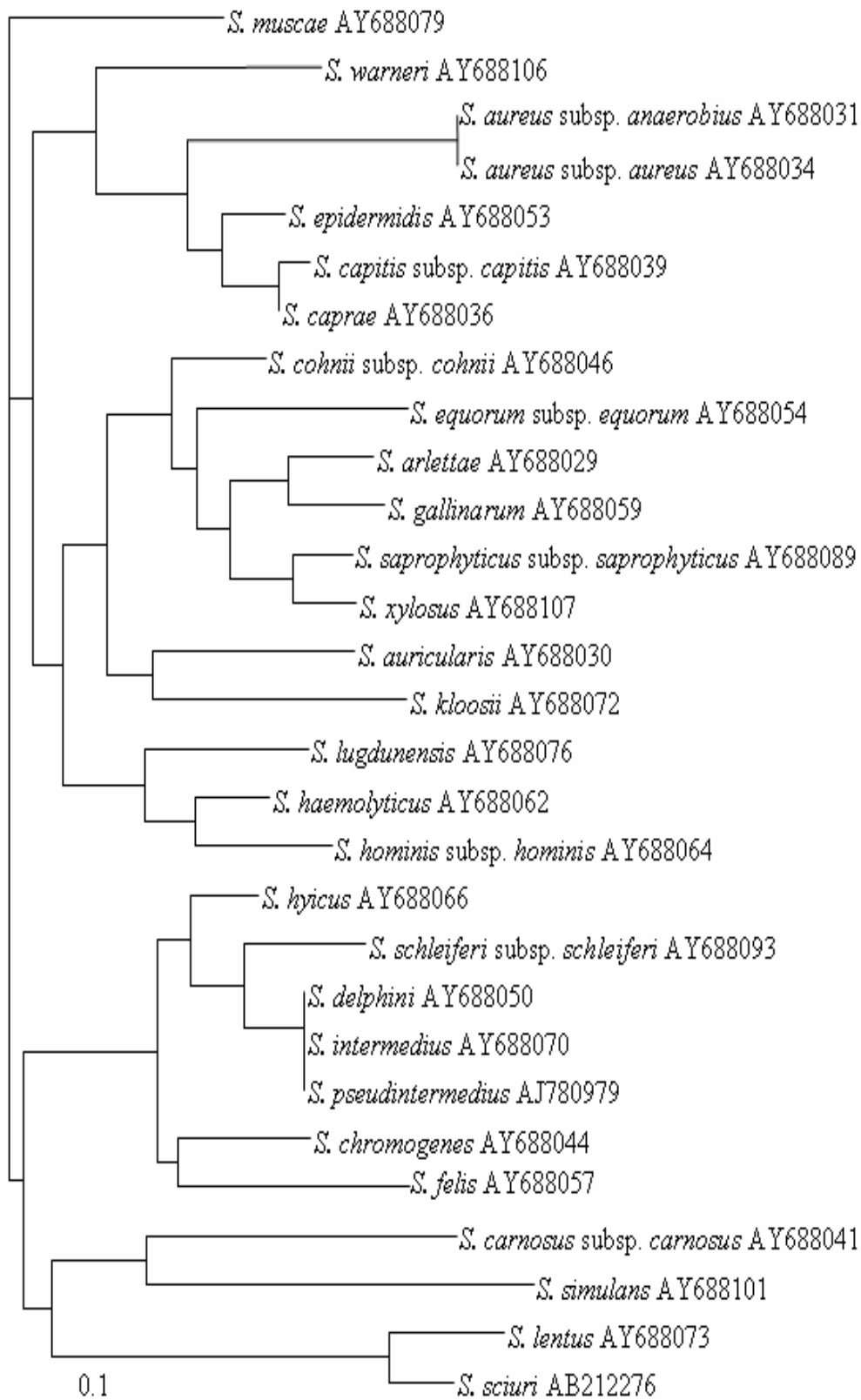


Abb. 2: Dendrogrammanalyse der 16S rDNA von unterschiedlichen Spezies der Gattung *Staphylococcus*. Die Erstellung des Dendrogramms erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

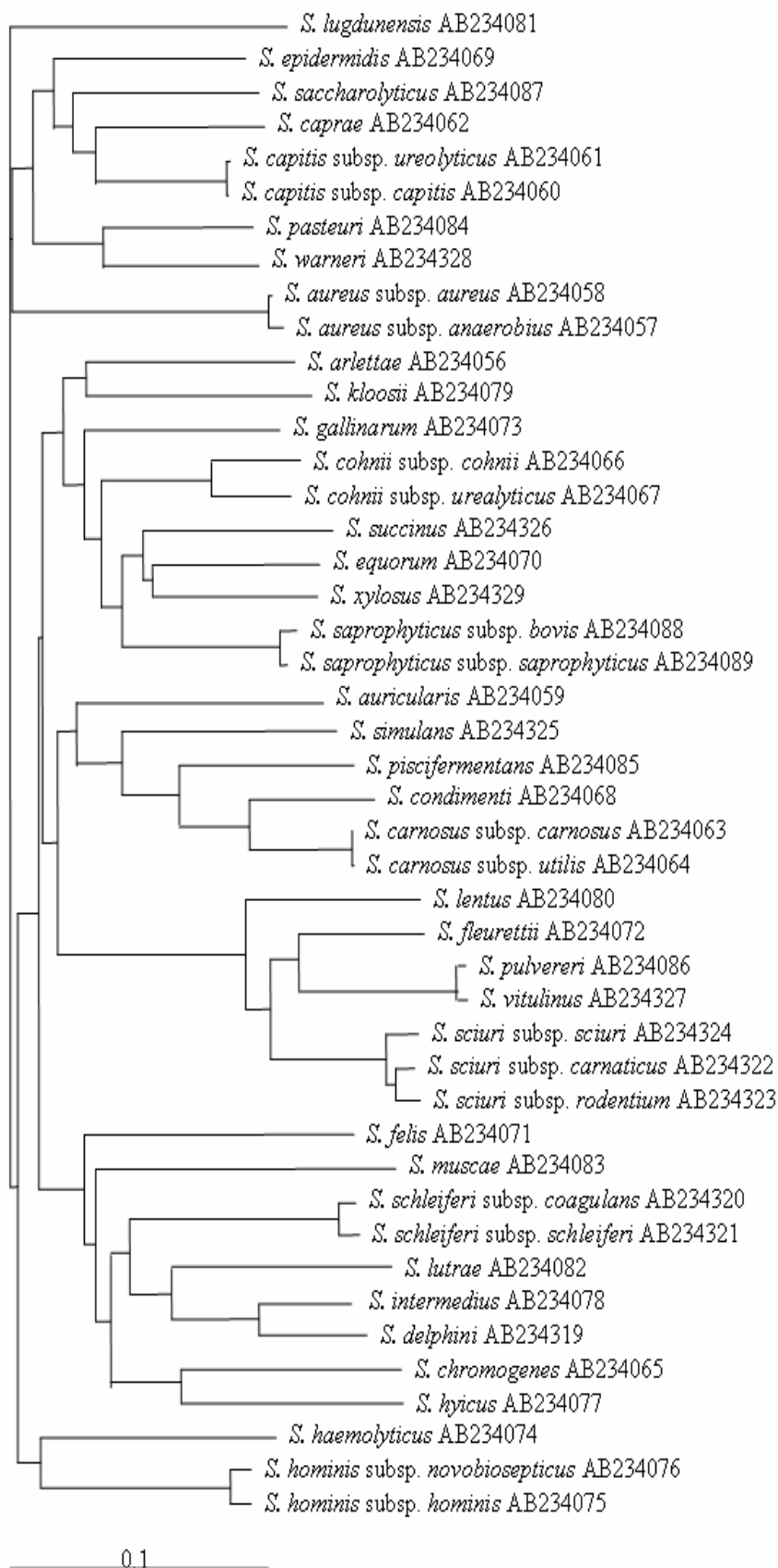


Abb. 3: Dendrogrammanalyse des *dnaJ*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*.

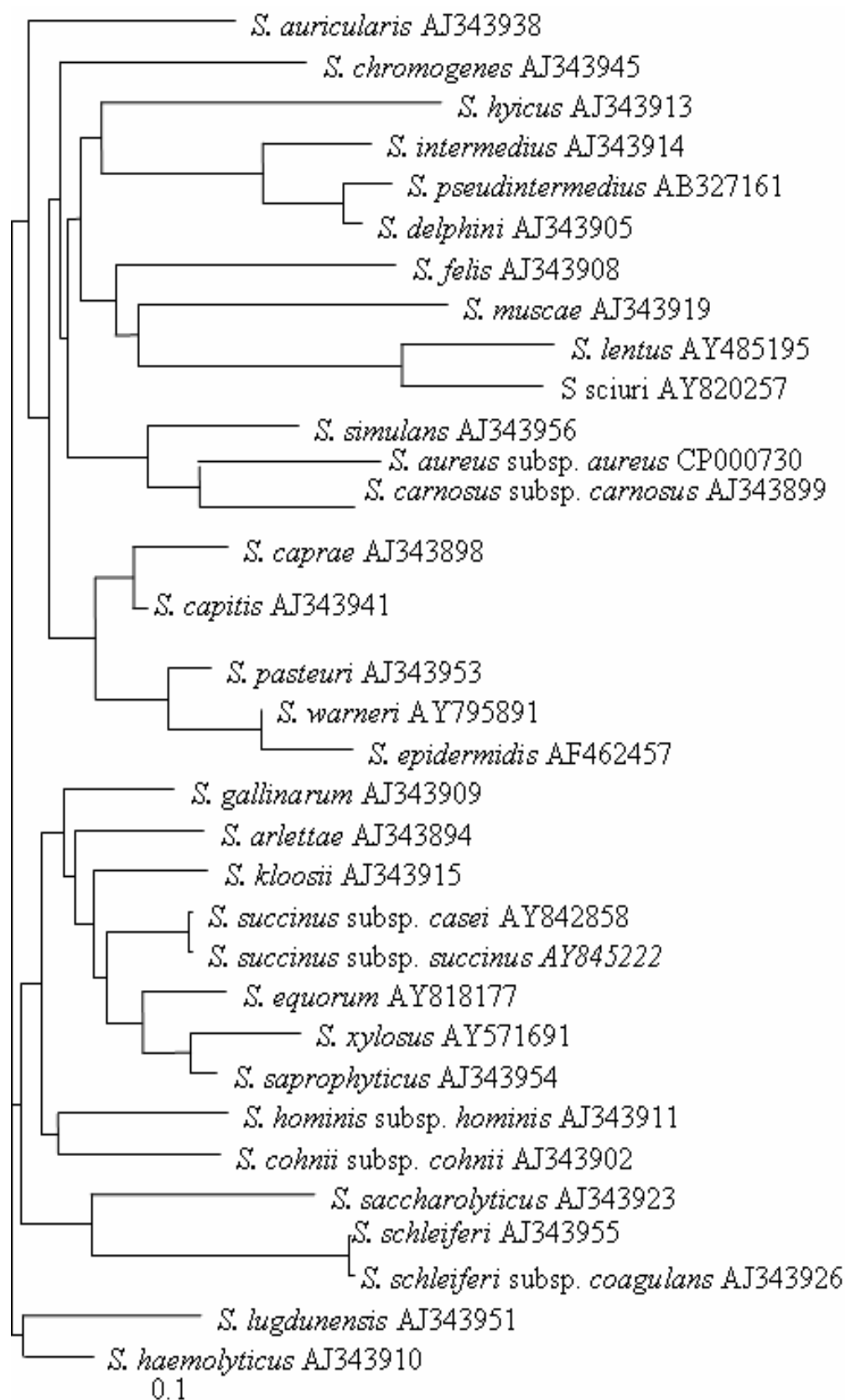


Abb. 4: Dendrogrammanalyse des *sodA*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*.

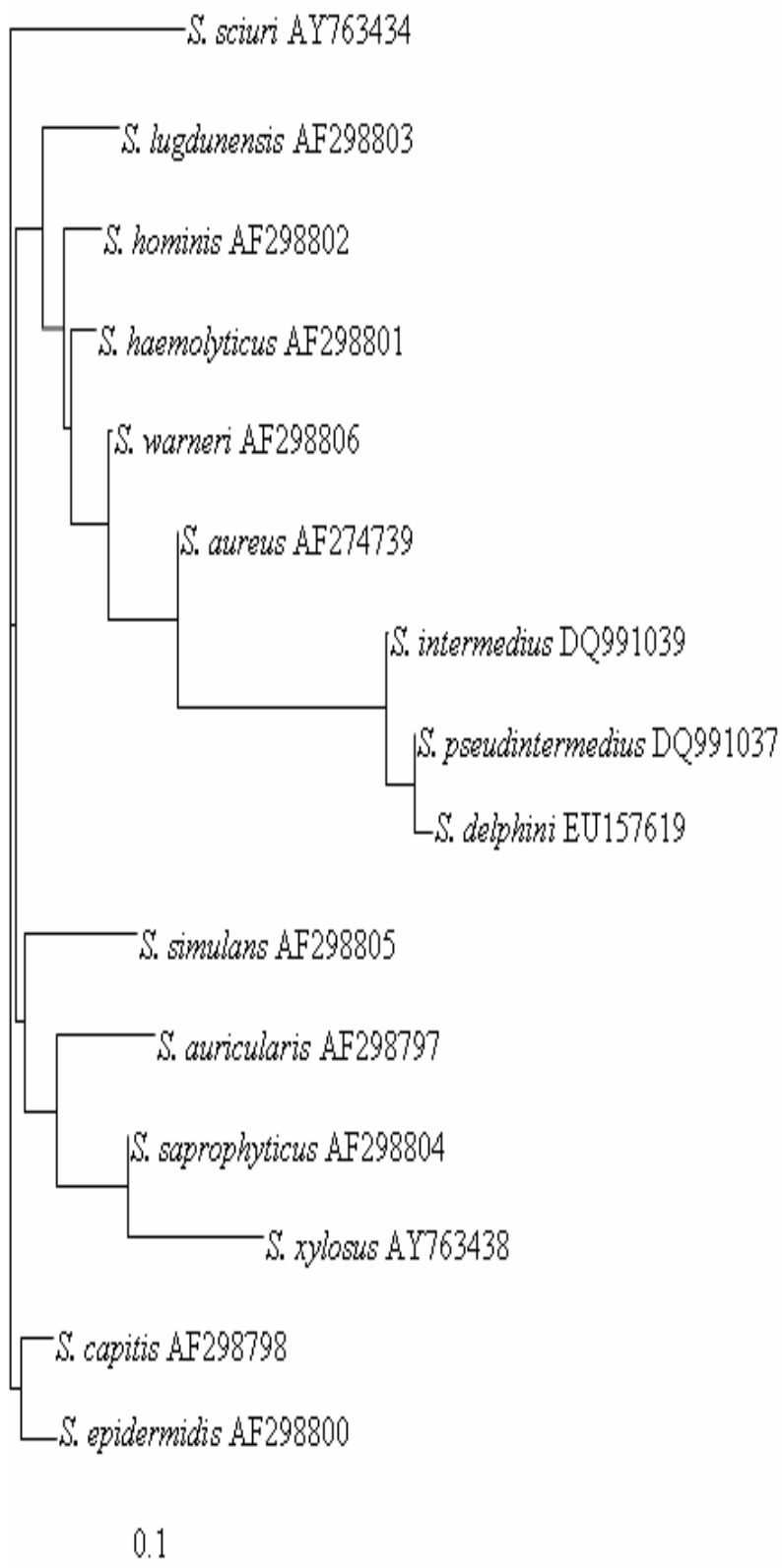


Abb. 5: Dendrogrammanalyse des *tuf*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*.

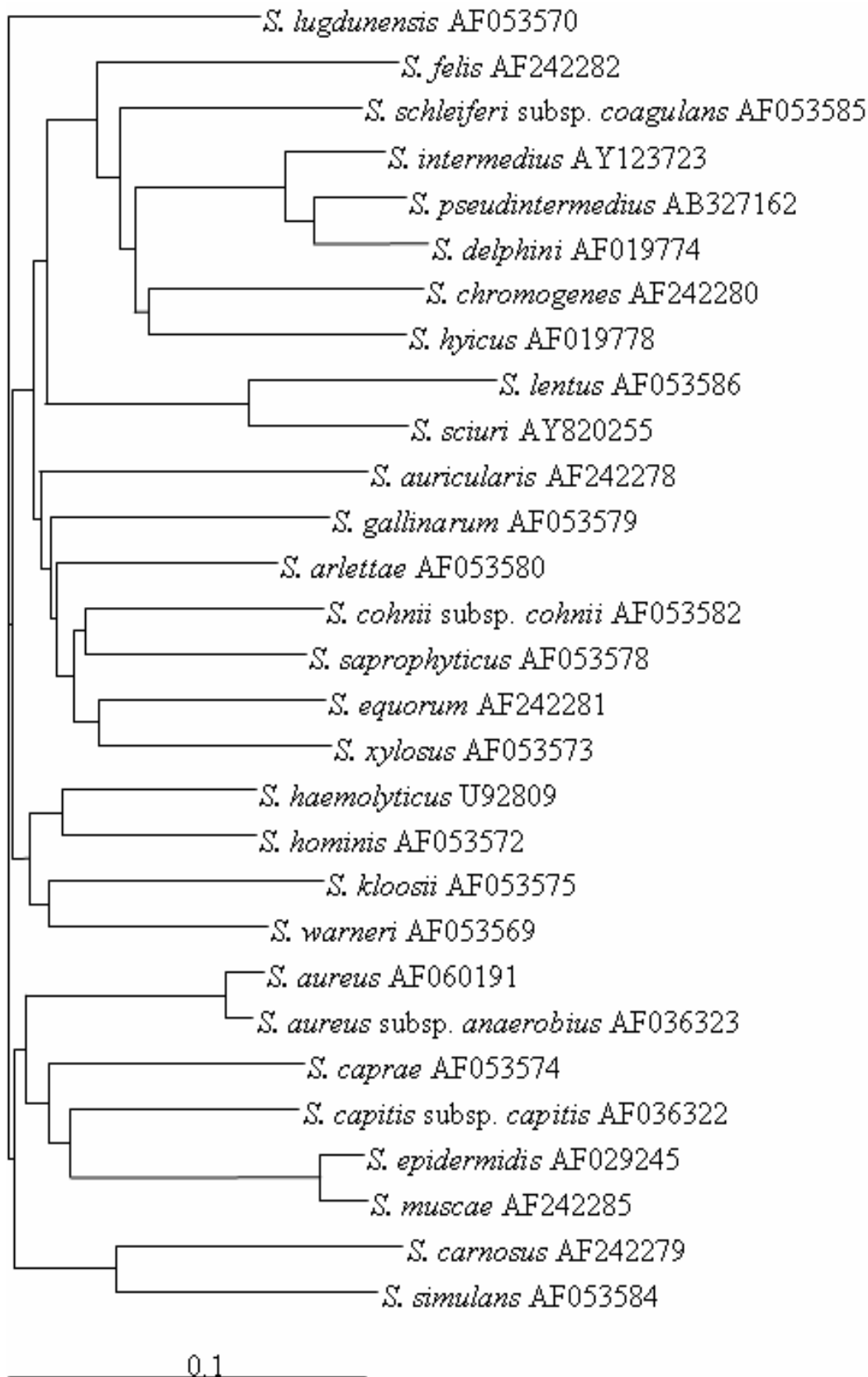


Abb. 6: Dendrogrammanalyse des *hsp60*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienkulturen

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 150 Staphylokokkenkulturen unterschiedlicher Herkunft zur Verfügung. Dies waren 20 *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus Rindermastitiden von 20 Kühen aus 20 Betrieben und 19 Ortschaften in Hessen. Die Kulturen aus der Routinediagnostik des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor (LHL) in Gießen, Hessen, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Zschöck (LHL) zur Verfügung gestellt. Ferner 24 *S. aureus*-Kulturen aus veterinärmedizinischen Untersuchungsmaterialien der Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. R. Weiss (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere), 28 *S. aureus*-Kulturen aus humanmedizinischen Untersuchungsmaterialien der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. E. Domann (Institut für Medizinische Mikrobiologie). In die Untersuchungen miteinbezogen wurden ferner 28 *S. intermedius*-Kulturen, isoliert von Infektionen von Hunden im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Dr. R. Weiss), 10 aufgrund antibiotischer Resistenzmuster ausgewählte *S. intermedius*-Kulturen der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Dr. R. Weiss), 40 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Deutschland (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere; n=17) und Russland (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. A. V. Voytenko, Kovalenko Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Kurskaya Str. 4, 308002 Belgorod, Russland; n=23). Die Herkunft der Staphylokokkenkulturen ist in Tab. 2 dargestellt. In die Untersuchungen miteinbezogen wurden ferner die Staphylokokkenstämme *S. aureus* DSM 346 (ATCC 6538P), *S. aureus* 1150/93, *S. aureus (eta/etb)*114/92, *S. aureus* subsp. *anaerobius* DSM 20714, *S. intermedius* DSM 20373 (ATCC 29663), *S. pseudintermedius* LMG 22219, *S. pseudintermedius* LMG 22220, *S. pseudintermedius* LMG 22221, *S. hyicus* DSM 20459 (ATCC 11249), *S. hyicus (exhA)* S3588, *S. hyicus (exhB)* 1289D-88, *S. hyicus (exhC)* 842A-88, *S. hyicus (exhD)* A2869C, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* DSM 6628 (ATCC 49545), *S. delphini* DSM 20771 (ATCC 49171), *S. epidermidis* DSM 20044 (ATCC 14990), *S. saprophyticus* ATCC 43867, *S. warneri* DSM 20316 (ATCC 27836), *S. carnosus* subsp. *carnosus* DSM 20501 (ATCC 51365), *S. caseolyticus* DSM 20597 (ATCC 13548), *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328 (ATCC 27844), *S. haemolyticus* DSM 20263 (ATCC 29970), *S. felis* CIP 103366 (ATCC 49168), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* DSM 4807 (ATCC 43808) und *S. lentus* ATCC 49547. Diese Kulturen wurden der Stammsammlung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie entnommen. Die *S. pseudintermedius*-Stämme LMG 22219, LMG 22220, LMG 22221 wurden freundlicherweise überlassen von E. De Graef und L. A. Devriese, Department of Pathology, Bacteriology and Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgien, die *S. hyicus*-Stämme A2869C und S3588 von J. Rhode, Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche

Hochschule Hannover, Deutschland und die *S. hyicus*-Stämme 1289D-88 und 842A-88 von L. O. Andresen, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Copenhagen, Dänemark.

Tab. 2: Herkunft und Isolierungszeitraum der zu untersuchenden Staphylokokkulturen

Staphylokokkenspezies	n	Isolierungsort	Isolierungszeitraum	Herkunft
<i>S. aureus</i>	20	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor	März bis April 2005	Mastitis: Rind Nase (n=1); Kot (n=1); Gelenk (n=1): Schwein Wund (n=1): Kaninchen Gelenk (n=2); Haut (n=1); Kot (n=1); Milch (n=1); Vestibulum (n=1); Haare (n=1); Pferd Nase (n=1); Ohr (n=1); Wunde (n=1): Hund Kot (n=2); Nase (n=2); Urin (n1): Katze Nase (n=1); Ratte Kot (n=1): Rind Haare (n=1): Meerschweinchen Haut (n=1): Schaf
<i>S. aureus</i>	24	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	Februar bis April 2005	
<i>S. aureus</i>	28	Institut für Medizinische Mikrobiologie	Januar 2002 bis Februar 2003	Sputum (n=7); Wundabstrich (n=3); Auge (n=3); Ulcus (n=2); Kaiserschnitt (n=2); Nase (n=2); Nabel (n=2); Blutkultur (n=1); Rachenabstrich (n=1); Bronchial-Lavage (n=1); Abszess (n=1); Vagina (n=1); Platzbauch (n=1); Ohr (n=1); Mensch
<i>S. intermedius</i>	28	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	6 Juni bis 15 Juni 2005	Ohr (n=8); Haut (n=5); Rachen (n=4); Vagina (n=3); Haare (n=2); Niere (n=2); Nase (n=1); Wunde (n=1); Luftröhre (n=1); Auge (n=1): Hund
<i>S. intermedius</i> (ausgewählte tier- medizinische Isolate)	10	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	September 2004 bis September 2005	Wunde (n=2); Urin (n=2); Platzbauch (n=2); Abszess (n=1); Nase (n=1): Hund Abszess (n=1); Urin (n=1): Katze
<i>S. hyicus</i> aus Deutschland	17	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere	1978-2005	Haut (n=7); Niere (n=3); Kot (n=1); Lunge (n=1); Scheide (n=1): Schwein Uterus (n=2): Rind Hirnhaut (n=1): Hund
<i>S. hyicus</i> aus Russland	23	Kovalenko Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Kurskaya Str. 4, 308002 Belgorod, Russland	2004-2005	Haut (n=15); Vaginalabstrich (n=2); Milz (n=2); Lunge (n=2); Niere (n=1): Schwein Kropf (n=1): Huhn

n= Anzahl der Kulturen

3.2 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte auf Schafblutagarplatten. Das Anzüchtungsmedium (Blutagarbasis, Merck, Darmstadt) setzte sich wie folgt zusammen:

Nährsubstrat (Herzextrakt und Pepton)	20,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar-Agar	15,0 g/l
Aqua dest.	1000 ml

Dem nach den Angaben des Herstellers gefertigten Medium wurde nach Autoklavieren (20 min bei 121 °C) und Abkühlen auf ca. 50 °C 5 % defibriniertes, aseptisch entnommenes Schafblut ohne Blasenbildung zugemischt.

Eine Inkubation der beimpften Nährmedien erfolgte für 18-24h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen, für *S. aureus* subsp. *anaerobius* unter mikroaeroben Bedingungen im Kerzentopf.

3.3 Subkultivierung der Kulturen

Die Bakterienkulturen wurden auf Schafblutagarplatten (3.2) angezüchtet, bei 4 °C aufbewahrt und in einem Zeitraum von 8 Wochen subkultiviert.

3.4 Konservierung der Kulturen

Die Konservierung der Kulturen erfolgte in Flüssigmedium. Das Konservierungsmedium (Tryptic Soy Broth Difco, USA) setzte sich wie folgt zusammen:

Bacto Trypton	17,0 g /l
Bacto Soja	3,0 g /l
Bacto Dextrose	2,5 g /l
Natriumchlorid	5,0 g /l
Kaliumphosphat	2,5 g /l
Aqua dest.	1000 ml

Das nach Angaben des Herstellers gefertigte Medium (5 ml) wurde autoklaviert (15min bei 121 °C) und nach Abkühlen auf ca. 25 °C, mit der zu konservierenden Bakterienkultur gemischt.

Die Inkubation der beimpften Kolben erfolgte unter aeroben Bedingungen für 18-24h bei 37 °C auf einem Rundschtüttler, bzw. für *S. aureus* subsp. *anaerobius* im Kerzentopf.

Ca. 150 μl der angezüchteten Bakterienkulturen wurden anschließend in 850 μl autoklaviertes Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe) gegeben und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.5 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Bakterien mittels konventioneller Verfahren

3.5.1 Differenzierung der Hämolyseformen

Zur Beurteilung der Hämolyse und Koloniemorphologie wurden die Bakterienkulturen auf Schafblutagar (3.2) für 24h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezüchtet. Eine α -Hämolyse zeigte sich als eine breite Zone vollständiger Hämolyse, eine β -Hämolyse als eine breite Zone unvollständiger Hämolyse und eine δ -Hämolyse als eine schmale Zone vollständiger Hämolyse.

Die unterschiedlichen Hämolyseformen der Bakterienkulturen wurden zusätzlich nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode differenziert. Dabei wurden synergistische (CAMP-ähnliche) bzw. antagonistische Hämolysereaktionen im Bereich des Staphylokokken- β -Hämolysins beurteilt.

Eine nach 3.2 hergestellte Schafblutagarplatte wurde dazu mit einer β -hämolyzierenden *S. aureus*-Kultur strichförmig beimpft und senkrecht dazu, ebenfalls strichförmig, bis etwa 5 mm an die β -hämolyzierende Referenzkultur, die zu untersuchenden Staphylokokken. Nach einer Inkubation von 18-24h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte eine Beurteilung der Hämolyse.

α -Hämolyse: Sie zeigte sich als Zone einer vollständigen Hämolyse, die im Bereich des *S. aureus*- β -Hämolysins gehemmt wurde.

β -Hämolyse: Diese Hämolyseform stellte sich als Zone einer unvollständigen Hämolyse um den Impfstrich dar.

δ_1 -Hämolyse: Hierbei zeigte sich eine synergistisch auftretende Verstärkung der Hämolysezone im Bereich des *S. aureus*- β -Hämolysins und zusätzlich eine schmale Zone vollständiger Hämolyse um den Impfstrich.

δ_2 -Hämolyse: Die als δ_2 -Hämolyse bezeichnete Form wies nur im Bereich der unvollständigen *S. aureus*- β -Hämolyse eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse auf.

3.5.2 Nachweis des Enzyms Katalase

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte mit 5-10 Kolonien der nach 3.2 angezüchteten Bakterien, die in ca. 50 μl einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung verrieben wurden. Das Auftreten einer deutlichen Bläschenbildung wurde als positive Reaktion gewertet (BRÜCKLER et al., 1994). Im negativen Fall zeigte sich eine Trübung der Lösung ohne Bläschenbildung.

3.5.3 Nachweis der Koagulasereaktion

Der Nachweis der Koagulasereaktion erfolgte mit Hilfe des Röhrchentests nach der von KIOOS und LAMBE (1991) beschriebenen Methode. Zu 250 µl zitriertem Kaninchenplasma, gewonnen aus sterilem Zitratblut (1 Vol. 4 % Natriumzitatrat zu 9 Vol. Blut), wurden je drei Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen gegeben. Die Beurteilung erfolgte nach einer Bebrütung für vier bzw. 24h bei 37 °C. Eine positive Reaktion lag vor, wenn ein vollständiges oder überwiegend zusammenhängendes Koagulum zu erkennen war. Als Positivkontrolle diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346, als Negativkontrolle die *S. epidermidis*-Kultur DSM 20044.

3.5.4 Nachweis des Clumping-Factors

Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Factors erfolgte als Objektträgertest mit zitriertem Kaninchenplasma nach CADNESS-GRAVES et al. (1943). Dazu wurden 2-3 Kolonien der nach 3.2 angezüchteten Bakterien mittels einer sterilen Öse in einem Tropfen 0,14 mol/l Natriumchlorid-Lösung auf einem Objektträger suspendiert und dann mit einem Tropfen unverdünntem, zitriertem Kaninchenplasma vermischt. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens. Eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien im Plasmatropfen innerhalb von 1-2min wurde als positive Reaktion gewertet. Als Positivkontrolle diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346, als Negativkontrolle die *S. epidermidis*-Kultur DSM 20044.

3.5.5 Nachweis des Enzyms β -Galactosidase

Das Nachweisverfahren für dieses bakterielle Enzym beruhte auf der Abspaltung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons von dem nicht-fluoreszierenden Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactosid (SLIFKIN und GIL, 1983).

Aus einer zunächst hergestellten Stammlösung, die 5 µ mol/l 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactosid (Sigma, Steinheim), gelöst in 0,2 ml Dimethylsulfoxid (Carl Roth, Karlsruhe) enthielt, entstand durch Auffüllen mit 0,2 mol/l Na-Acetatpuffer (pH 5,2) 10 ml Gebrauchslösung.

Zum eigentlichen Nachweis des Enzyms wurden 4-5 Kolonien der zu untersuchenden Kultur mit Hilfe eines Glasstabs intensiv auf Filterpapier verrieben und 20 µl der Gebrauchslösung auf die eingeriebenen Bakterien getropft. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Substrats erfolgte die Inkubation für 1h bei 37 °C unter Abdeckung.

Eine positive Reaktion zeigte sich in einer deutlich leuchtend blauen Fluoreszenz unter UV-Licht (365 nm), die sich nach Zugabe von 20 µl einer 0,1 mol/l NaOH-Lösung noch verstärkte. Zur Überprüfung der Reaktion erfolgte der Versuchsansatz mit der β -Galactosidase-positiven *S. intermedius*-Kultur DSM 20373 und der enzymnegativen *S. aureus*-Kultur DSM 346.

3.5.6 Nachweis des Enzyms Hyaluronidase

Die Überprüfung der Hyaluronidasebildung erfolgte mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests. Eine nach 3.2 hergestellte Schafblutagarplatte wurde S-förmig mit einer mucoïd wachsenden Streptokokkenkultur (*S. equi* subsp. *equi*, Wildisolat) als Indikatorkeim sowie senkrecht dazu mit der zu untersuchenden Bakterienkultur beimpft und für 24h bei 37 °C bebrütet. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase zeigte sich in nicht-mucoïd wachsenden Kolonien der ansonsten mucoïd wachsenden Streptokokkenkultur in der Nähe des Staphylokokken-Impfstrichs. Die in den Agar diffundierte Hyaluronidase hemmte das mucoïde Wachstum der Streptokokken. Als Positivkontrolle diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346, als Negativkontrolle die *S. delphini*-Kultur DSM 20771.

3.5.7 Voges-Proskauer-Test

Dazu wurden 2-3 Kolonien der nach 3.2 angezüchteten Bakterien mittels steriler Öse in Voges-Proskauer-Medium (MR-VP-Bouillon, Merck, Darmstadt) beimpft und für 48h bei 37 °C inkubiert. Nach Zufügen von 3 ml α -Naphthol und 1 ml 40 % KOH zeigte ein deutlicher Farbumschlag nach Rot innerhalb von 10-30min eine positive Reaktion. Als Positivkontrolle diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346, als Negativkontrolle die *S. intermedius*-Kultur DSM 20373.

3.5.8 Empfindlichkeit gegenüber Colistin

Dazu wurden 5-6 gleichartige Kolonien der zu untersuchenden Kultur in 2 ml Nährbouillon I (Merck) suspendiert. Nach Auftropfen von 50 μ l der Bakteriensuspension (0,1 ml Bakteriensuspension verdünnt in 3 ml einer 0,14 mol/l NaCl-Lösung) auf Müller-Hinton-Agar (Oxoid, Wesel) mit Blutzusatz und Ausstreichen des Inokulums erfolgte das Auflegen der Testplättchen (Oxoid) mit einer sterilen Pinzette.

Das Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Müller-Hinton-Agar

Fleischinfusion	5,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	12,5 g/l
Schafblut	5 %
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert:	7,4 \pm 0,2

Nach einer Inkubation für 24h bei 37 °C erfolgte die Beurteilung der Hemmzonen. Eine Resistenz gegenüber Colistin mit einer Hemmzone von \leq 11 mm zeigte *S. aureus* DSM 346. *S. intermedius*-Kulturen wiesen Hemmzonen \geq 12 mm auf und wurden als empfindlich bewertet.

3.6 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

3.6.1 Agardiffusionstest

Die Überprüfung der Empfindlichkeit gegenüber Penicillin (6 µg) und Oxacillin (5 µg) erfolgte wie von dem NCCLS (2004) beschrieben. Dies wurde nach der unter 3.5.8 beschriebenen Methode geprüft. Als empfindlich gegenüber Penicillin erwiesen sich Kulturen mit einer Hemmzone von ≥ 29 mm, Kulturen mit einer Hemmzone von ≤ 28 mm wurden als resistent bewertet. Als empfindlich gegenüber Oxacillin erwiesen sich Kulturen mit einer Hemmzone von ≥ 18 mm, Kulturen mit einer Hemmzone von ≤ 17 mm wurden als resistent bewertet.

3.6.2 Wachstum auf Oxacillinresistenz-Screening-Agar-Basis (ORSAB)

Der Nachweis der Oxacillinresistenz erfolgte des weiteren auf ORSAB-Medium (Oxoid), das sich wie folgt zusammensetzt:

Pepton	11,8 g/l
Hefeextrakt	9,0 g/l
Mannit	10,0 g/l
Natriumchlorid	55,0 g/l
Lithiumchlorid	5,0 g/l
Anillinblau	0,2 g/l
Agar	12,5 g/l
Aqua dest.	1000 ml
pH 7,2 ±	

Dazu wurden die zu untersuchenden Kulturen mit einem Verdünnausstrich ausgestrichen und für 24-48h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Eine Oxacillinresistenz zeigte sich bei *S. aureus* in einem Wachstum mit deutlich blauen Kolonien und bei *S. intermedius* in einem Wachstum mit weißen Kolonien.

3.7 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren

3.7.1 DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“

Die Präparation der bakteriellen DNA erfolgte mit dem „DNeasy Tissue-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 3-4 Kolonien der auf Festmedium (3.2) angezüchteten Kulturen in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) mit 180 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl [pH 8,0]; 1 mmol/l EDTA) unter Zusatz von 8 µl Lysostaphin (1,8 U/µl; Sigma) gegeben und anschließend bei 37 °C für 1h inkubiert. Zur Deproteinisierung erfolgte eine Zugabe von 20 µl Proteinase K (Qiagen) und eine Inkubation für 2h bei 56 °C. Die nach kurzem Abkühlen mit 200 µl Ethanol (99 %) vermischte Präparation wurde in den Filtereinsatz mit Silicamembran (Qiagen) überführt und bei 14000 x g für 1min in 2 ml-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Eine Weiterbehandlung der an die Membran gebundenen DNA erfolgte durch zweimaliges Waschen mit jeweils 500 µl AW-Puffer (Qiagen). Die Membran wurde zunächst bei 14000 x g für 30sec und nach dem zweiten Waschschrift bei 14000 x g für 1min zur vollständigen Entfernung der Waschlösung abzentrifugiert. Nach Verbringen des Filtereinsatzes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte das Eluieren der gebundenen DNA durch Überschichten der Membran mit 200 µl AE-Puffer (Qiagen) mit anschließendem Abzentrifugieren des DNA-haltigen Eluats bei 14000 x g für 1min. Nach Abschluss des Elutionsschrittes konnte die DNA als „Template“ in die PCR eingesetzt bzw. bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.7.2 Vereinfachte Präparation der bakteriellen DNA

Die Aufbereitung der als „Template“ eingesetzten DNA erfolgte im weiteren in modifizierter Form nach der von FRÉNAY et al. (1996) beschriebenen Methode. Dazu wurden einige Kolonien der zu untersuchenden, nach 3.2 auf Festmedium angezüchteten Kulturen in Reaktionsgefäße (Eppendorf) mit 100 µl TE-Puffer (3.7.1) suspendiert und nach Zusatz von 5 µl Lysostaphin (1,8 U/µl; Sigma) für 1h bei 37 °C inkubiert. Zur Deproteinisierung erfolgte eine Zugabe von 10 µl Proteinase K (Qiagen) und eine Inkubation für 2h bei 56 °C. Nach einer Inkubation für 10min bei 100 °C im Wasserbad zur Inaktivierung der Proteinase K, Abkühlen für 3min auf Eis und Zentrifugation für 2min bei 14000 x g, konnte der Überstand als „Template“ in die PCR eingesetzt werden.

3.7.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung der PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich, wenn nicht anders angegeben, wie folgt zusammen:

Primer1 ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer2 ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
dNTP ^b	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer ^b	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂ ^b	0,6 µl (50 mmol/l)
Taq-Polymerase ^b	0,2 µl (Biotherm Polymerase)
Aqua bidest.	10 µl

a: Operon bzw. Biotech, Köln; b: Genecraft, Münster.

Nach gründlicher Durchmischung des „Mastermixes“ wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

3.7.4 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der DNA-Amplifikate erfolgte in 1,5 %-igem Agarosegel (Carl Roth). Dazu wurden 13 µl des PCR-Produkts (20 µl PCR-Produkt versetzt mit 3 µl 6x Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Agarosegel auftragen und bei 100 mA für 1,5h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Tris-Acetat Electrophorese Puffer (TAE, 4.0 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0). Eine Bestimmung der Größe der PCR Produkte ermöglichte ein ebenfalls in das Gel aufgetragener Marker (Längenstandard Serva DNA Standard pBR 328 Mix, Serva, Heidelberg; GeneRulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas, St. Leon-Rot).

3.7.5 Ethidiumbromidfärbung

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA-Fragmente durch Färbung des Gels für 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml, Carl Roth) wobei sich das fluoreszierende Ethidiumbromid als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA einlagert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Gele in Aqua dest. gewaschen und anschließend unter UV-Beleuchtung mit Hilfe eines Gel-Video-Dokumentationssystems (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Freiburg), photographisch dokumentiert. Die Fragmente stellten sich als helle Banden vor dunklem Hintergrund dar.

3.7.6 DNA Präparation aus Agarosegelen und Sequenzierung

Die DNA-Präparation aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAEX II Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zur DNA-Präparation wurde nach Agarosegelelektrophorese (3.7.4) und Ethidiumbromidfärbung (3.7.5), die entsprechende Bande (ca. 250 mg) aus dem Gel herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß mit 750 µl QX1-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 10 µl QIAEX II (Qiagen) gegeben, gut vermischt und für 10min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Dieser Ansatz wurde viermal jeweils nach 2min Inkubation durchmischt und dann bei 14000 x g für 30sec abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren des Sediments in 500 µl QX1 folgte ein erneutes Zentrifugieren für 30sec bei 14000 x g sowie ein Abpipettieren der Lösung. Eine Weiterbehandlung des DNA-Pellets erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PE-Puffer (Qiagen), Zentrifugieren bei 14000 x g für 30sec durch Abpipettieren der Waschlösung und Trocknen des DNA-Pellets bei 25 °C für 15min. Das Eluieren der DNA erfolgte mit 20 µl 10 mmol/l TrisHCl, pH8,5 (Qiagen) und anschließendem Zentrifugieren des DNA-haltigen Eluats bei 14000 x g für 1min. Nach Abschluss des Elutionsschrittes konnte der Überstand als „Template“ in die Sequenzierung eingesetzt bzw. bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Sequenzierungen erfolgten durch Genterprise (Mainz, Deutschland). Sequenzanalysen und ein Sequenzvergleich mit Gensequenzen des National Centre für Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt.

3.7.7 Untersuchung der *S. aureus*-Kulturen

3.7.7.1 Identifizierung

3.7.7.1.1 Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc*

Zur Amplifizierung des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. aureus* wurden die von BRAKSTAD et al. (1992) beschriebenen Primer1 mit der Sequenz 5'-GCGATTGATG GTGATACGGTT-3' und Primer2 mit der Sequenz 5'-AGCCAAGCCTTGACGAAGTAAAGC-3' in die PCR eingesetzt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
37 Zyklen	94 °C	60 sec	Denaturierung
	55 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	90 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.7.1.2 Nachweis eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA

Zur Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts innerhalb der chromosomalen DNA wurden die von MARTINEAU et al. (1998) beschriebenen Primer Sa442-1 mit der Sequenz 5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG-3' und Sa442-2 mit der Sequenz 5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATAACAACA-3' in die PCR eingesetzt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	55 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	30 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.7.1.3 Nachweis des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa*

Zur Amplifizierung des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa* von *S. aureus* wurden die von SEKI et al. (1998) beschriebenen Primer SPA-1 mit der Sequenz 5'-CACCTGCTGCAAATGCTGCG-3' und SPA-2 mit der Sequenz 5'-GGCTTGTTGTTGTCTTCC TC-3' in die PCR eingesetzt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	60 sec	Denaturierung
	58 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.7.2 Weitergehende Charakterisierung

3.7.7.2.1 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* durch Multiplex-PCR

Zur Amplifizierung der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* wurden die von JOHNSON et al. (1991) beschriebenen Primer eta1 mit der Sequenz 5'-CTAGTGCATTTGTTATTCAA-3', eta2 mit der Sequenz 5'-TGCATTGACACCATAGTACT-3', etb1 mit der Sequenz 5'-ACGGCTATATAC ATTCAATT-3' und etb2 mit der Sequenz 5'-TCCATCGATAATATACCTAA-3' in die PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Primer eta1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer eta2	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer etb1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer etb2	0,7 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂	0,8 µl (50 mmol/l)
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	8,4 µl

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	2 min	Denaturierung
	55 °C	2min	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.7.2.2 Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB*

Zur Amplifizierung des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer *purB1* mit der Sequenz 5`-ACGCAA ACATTGCAACGCGATCG-3` und *purB2* mit der Sequenz 5`-CGTATGCTTCTTCACGA ACCATAACC-3` in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer AB036769 erhaltenen Gensequenz mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO 4.0.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	60 sec	Denaturierung
	60 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	40 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

Da ein *etd*-Referenzstamm nicht verfügbar war, konnte das Vorkommen dieses Exfoliativen Toxingens für die Stämme der vorliegenden Untersuchungen nicht untersucht werden.

3.7.7.2.3 Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp*

Zur Amplifizierung des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp* wurden die von De HAAS et al. (2004) beschriebenen Primer *chp1* mit der Sequenz 5'-GAAAAAGAAATTAGCAACAACAG-3' und *chp2* mit der Sequenz 5'-CATAAGATGATTTAGACTCTCC-3' in die PCR eingesetzt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	95 °C	3 min	Initiale Denaturierung
32 Zyklen	95 °C	30 sec	Denaturierung
	48 °C	50 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.8 Untersuchung der *S. intermedius*-Kulturen

3.7.8.1 Identifizierung

3.7.8.1.1 Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* durch Multiplex-PCR

Zur Amplifizierung des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. intermedius* und *S. aureus* und eines universellen Genabschnitts der 16S rDNA wurden die von BARON et al. (2004) beschriebenen Primer *SInuc1* mit der Sequenz 5'-CAATGGAGATGGCCCTTTTA-3', *SInuc2* mit der Sequenz 5'-AGCGTACACGTTCATCTTG-3', *SAnuc1* mit der Sequenz 5'-TGCTATGATTGTGGTAGCCATC-3', *SAnuc2* mit der Sequenz 5'-TCTCTAGCAAGTCCCTTTTC CA-3', *16S1* mit der Sequenz 5'-GGACGGGTGAGTAACACGTGG-3' und *16S2* mit der Sequenz 5'-TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT-3' in die PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Primer <i>SInuc1</i>	1,8 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>SInuc2</i>	1,8 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>SAnuc1</i>	1,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>SAnuc2</i>	1,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>16S1</i>	0,4 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>16S2</i>	0,4 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂	3,2 µl (50 mmol/l)

Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	1 µl

Nach gründlicher Durchmischung des „Mastermixes“ wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	95 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	95 °C	30 sec	Denaturierung
	55 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	30 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	7 min	Elongation

3.7.8.1.2 Nachweis des *dnaJ*-Gens von *S. intermedius*

Zur Amplifizierung des *dnaJ*-Gens von *S. intermedius* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer *dnaJ1* mit der Sequenz 5`-TCAATTTTTCGGCGGTGCAC AACG-3` und Primer *dnaJ2* mit der Sequenz 5`-CTCAGGAACTGTCAGCATCACATG-3` in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte, wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben, mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer AB234078 erhalten Gensequenz.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	55 °C	55 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.8.2 Weitergehende Charakterisierung

3.7.8.2.1 Nachweis des Exfoliativen Toxingens *siet*

Zur Amplifizierung des Exfoliativen Toxingens *siet* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer *siet1* mit der Sequenz 5`-ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG-3` und Primer *siet2* mit der Sequenz 5`-CCATTACTTTTCGCTTGTTGTGC-3` in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte, wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben, mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer BN000819 erhalten Gensequenz.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
----------	-------	-------	------------------------

30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	56 °C	40 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.8.2.2 Nachweis des Enterotoxins *se-int*

Zur Amplifizierung des Enterotoxins *se-int* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer *se-int1* mit der Sequenz 5'-AAAGGGGAATGAAGAAGATAA-3' und Primer *se-int2* mit der Sequenz 5'-AATGAACTTCAATTTTTATGTC-3' in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte, wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben, mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer AB116378 erhaltenen Gensequenz.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	48 °C	40 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.8.2.3 Nachweis der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF* durch Multiplex-PCR

Zur Amplifizierung der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF* wurden die von FUTAGAWA-SAITO et al. (2004a) beschriebenen Primer *lukS1* mit der Sequenz 5'-TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG-3', *lukS2* mit der Sequenz 5'-GCCCGATAGGACTTCTTACAA-3', *lukF1* mit der Sequenz 5'-CCTG TCTATGCCGCTAATCAA-3' und *lukF2* mit der Sequenz 5'-AGGTCATGGAAGCTATCTCGA-3' in die PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Primer <i>lukS1</i>	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>lukS2</i>	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>lukF1</i>	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>lukF2</i>	0,7 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂	1 µl (50 mmol/l)
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	8,2 µl

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	94 °C	60 sec	Denaturierung
	57 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.8.2.4 Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB*

Der Nachweis erfolgte wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben.

3.7.8.2.5 Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp*

Der Nachweis erfolgte wie unter 3.7.7.2.3 beschrieben.

3.7.8.2.6 Nachweis von Resistenzgenen durch Multiplex-PCR

Zur Amplifizierung des *mecA*-Oxacillinresistenzgens wurden die von STROMMINGER et al. (2003) beschriebenen Primer *mecA1* mit der Sequenz 5`-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3` und *mecA2* mit der Sequenz 5`-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3` verwendet. Die Amplifizierung des *blaZ*-Penicillinresistenzgens erfolgte mit den von MARTINEAU et al. (2000) beschriebenen Primer *blaZ1* mit der Sequenz 5`-ACTTCAACACCTGCTGCTTTC-3` und *blaZ2* mit der Sequenz 5`-TGACCACTTTTATCAGCAACC-3` in die PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Primer <i>mecA1</i> ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>mecA2</i> ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>blaZ1</i> ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer <i>blaZ2</i> ^a	0,7 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂	1 µl (50 mmol/l)
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	8,2 µl

a: Operon, Köln

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	4 min	Initiale Denaturierung
40 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	55 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	60 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.9 Untersuchung der *S. hyicus*-Kulturen

3.7.9.1 Identifizierung

3.7.9.1.1 Nachweis eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA*

Zur Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer STA-H-SodI mit der Sequenz 5`-GCTTATCGCGAATGTTGACCAAT-3` und STA-H-SodII mit der Sequenz 5`-TCGTGCTGCTGCTTTATCTGAG-3` in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte, wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben, mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer AJ343913 erhalten Gensequenz.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale
			Denaturierung
31 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	60 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	50 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.9.1.2 Nachweis eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA

„ intergenic spacer“ Region (ISR)

Zur Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region wurden die von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Primer STA-H-HyI mit der Sequenz 5`-TACGGAATATCGCCTTAGG-3` und STA-H-HyII mit der Sequenz 5`-AAAACATC TGTCATCCGAAG-3` in die PCR eingesetzt.

Die erfolgte nach folgendem Programm

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	57 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	40 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.9.2 Weitergehende Charakterisierung

3.7.9.2.1 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* durch Multiplex-PCR

Zur Amplifizierung der Exfoliativen Toxingene von *S. hyicus* wurden die von ANDRESEN und AHRENS (2004) beschriebenen Primer MU4FA (*exhA*) mit der Sequenz 5'-GCTACTGGTTT TGTAGTTTCAC-3', MU3RA (*exhA*) mit der Sequenz 5'-GTAACCTACAACCTCTTAGAACC-3', F2EB (*exhB*) mit der Sequenz 5'-AACACGCCAATAGAGAATGTATCAC-3', MU3RB (*exhB*) mit der Sequenz 5'-TATCAAATCTTATACCAGTTAGAATATCTCC-3', MU3FC (*exhC*) mit der Sequenz 5'-GAATAAATATTATGGAGTCTCTCCTGATC-3', MU4RC (*exhC*) mit der Sequenz 5'-CCATAGTATTTCAATCCAAAATCAGTAC-3', F2ED (*exhD*) mit der Sequenz 5'-GAACAAATATAATGGAAGAAACCCAC-3' und MU3RD (*exhD*) mit der Sequenz 5'-GATTTCCCTACGTGAATACCTACAATAC in die PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der Multiplex-PCR erfolgte zunächst die Erstellung des Reaktionsgemisches ohne Bakterien-DNA (=Mastermix).

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Primer ExhA1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhA2	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhB1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhB2	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhC1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhC2	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhD1	0,7 µl (10 pmol/µl)
Primer ExhD2	0,7 µl (10 pmol/µl)
dNTP	0,8 µl (10 mmol/l)
Inkubationspuffer	2,0 µl (10x Biotherm Puffer)
MgCl ₂	1 µl (50 mmol/l)
Taq-Polymerase	0,2 µl (Biotherm Polymerase)
Aqua bidest.	5,4 µl

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 15 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 5 µl der nach 3.7.1 präparierten DNA vermischt.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm.

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	56 °C	60 sec	Primeranlagerung
	72 °C	40 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.9.2.2 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *sheta* und *shetb* von *S. hyicus*

Zur Amplifizierung der Exfoliativen Toxingene *sheta* und *shetb* von *S. hyicus* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Primer *sheta1* mit der Sequenz 5`-GAACACGTTTT TCAGCCATATCTCC-3`, *sheta2* mit der Sequenz 5`-CGATTACAGTTGCCAATACCGTTC-3`, *shetb1* mit der Sequenz 5`-GAGGCTTTACAGCCAAAATTATATGCTAG-3` und *shetb2* mit der Sequenz 5`-CAAATCGCTTCCTAGAGTATCTATTTTTTTG-3` in die PCR eingesetzt. Die Primerauswahl erfolgte, wie unter 3.7.7.2.2 beschrieben, mit der unter der Gendatenbank-Zugangsnummer AB036768, AB036767 erhalten Gensequenz.

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm.

1 Zyklus	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
30 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung
	58 °C	30 sec	Primeranlagerung
	72 °C	70 sec	Polymerisierung
1 Zyklus	72 °C	5 min	Elongation

3.7.10 Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Die Erstellung eines „DNA-Fingerprint“ erfolgte durch Präparation der bakteriellen DNA, Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).

3.7.10.1 Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Die Präparation und der anschließende Restriktionsverdau erfolgte nach einer modifizierten Methode von EISSA (2007). Die Bakterien wurden 24h in 5 ml Todd-Hewitt-Bouillon [6,4 g/l Todd-Hewitt Medium (Oxoid); 1000 ml Aqua dest.] angezchtet, nach anschließendem Abzentrifugieren für 10 min (9500 x g) zweimal in TE-Puffer (3.7.1) gewaschen, in TE-Puffer resuspendiert und zuletzt photometrisch bei 600 nm auf eine Dichte von 5 % Transmission eingestellt. Agarose [Pulsed Field Certified (Bio-Rad, München); 1 %ige w/v in TE-Puffer] wurde bei 56 °C im Wasserbad mit gleichen Teilen der Bakteriensuspension gemischt und in Gießformen

zu 100 µl Blöckchen gegossen. Die Zellwandlysis erfolgte in 200 µl Lysispuffer [0,5 g Polyoxyethylene (Sigma); 0,2 g Deoxycholic Acid (Sigma); 0,5 g N-Lauroylsarcosine (Sigma); 72,6 mg Tris (Merck); 3,722 g EDTA (Merck); 5,86 g Natriumchlorid (Merck); die Chemikalien wurden in ca. 450 ml deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von ca. 8,0 eingestellt. Danach wurde auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert.], 20 mg/ml Lysozym (Sigma) und 5 U/ml Lysostaphin (3.7.1) über Nacht bei 37 °C, eine Deproteinisierung durch Zugabe von 0,5 mg/ml Proteinase K (3.7.1) und Inkubation, erneut über Nacht, bei 56 °C. Die Agaroseblöckchen wurden zweimal für 30min in 200µl TE-Puffer/Blöckchen bei Raumtemperatur gewaschen und zur Proteinase K-Inaktivierung mit 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Merck) zweimal für 1h bei 56 °C inkubiert. Abschließend wurden die Blöckchen erneut zweimal für 30min bei Raumtemperatur in 200 µl TE-Puffer/Blöckchen gewaschen.

Der Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Verdau mit dem Restriktionsenzym *ApaI* für 24 h bei 30 °C

DNA (1 Blöckchen)	ca. 1 µg
Puffer A (10x; Promega, USA)	20 µl
<i>ApaI</i> (40U; Promega)	3 µl
Aqua dest.	177 µl

3.7.10.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Das Auftrennen der nach 3.7.10.1 präparierten DNA mittels PFGE erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Dazu wurden 1,1 g Agarose (siehe 3.7.10.1) in 55 ml Wasser und 55 ml 0,5 x TBE-Puffer [121,1 g Tris Base 1 mol/l (Merck); 61,8 g Borsäure 1 mol/l (Merck); 5,845 g 1 mmol/l EDTA (Merck)] in der Mikrowelle geschmolzen und in die vorbereitete Gelkammer (13 x 14 x 0,55 mm Flachbettform) gegossen. Zuvor wurden 2 bis 3 ml des Gels abgenommen und bei 56 °C gelagert. Dieses Gel diente zum Verschluss der Geltaschen. Nach der Restriktionszeit (3.7.10.1) wurden die Blöckchen in die Geltaschen eingeführt (je nach Kammgröße ½ oder 1 ganzer Block). Nach Einsetzen der Blöckchen in die Vertiefungen des Agarosegels und Verschließen der Vertiefungen mit flüssigem 1 %igem Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer erfolgte die Elektrophorese anschließend in CHEF-DR II „Pulse Field Electrophoresis System“ [Chef DR II-Elektrophoresegerät (Bio-Rad)] mit 2,5 l zuvor auf 14 °C gekühltem 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer .

	Lauf I	Lauf II
Spannung	6 Volt	6 Volt
Pulszeiten	0,5-10s (linearer Gradient)	20-25s (linearer Gradient)
Dauer	16,5h	4,5h
Temperatur	14 °C	14 °C

Als Längenstandard dienten Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb) (Sigma); Low Range Marker (0.1-200 Kb) (Sigma).

Nach der Elektrophorese erfolgte das Färben und die Dokumentation des Gels (3.7.5).

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung der Staphylokokkenkulturen mittels konventioneller Verfahren

Die in den vorliegenden Studien untersuchten 150 Staphylokokkenkulturen konnten aufgrund der im weiteren aufgezeigten phänotypischen Eigenschaften als *S. aureus* (n=72), SIG (n=38) und *S. hyicus* (n=40) identifiziert werden. Zum Vergleich dienten die unter 3.1 genannten Referenzstämme.

4.1.1 Differenzierung der Hämolyseformen

Die Unterscheidung der Hämolyseformen der 150 Staphylokokkenkulturen erfolgte nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten und nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode.

Dabei zeigten 24 *S. aureus*-Kulturen eine α -Hämolyse, die sich als vollständige Hämolysezone um den Staphylokokkenimpfstrich und als eine Hemmung der vollständigen Hämolyse im Bereich des *S. aureus*- β -Hämolysins darstellte.

Eine β -Hämolyse trat bei 23 *S. aureus*- und 36 SIG-Kulturen auf. Sie stellte sich als Zone unvollständiger Hämolyse um den Staphylokokkenimpfstrich dar.

Bei 7 *S. aureus* und einer SIG-Kultur konnte eine δ_1 -Hämolyse beobachtet werden. Diese zeigte sich als schmale Zone einer vollständigen Hämolyse um den Staphylokokken-Impfstrich, bzw. nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode, in einer gemeinsam mit dem *S. aureus*- β -Hämolysin auftretenden halbmondförmigen Zone einer vollständigen Hämolyse.

Eine δ_2 -Hämolyse zeigten 6 *S. aureus*-Kulturen. Bei diesen Kulturen war nur synergistisch mit dem *S. aureus*- β -Hämolysin eine vollständige halbmondförmige Hämolyse nachweisbar. Bei 26 *S. hyicus*-Kulturen konnte eine schwache δ_2 -Hämolyse beobachtet werden (Abb. 7)

Bei 12 *S. aureus*-, einer SIG- und 14 *S. hyicus*-Kulturen war keine Hämolyse auf Schafblutagarplatten bzw. nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode festzustellen. Die Anzahl der Kulturen und Hämolyseformen sind in Tab. 3 dargestellt.

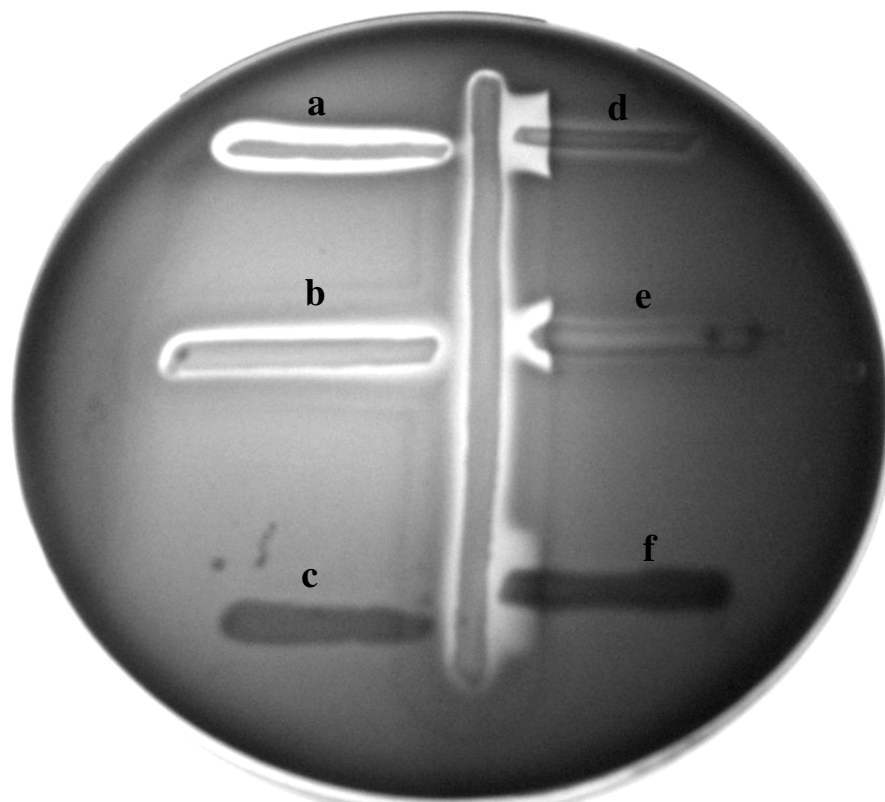


Abb. 7: Hämolyseformen der Staphylokokkenkulturen (horizontal links: α -Hämolyse (a), β -Hämolyse (b), keine Hämolyse (c); rechts: δ_1 -Hämolyse (d), δ_2 -Hämolyse (e), typische schwache δ_2 -Hämolyse von *S. hyicus* (f); vertikal: β -hämolysierender *S. aureus*).

Tab. 3: Hämolyseformen der 150 untersuchten Staphylokokkenkulturen auf Schafblutagar

Spezies	Hämolyse				
	α	β	δ_1	δ_2	Keine Hämolyse
<i>S. aureus</i> (n=72)	24*/33**	23/32	7/10	6/8	12/17
SIG (n=38)	0/0	36/94,8	1/2,6	0/0	1/2,6
<i>S. hyicus</i> (n=40)	0/0	0/0	0/0	26***/65	14/35

n=Anzahl der Kulturen; * Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Hämolyseform; **Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Hämolyseform in %; ***schwache δ_2 -Hämolyse.

4.1.2 Phänotypische Eigenschaften

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte nach der unter 3.5.2 beschriebenen Methode. Alle 150 untersuchten Staphylokokkenkulturen zeigten eine positive Reaktion mit einer deutlichen Bläschenbildung. Das Referenzstamm *S. aureus* subsp. *anaerobius* DSM 20714 zeigte keine vergleichbare Reaktion.

Zur weiteren Charakterisierung der Isolate wurde die Koagulaseaktivität im Röhrchentest nach 3.5.3 untersucht. Dabei zeigten 72 *S. aureus*-, 27 *S. hyicus*- und 38 SIG-Kulturen innerhalb von 24h eine Koagulation des Plasmas und somit eine positive Reaktion. Innerhalb der *S. hyicus*-Kulturen zeigten 13 Kulturen nach 24h keine Koagulation des Plasmas und erwiesen sich somit als koagulasenegativ.

Der Nachweis des Clumping-Factors erfolgte nach der unter 3.5.4 beschriebenen Methode. Dabei waren 72 *S. aureus*- und 24 SIG-Kulturen Clumping-Factor-positiv. Bei 14 SIG- und 40 *S. hyicus*-Kulturen war keine vergleichbare Reaktion festzustellen.

Der Nachweis des Enzyms β -Galactosidase erfolgte nach der unter 3.5.5 beschriebenen Methode. Dabei zeigten 38 SIG-Kulturen eine deutlich leuchtend blaue Fluoreszenz unter UV-Licht und somit eine positive Reaktion. Alle 72 *S. aureus*- und 40 *S. hyicus*-Kulturen zeigten keine vergleichbare Reaktion.

Im weiteren war das Enzym Hyaluronidase (3.5.6) bei allen 72 *S. aureus*- und 40 *S. hyicus*-Kulturen nachweisbar. Bei allen 38 SIG-Kulturen war keine vergleichbare Reaktion festzustellen.

Eine positive Voges-Proskauer-Reaktion konnte bei allen 72 *S. aureus*-Kulturen festgestellt werden; bei allen 38 SIG- und 40 *S. hyicus*-Kulturen war diese Reaktion negativ.

Die Eigenschaften sind in Tab. 4 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4: Phänotypische Eigenschaften der 150 untersuchten Staphylokokkenkulturen

Spezies	Katalase	Koagulase	Clumping-Factor	β -Galactosidase	Hyaluronidase	Voges-Proskauer
<i>S. aureus</i> (n=72)	+ (72*/100**)	+ (72/100)	+ (72/100)	- (72/100)	+ (72/100)	+ (72/100)
SIG (n=38)	+ (38/100)	+ (38/100)	+ (24/63); - (14/37)	+ (38/100)	- (38/100)	- (38/100)
<i>S. hyicus</i> (n=40)	+ (40/100)	+ (27/67,5); - (13/32,5)	- (40/100)	- (40/100)	+ (40/100)	- (40/100)

n=Anzahl der Kulturen; *Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Reaktion; **Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Reaktion in %; +=positive Reaktion; -=negative Reaktion.

4.1.3 Empfindlichkeit gegenüber Colistin

Zur weiteren Differenzierung der SIG-Kulturen gegenüber *S. aureus* wurde nach 3.5.8 die Colistinempfindlichkeit geprüft. Alle 38 SIG-Kulturen reagierten empfindlich gegenüber Colistin. *S. aureus* DSM 346 erwies sich als resistent.

4.2 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

4.2.1 Agardiffusionstest

Alle 38 SIG-Kulturen und der Kontrollstamm *S. aureus* 1150/93 wurden mit der unter 3.5.8 beschriebenen Agardiffusionsmethode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den unter 3.6.1 beschriebenen Antibiotika Penicillin und Oxacillin untersucht.

Alle 38 SIG-Kulturen zeigten eine Resistenz gegenüber Penicillin, 10 SIG-Kulturen eine Resistenz gegenüber Oxacillin.

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Antibiotikaempfindlichkeiten der untersuchten 38 SIG-Kulturen und von *S. aureus* 1150/93

Spezies	Penicillin	Oxacillin
SIG (n=38)	R (38*/100**)	R (10/26); S (28/74)
<i>S. aureus</i> 1150/93	R	R

n=Anzahl der Kulturen; *Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Antibiotikaempfindlichkeit; **Anzahl der Kulturen mit der jeweiligen Antibiotikaempfindlichkeit in %; R=resistent; S=empfindlich.

4.1.3 Wachstum auf Oxacillinresistenz-Screening-Agar-Basis (ORSAB)

Der Nachweis der Oxacillinresistenz auf ORSAB-Medium erfolgte nach der unter 3.6.2 beschriebenen Methode. Eine Oxacillinresistenz zeigte sich bei *S. aureus* 1150/93 in einem Wachstum mit deutlich blauen Kolonien und bei 10 SIG-Kulturen in einem Wachstum mit weißen Kolonien.

28 SIG-Kulturen erwiesen sich als empfindlich gegenüber Oxacillin und zeigten kein Wachstum auf ORSAB.

4.3 Identifizierung und weitergehende Charakterisierung mittels molekularer Verfahren

4.3.1 Untersuchung der *S. aureus*-Kulturen

4.3.1.1 Identifizierung

4.3.1.1.1 Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc*

Die Amplifizierung des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* nach der unter 3.7.7.1.1 beschriebenen Methode ergab bei allen untersuchten 72 *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 280 Bp (279 Bp erwartete Größe) (Abb. 8). Die anderen untersuchten Staphylokokkenspezies erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 6 wiedergegeben.

4.3.1.1.2 Nachweis des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA

Die Amplifizierung des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA mit der unter 3.7.7.1.2 beschriebenen Methode ergab bei allen untersuchten 72 *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 110 Bp (108 Bp erwartete Größe) (Abb. 8). Die anderen untersuchten Staphylokokkenspezies erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 6 wiedergegeben.

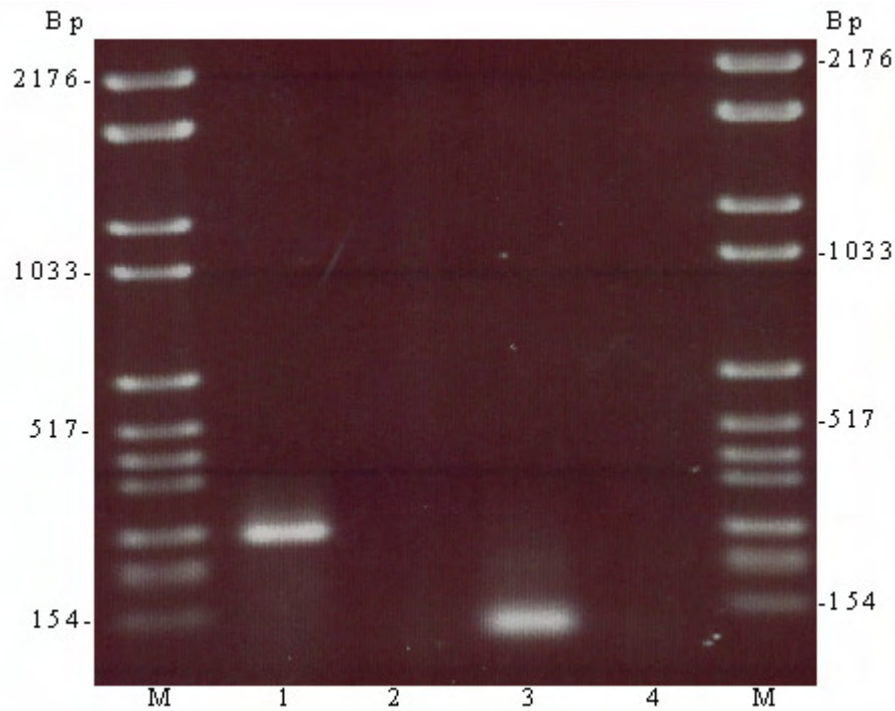


Abb. 8: Amplikon des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. aureus* DSM 346 (1) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *nucA*-1 und *nucA*-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (2). Amplikon des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts *Sa44* innerhalb der chromosomalen DNA von *S. aureus* DSM 346 (3) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *Sa442*-1 und *Sa442*-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (4); M= Längenstandard Serva DNA Standard pBR 328 Mix, Serva, Heidelberg.

4.3.1.1.3 Nachweis des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa*

Die Amplifizierung des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa* mit den Oligonukleotidprimern *SPA*-1 und *SPA*-2 ergab bei 70 *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 920 Bp und bei 2 *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 750 Bp. Das entsprach, nach SEKI et al. (1998), 5 IgG-bindenden „Repeats“, bzw. 4 IgG-bindenden „Repeats“ (Abb. 9). Bei den anderen untersuchten Staphylokokkenspezies war eine Amplifizierung dieses Genabschnitts nicht möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 6 wiedergegeben.

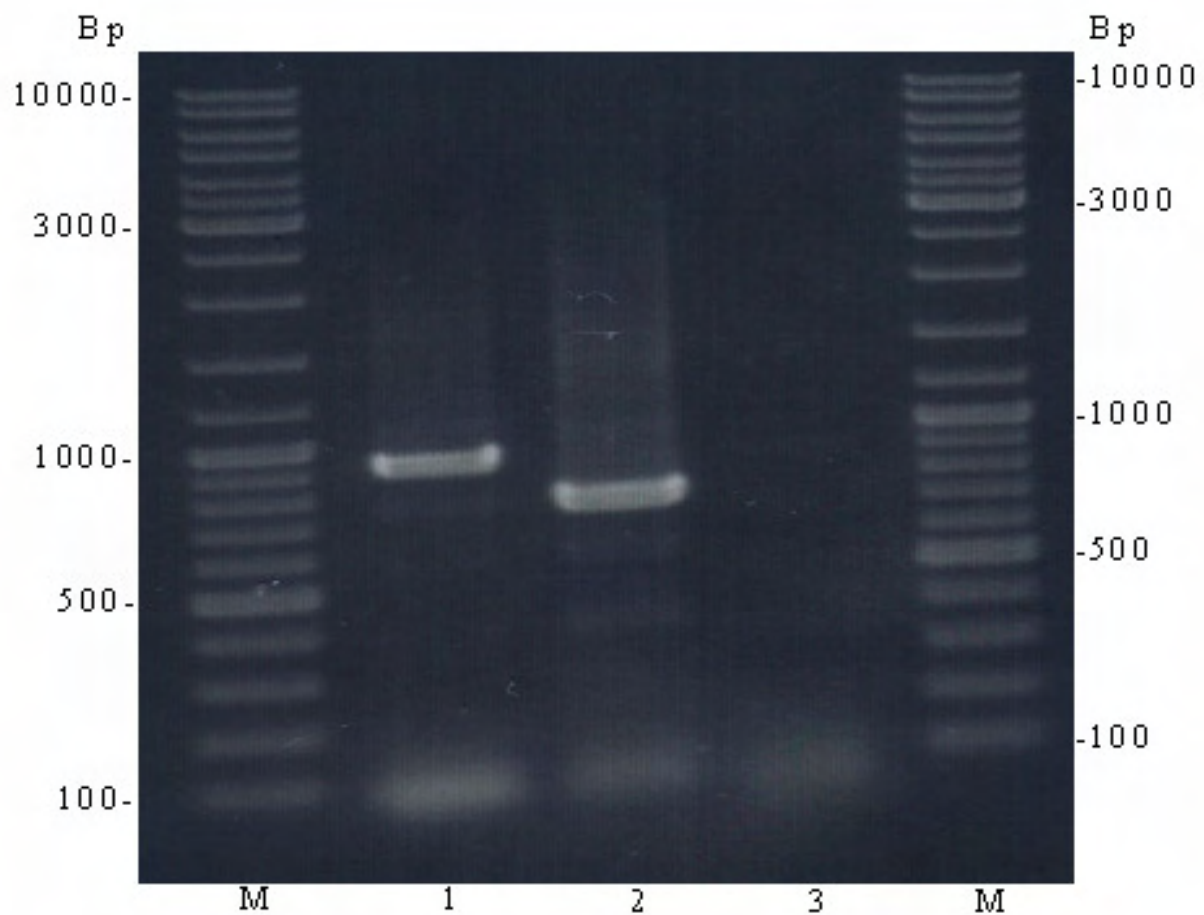


Abb. 9: Unterschiedliche Amplikons des Genabschnitts, der die IgG-bindende Region des Protein A-Gens *spa* kodiert (1=920 Bp, entsprechend 5 IgG-bindende „Repeats“, 2=750 Bp, entsprechend 4 IgG-bindende „Repeats“); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (3); M=GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, St. Leon-Rot

Tab. 6: Spezifität der Oligonukleotidprimer des Thernonuclease-kodierenden Gens *nuc*, des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA und des die IgG-bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa*

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern			
		nucA-1/nucA-2 (<i>nuc</i> , 280*)	Sa442-1/Sa442-2 (sa442,110)	Spa1/Spa2	
				(<i>spa</i> , 920)	(<i>spa</i> , 750)
<i>S. aureus</i> (Rind; Mastitis)	20	+ (20**/100***)	+ (20/100)	+ (18/90)	+ (2/10)
<i>S. aureus</i> (Weitere tiermedizinische Untersuchungsmaterialien)	24	+ (24/100)	+ (24/100)	+ (24/100)	-
<i>S. aureus</i> (Humanmedizinische Untersuchungsmaterialien)	28	+ (28/100)	+ (28/100)	+ (28/100)	-
<i>S. aureus</i> DSM 346	1	+	+	+	-
<i>S. intermedius</i> DSM 20373	1	-	-	-	-
<i>S. hyicus</i> DSM 20459	1	-	-	-	-

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=speziesspezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat.;
Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; *Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %.

4.3.1.2 Weitergehende Charakterisierung

4.3.1.2.1 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* durch Multiplex-PCR

Der Nachweis der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* erfolgte mit der unter 3.7.7.2.1 beschriebenen Methodik mittels Multiplex-PCR. Die Amplifikatgrößen für die einzelnen Exfoliativen Toxingene waren für *eta* ca. 120 Bp (119 Bp erwartete Größe) und für *etb* ca. 200 Bp (200 Bp erwartete Größe). Die Amplifikate ließen sich eindeutig voneinander unterscheiden (Abb. 10).

Das Gen *eta* war bei 3 *S. aureus*-Kulturen nachweisbar, das Gen *etb* bei 2 *S. aureus*-Kulturen. Die verbleibenden 69 bzw. 70 *S. aureus*-Kulturen waren *eta*- bzw. *etb*-negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Multiplex-PCR ist in Tab. 7 wiedergegeben.

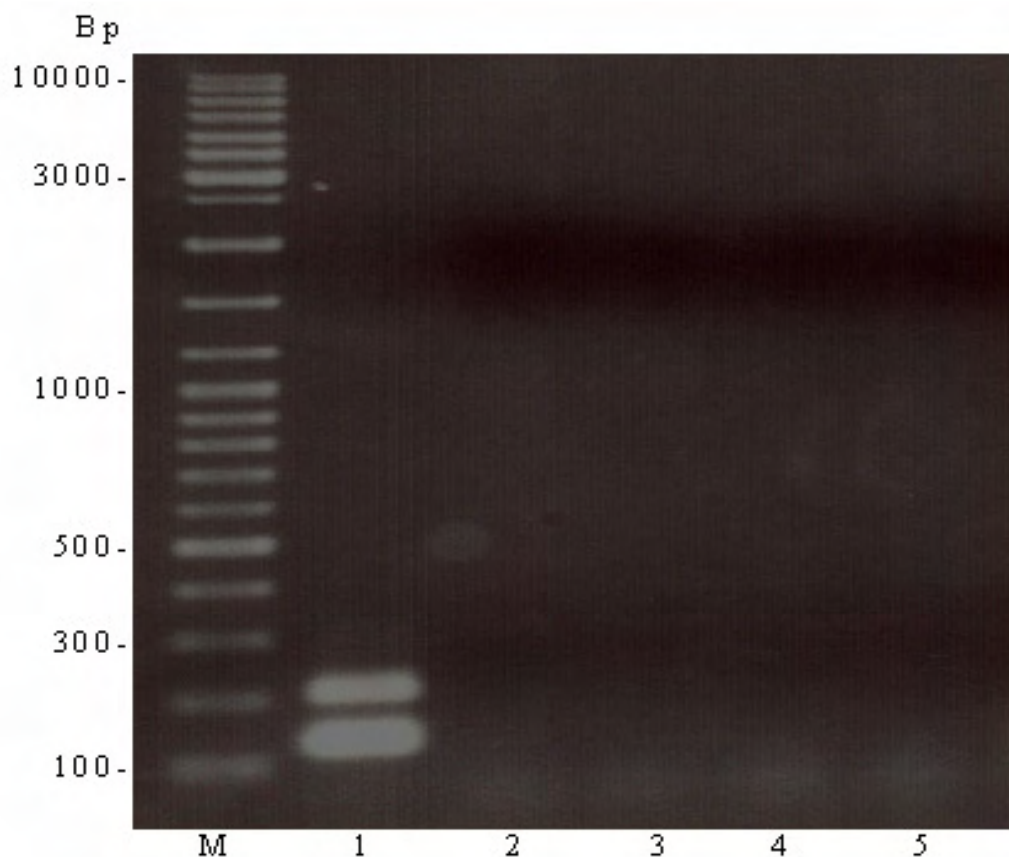


Abb. 10: Amplikons der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* der *S. aureus*-Kultur 114/92 (1) mit einer Größe von ca. 120 Bp bzw. von ca. 200 Bp; 2 bis 5=negative PCR-Reaktionen von weiteren *S. aureus*-Kulturen ; M=siehe Abb. 9.

4.3.1.2.2 Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB*

Die Amplifizierung des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB* mit der unter 3.7.7.2.2 beschriebenen Methode ergab bei allen 72 untersuchten *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 490 Bp (487 Bp erwartete Größe) (Abb. 11). Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 7 wiedergegeben.

Das *purB*-Amplikon der *S. aureus*-Kultur P1444/05 wurde sequenziert. Die ermittelte *purB*-Basensequenz entsprach zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen *purB*-Sequenz (Abb. 12). Die Aminosäuresequenz der Adenylsuccinatlyase der vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 100 % der in der Datenbank beschriebenen Adenylsuccinatlyase-Sequenz (Abb. 13).

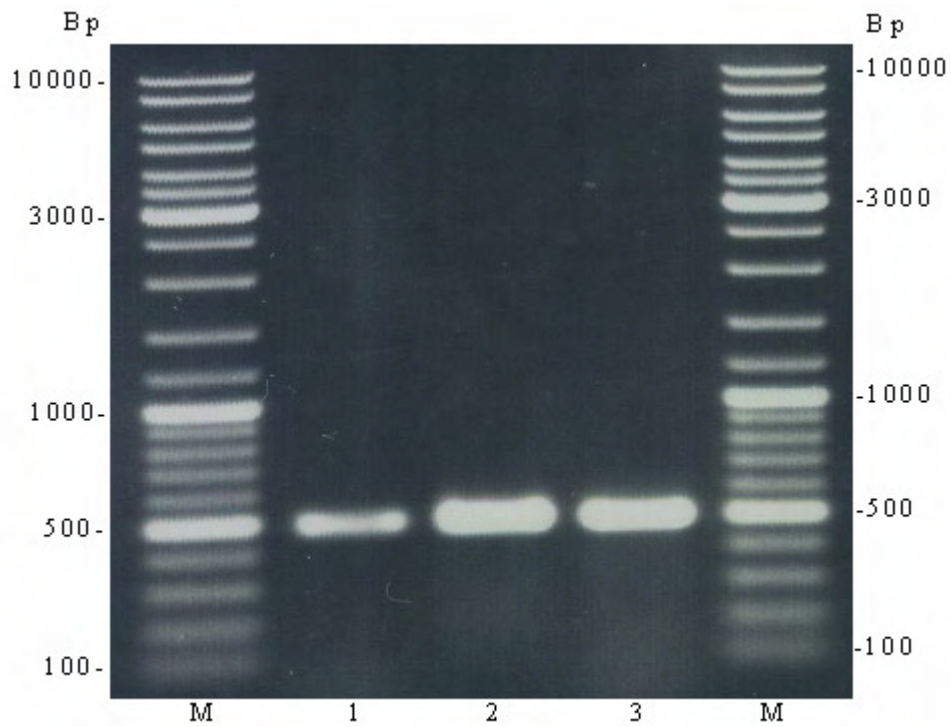


Abb. 11: Typisches Amplikon des *purB*-kodierenden-Gens von drei *S. aureus*-Kulturen (1, 2, 3); M =siehe Abb. 9.

```

purB_S.aureus_1444      CTTAGCATTAATCGCGACGTCCTAGAAAAATTTGCCGTTGAAATTCGTA 50
purB_S.aureus_AB036769 CTTAGCATTAATCGCGACGTCCTAGAAAAATTTGCCGTTGAAATTCGTA 50
*****

purB_S.aureus_1444      ACCTTCAAAAAACCGAAACAAGAGAAGTTGAAGAAGCATTGCAAAAGGC 100
purB_S.aureus_AB036769 ACCTTCAAAAAACTGAAACAAGAGAAGTTGAAGAAGCATTGCAAAAGGT 100
*****

purB_S.aureus_1444      CAAAAAGGTTTCATCTGCAATGCCTCATAAACGAAATCCAATTGGTTCTGA 150
purB_S.aureus_AB036769 CAAAAAGGTTTCATCTGCAATGCCTCATAAACGAAATCCAATTGGTTCTGA 150
*****

purB_S.aureus_1444      AAATATCACAGGTATTTCAAGAGTCATTCGTGGTTATATTACTACAGCTT 200
purB_S.aureus_AB036769 AAATATCACAGGTATTTCAAGAGTAATTCGTGGTTATATTACTACAGCTT 200
*****

purB_S.aureus_1444      ATGAGAATGTGCCATTATGGCATGAAAGAGATATTTCTCATTCTTCTGCT 250
purB_S.aureus_AB036769 ATGAGAATGTGCCATTATGGCATGAAAGAGATATTTCTCATTCTTAGCT 250
*****

purB_S.aureus_1444      GAGCGTATTATGTTACCAGATGTTACAATAGCACTAGATTATGCATTGAA 300
purB_S.aureus_AB036769 GAGCGTATTATGTTACCAGATGTTACAATAGCACTAGATTATGCATTGAA 300
*****

purB_S.aureus_1444      TCGTTTCACAAATATTGTGGACCGTTTAACTGTATTTGAAGATAATATGC 350
purB_S.aureus_AB036769 TCGTTTCACGAATATTGTGGACCGTTTAACTGTATTTGAAGATAATATGC 350
*****

purB_S.aureus_1444      GTAATAACATAGATAAAACATTTGGTCTGATTTTCTCACAACGTGTCTTA 400
purB_S.aureus_AB036769 GTAATAACATTGATAAAACATTTGGTCTGATTTTCTCACAACGTGTCTTA 400
*****

purB_S.aureus_1444      TTAGCATTAATTAATAAAGGTATGGTTCGTGAAGAAGCATACGA 444
purB_S.aureus_AB036769 TTAGCATTAATTAATAAAGGTATGGTTCGTGAAGAAGCATACGA 444
*****

```

Abb. 12: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *purB* der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der *purB*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AB036769). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

Adenylsuccinatlyase_S.aureus_1444      LALIATSLEKFAVEIRNLQKTETREVEEAFKQKSSAMPHKRNPIGSE 50
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412 LALIATSLEKFAVEIRNLQKTETREVEEAFKQKSSAMPHKRNPIGSE 50
*****

Adenylsuccinatlyase_S.aureus_1444      NITGISRVIRGYITTAYENVPLWHERDISHSSAERIMLPDVTIALDYALN 100
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412 NITGISRVIRGYITTAYENVPLWHERDISHSSAERIMLPDVTIALDYALN 100
*****

Adenylsuccinatlyase_S.aureus_1444      RFTNIVDRLTVFEDNMRNNIDKTFGLIFSQRVLLALINKGMVREEAY 147
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412 RFTNIVDRLTVFEDNMRNNIDKTFGLIFSQRVLLALINKGMVREEAY 147
*****

```

Abb. 13: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz der Adenylsuccinatlyase der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der Adenylsuccinatlyase-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (BAA99412). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert.

4.3.1.2.3 Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp*

Die Amplifizierung von *chp* mit der unter 3.7.7.2.3 beschriebenen Methode ergab bei 23 untersuchten *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 410 Bp (407 erwartete Größe) (Abb. 14). Bei 49 untersuchten *S. aureus*-Kulturen war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 7 wiedergegeben. Das *chp*-Amplikon der *S. aureus*-Kultur P1444/05 wurde sequenziert. Die ermittelte *chp*-Basensequenz entsprach zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen *chp*-Sequenz (Abb. 15). Die Aminosäuresequenz von CHIPS der vorliegenden Untersuchung entsprach ebenso zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen CHIPS-Sequenz (Abb. 16).

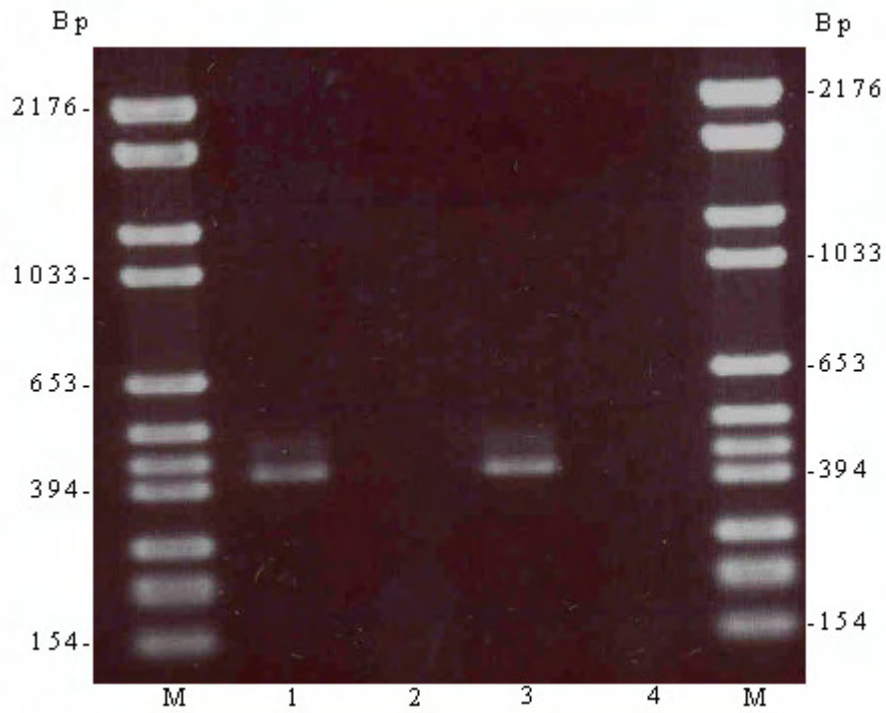


Abb. 14: Typische Amplikons des Chemotaxis Inhibiting Protein-kodierenden Gens *chp* von *S. aureus*- Kulturen, isoliert von Rind (1) und Mensch (3); *chp*-negative *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rind (2) und Mensch (4); M=siehe Abb. 8.


```

chp_S.aureus_1444      TTTTTACGGCAGGAATCAGTACACACCATCATTTCAGCGAAAGCTTTTACT 50
chp_S.aureus_AF285146 TTTTAACGGCAGGAATCAGTACACACCATCATTTCAGCGAAAGCTTTTACT 50
*****

chp_S.aureus_1444      TTTGAACCGTTTCCTACAAATGAAGAAATAGAATCAAATAAGAAATTGTT 100
chp_S.aureus_AF285146 TTTGAACCGTTTCCTACAAATGAAGAAATAGAATCAAATAAGAAAATGTT 100
*****

chp_S.aureus_1444      AGAGAAAGAAAAGCTTATAAAGAATCATTTAAAAATAGTGGTCTTCCTA 150
chp_S.aureus_AF285146 AGAGAAAGAAAAGCTTATAAAGAATCATTTAAAAATAGTGGTCTTCCTA 150
*****

chp_S.aureus_1444      CAACACTAGGAAAATTAGATGAACGTTTGAGAAATTATTTAAAGAAAGGC 200
chp_S.aureus_AF285146 CAACGCTAGGAAAATTAGATGAACGTTTGAGAAATTATTTAAAGAAAGGC 200
*****

chp_S.aureus_1444      ACAAAAAATTCTGCTCAATTTGAAAAAATGGTTATTTTAACTGAAAATAA 250
chp_S.aureus_AF285146 ACAAAAAATTCTGCTCAATTTGAAAAAATGGTTATTTTAACTGAAAATAA 250
*****

chp_S.aureus_1444      AGGTTACTATACAGTATATCTGAATACACCACTTGCTGAAGATAGAAAAA 300
chp_S.aureus_AF285146 AGGTTACTATACAGTATATCTGAATACACCACTTGCTGAAGATAGAAAAA 300
*****

chp_S.aureus_1444      ATGTTGAGTTACTAGGTAAAATGTATAAAACATACTTCTTTAAAAAAGGA 350
chp_S.aureus_AF285146 ATGTTGAGTTACTAGGTAAAATGTATAAAACATACTTCTTTAAAAAAGGA 350
*****

chp_S.aureus_1444      GAGTCTAAACCCATCTTATGAGA 372
chp_S.aureus_AF285146 GAGTCTAAATTCATCTTATGTAA 372
*****

```

Abb. 15: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *chp* der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der *chp*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AF285146). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

CHIPS_S.aureus_1444          FTAGISTHHHSAKAFTFEPFPTNEEIESNKKLLEKEKAYKESFKNSGLPT 50
CHIPS_S.aureus_AAQ14339    LTAGISTHHHSAKAFTFEPFPTNEEIESNKKMLEKEKAYKESFKNSGLPT 50
                               :*****:*****
CHIPS_S.aureus_1444          TLGKLDERLRNYLKKGTKNSAQFEKMVILTENKGYTIVYLNTPLAEDRKN 100
CHIPS_S.aureus_AAQ14339    TLGKLDERLRNYLKKGTKNSAQFEKMVILTENKGYTIVYLNTPLAEDRKN 100
                               *****
CHIPS_S.aureus_1444          VELLGKMYKTYFFKKGESKPSYE 123
CHIPS_S.aureus_AAQ14339    VELLGKMYKTYFFKKGESKSSYV 123
                               *****:
    
```

Abb. 16: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von CHIPS der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der CHIPS-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AAQ14339). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

Tab. 7: Vorkommen der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb*, des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB* und des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp* bei *S. aureus*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern			
		eta/etb-Multiplex-PCR		purB-1/purB-2 (<i>purB</i> , 490)	chp-1/chp-2 (<i>chp</i> , 410)
		eta-1/eta-2 (<i>eta</i> , 120*)	etb-1/etb-2 (<i>etb</i> , 200)		
<i>S. aureus</i> (Rind; Mastitis)	20	- (20**/100***)	- (20/100)	+ (20/100)	- (20/100)
<i>S. aureus</i> (Weitere tiermedizinische Untersuchungsmaterialien)	24	- (24/100)	- (24/100)	+ (24/100)	+ (10/42); - (14/58)
<i>S. aureus</i> (Humanmedizinische Untersuchungsmaterialien)	28	+ (3/11); - (25/89)	+ (2/7); - (26/93)	+ (28/100)	+ (13/46); - (15/54)
<i>S. aureus</i> DSM 346	1	-	-	+	-
<i>S. aureus</i> 114/92****	1	+	+	+	-

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=speziesspezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat ; **Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; ***Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %; *****eta*- und *etb*-Referenzstamm.

4.3.2 Untersuchung der SIG-Kulturen

4.3.2.1 Identifizierung

4.3.2.1.1 Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* durch Multiplex-PCR

Der Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* durch Multiplex-PCR erfolgte mit der unter 3.7.8.1.1 beschriebenen Methodik. Die Amplifikatgröße für das Thermonuclease-kodierende Gen *nuc* von SIG war ca. 120 Bp (124 Bp erwartete Größe), für das Thermonuclease-kodierende Gen *nuc* von *S. aureus* ca. 420 Bp (419 Bp erwartete Größe) und für einen universellen Genabschnitt der 16S rDNA ca. 250 Bp (252 Bp erwartete Größe). Das Thermonuclease-kodierende Gen *nuc* von *S. intermedius* war bei allen 38 SIG-Kulturen und drei *S. pseudintermedius*- Referenzstämmen nachweisbar, das Thermonuclease-kodierende Gen *nuc* von *S. aureus* bei dem *S. aureus*-Referenzstamm DSM 346. Alle 38 SIG-Kulturen, drei *S. pseudintermedius*-Kulturen und die anderen untersuchten Staphylokokkenspezies zeigten für den universellen Genabschnitt der 16S rDNA eine positive Reaktion (Abb. 17). Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab.8 wiedergegeben.

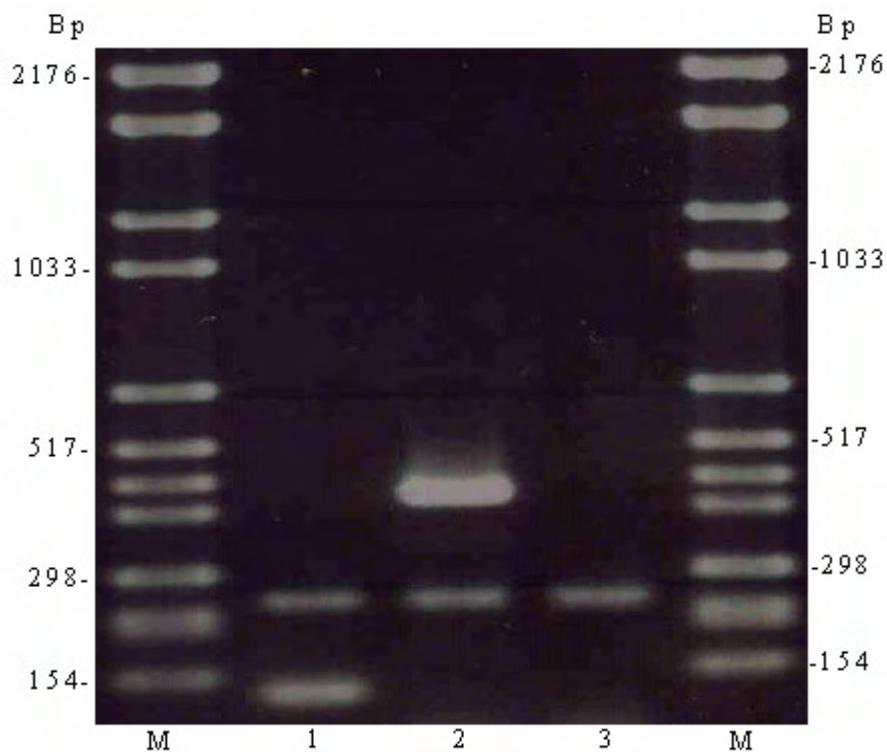


Abb. 17: Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. intermedius* (ca. 120 Bp) und *S. aureus* (ca. 420 Bp) und eines universellen Genabschnitts der 16S rDNA (ca. 250 Bp) durch Multiplex-PCR; *S. intermedius* DSM 20373 (1); *S. aureus* DSM 346 (2); *S. hyicus* DSM 20459 (3); M=siehe Abb. 8.

4.3.2.1.2 Nachweis des *dnaJ*-Gens von SIG

Die Amplifizierung des *dnaJ*-Gens von SIG nach der unter 3.7.8.1.2 beschriebenen Methode ergab bei allen 38 untersuchten SIG-Kulturen und bei drei *S. pseudintermedius*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 610 Bp (609 Bp erwartete Größe) (Abb. 18). Die anderen 15 untersuchten Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies (siehe 3.1) erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 8 wiedergegeben.

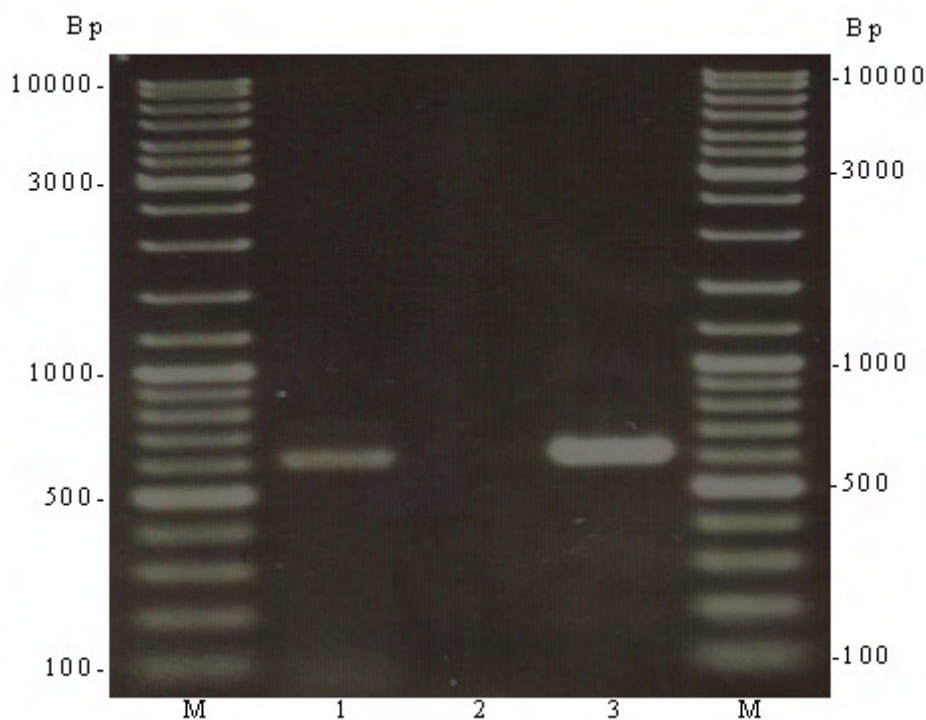


Abb. 18: Typische Amplikons des *dnaJ*-Gens von SIG-Kulturen (1, 3) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *dnaJ*-1 und *dnaJ*-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. hyicus* DSM 20459 (2); M=siehe Abb. 9.

Tab. 8: Spezifität der Oligonukleotidprimer des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von SIG, des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. aureus*, eines universellen Genabschnitts der 16S rDNA und des *dnaJ*-Gens von SIG

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern			
		Multiplex-PCR			dnaJ1/dnaJ2**** (<i>dnaJ</i> , 610)
		SInuc1/SInuc2 (<i>nuc</i> , 120*)	SAnuc1/SAnuc2 (<i>nuc</i> , 420)	16S1/16S2 (16S rDNA 250)	
SIG	38	+ (38**/100***)	- (38/100)	+ (38/100)	+ (38/100)
<i>S. intermedius</i> DSM 20373	1	+	-	+	+
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22219	1	+	-	+	+
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22220	1	+	-	+	+
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22221	1	+	-	+	+
<i>S. aureus</i> DSM 346	1	-	+	+	-
<i>S. hyicus</i> DSM 20459	1	-	-	+	-

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=speziesspezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat; **Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; ***Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %; **** Die unter 3.1 beschriebenen weiteren 13 Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies waren negativ.

4.3.2.2 Weitergehende Charakterisierung

4.3.2.2.1 Nachweis des Exfoliativen Toxingens *siet*

Die Amplifizierung des Exfoliativen Toxingens *siet* mit der unter 3.7.8.2.1 beschriebenen Methode ergab bei 35 untersuchten SIG-Kulturen und einer *S. pseudintermedius*-Kultur ein Amplikon mit einer Größe von ca. 360 Bp (359 Bp erwartete Größe) (Abb. 19). Bei 3 untersuchten SIG-Kulturen und zwei *S. pseudintermedius*-Kulturen war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Das *siet*-Amplikon der SIG-Kultur 4191 wurde sequenziert. Die ermittelte *siet*-Basensequenz entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen *siet*-Sequenz (Abb. 20). Die Aminosäuresequenz des SIG-Exfoliativen Toxins der vorliegenden Untersuchung entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen Exfoliativen Toxin-Sequenz (Abb. 21).

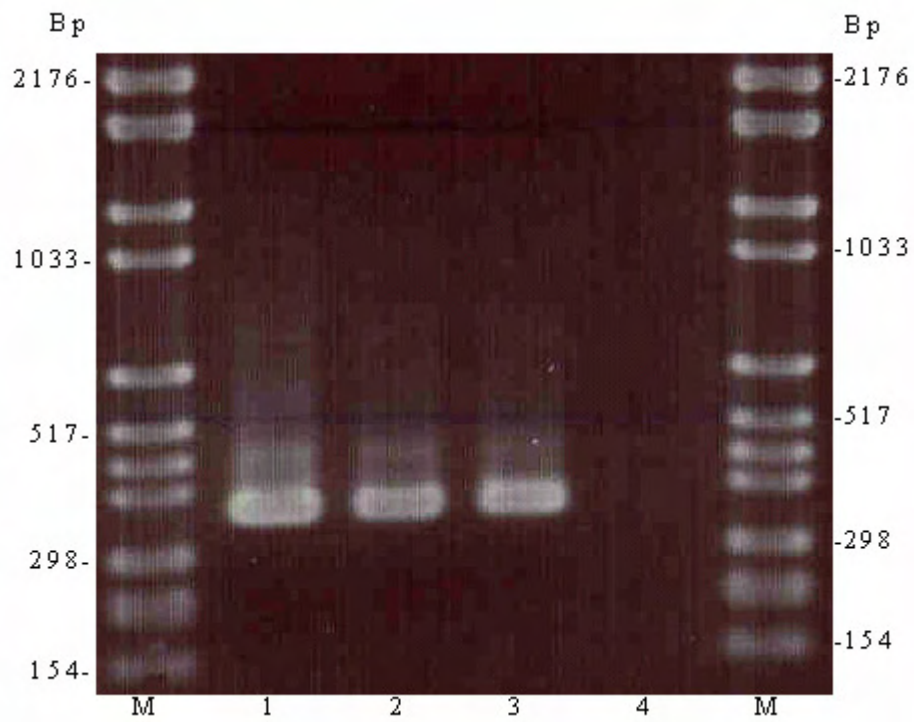


Abb. 19: Typische Amplikons des Exfoliativen Toxins *siet* von drei SIG-Kulturen (1, 2, 3); *siet*-negative SIG-Kultur (4); M=siehe Abb. 8.

```

siet_SIG_BN000819      ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAGCACCAGCCGA 50
siet_S.intermedius_AB099710 ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAGCACCAGCCGA 50
*****

siet_SIG_BN000819      TAAAATTTATGCGGGTCTCAATCTTTAACAGGTTCAATTGGTGTCAATT 100
siet_S.intermedius_AB099710 TAAAATTTATGCGGGTCTCAATCTTTAACAGGTTCAATTGGTGTCAATT 100
*****

siet_SIG_BN000819      CTGAGTCAAAGATTATTCAGAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAAACA 150
siet_S.intermedius_AB099710 CTGAGTCAAAGATTATTCAGAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAGAACA 150
*****

siet_SIG_BN000819      AACACAATCAAATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
siet_S.intermedius_AB099710 AACACAATCAAATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
*****

siet_SIG_BN000819      AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAATAAAGATAGTT 250
siet_S.intermedius_AB099710 AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAATAAAGATAGTT 250
*****

siet_SIG_BN000819      TTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGGGACGTCAAATGTCCGAATCA 300
siet_S.intermedius_AB099710 TTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGGGACGTCAAATGTCCGAATCA 300
*****

siet_SIG_BN000819      AAAGTGCGTGAATTGGCAGATGGACGTATTTATAGTGACAACAAGCGAA 350
siet_S.intermedius_AB099710 AAAGTGCGTGAATTGGCAGATGGACGTATTTATAGTGACAACAAGCGAA 350
*****

siet_SIG_BN000819      AAGTAATGG 359
siet_S.intermedius_AB099710 AAGTAATGG 359
*****

```

Abb. 20: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *siet* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (BN000819) mit der *siet*-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (AB099710). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

Exfoliativ_Toxin_SIG_CAJ29275      MENLAASGGYYISAPADKIYAGPQSLTGSIGVISESKDYSELLDNLGIKT  50
Exfoliativ_Toxin_Sintermedius_BAC79152 MENLAASGGYYISAPADKIYAGPQSLTGSIGVISESKDYSELLDNLGIRT  50
*****;*

Exfoliativ_Toxin_SIG_CAJ29275      NTIKSGAHKDILSSSRKMTDEEREILQSINKDSFDQFVNVVKEGRQMSES  100
Exfoliativ_Toxin_Sintermedius_BAC79152 NTIKSGAHKDILSSSRKMTDEEREILQSINKDSFDQFVNVVKEGRQMSES  100
*****

Exfoliativ_Toxin_SIG_CAJ29275      KVRELADGRIYSAQQAKSN  119
Exfoliativ_Toxin_Sintermedius_BAC79152 KVRELADGRIYSAQQAKSN  119
*****

```

Abb. 21: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz des Exfoliativen Toxins der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAJ29275) mit der Exfoliativen Toxinsequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (BAC79152). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

4.3.2.2.2 Nachweis des Enterotoxins *se-int*

Die Amplifizierung des Enterotoxins *se-int* mit der unter 3.7.8.2.2 beschriebenen Methode ergab bei 23 untersuchten SIG-Kulturen und zwei *S. pseudintermedius*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 400 Bp (404 Bp erwartete Größe) (Abb. 22). Bei 15 untersuchten SIG-Kulturen und einer *S. pseudintermedius*-Kultur war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Das *se-int*-Amplikon der SIG-Kultur 4191 wurde sequenziert. Die ermittelte *se-int*-Basensequenz entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen *se-int*-Sequenz (Abb. 23). Die Aminosäuresequenz des SIG-Enterotoxins der vorliegenden Untersuchung entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen Enterotoxin-Sequenz (Abb. 24).

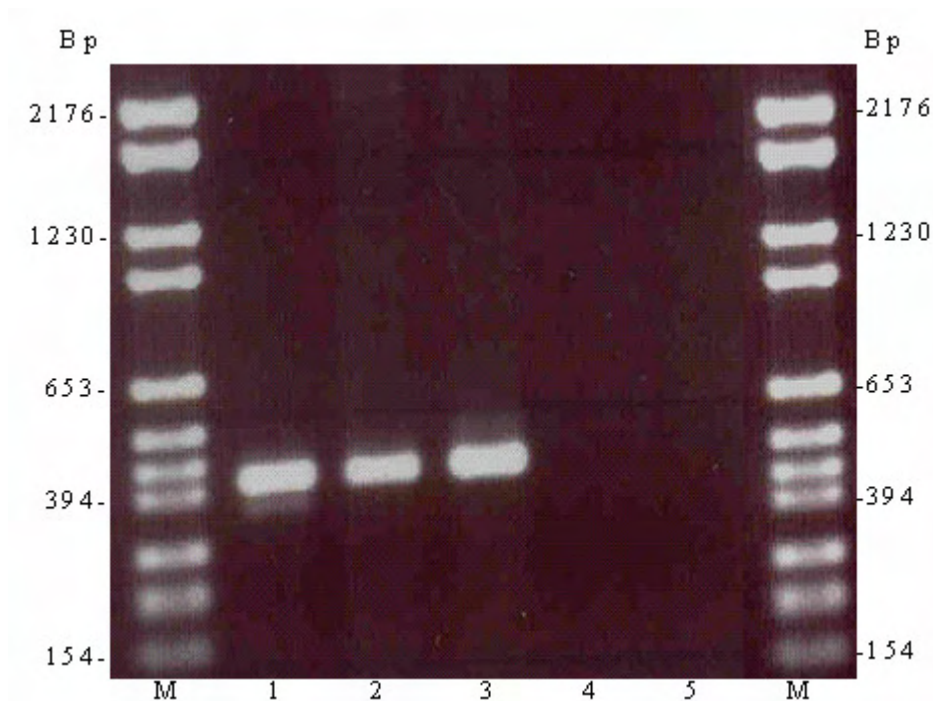


Abb. 22: Typische Amplikons des *se-int* Gens von drei SIG-Kulturen (1, 2, 3); *se-int*-negative SIG-Kulturen (4, 5); M=siehe Abb. 8.

```

se-int_SIG_AM943367      GTGGCGTACCAAACCTATGAAGGAAATCACTTAGATAATCACAAATCACAA 50
se-int_S.intermedius_AB116378  GTGGCGTAAACCAAACCTATGAAGGAAATCACTTAGATAATCACAAATCACAA 50
*****
*****

se-int_SIG_AM943367      ACGATCTATGTAAAAGTTTTTGAAAATAGCAAGCATATCATTACATTTGA 100
se-int_S.intermedius_AB116378  ACGATCTATGTAAAAGTTTTTGAAAATAGCAAGCATATCATTACATTTGA 100
*****
*****

se-int_SIG_AM943367      AATACAAGCCGACAAAAAAGCTGGTTACAGCACAAGAAGCTGGATGCAAAGG 150
se-int_S.intermedius_AB116378  AATACAAGCCGACAAAAAAGCTGGTTACAGCACAAGAAGCTGGATGCAAAGG 150
*****
*****

se-int_SIG_ AM943367     CGAGAAAATTTTAAATTGATAAACTCAATCTTTATGAATTTAAAGGATCG 200
se-int_S.intermedius_AB116378  CGAGAAAATTTTAAATTGATAAACTCAATCTTTATGAATTTAAAGGATCG 200
*****
*****

se-int_SIG_AM943367     CCATACGAAACAGGGTATATCAAGTTTATTGAAAATGACGACAAATCGTT 250
se-int_S.intermedius_AB116378  CCATACGAAACAGGGTATATCAAGTTTATTGAAAATGACGACAAATCGTT 250
*****
*****

se-int_SIG_AM943367     CTGGTATGACTTGATGCCGCCACCGGTAATAATTTAATCAATCTAAGT 300
se-int_S.intermedius_AB116378  CTGGTATGACTTGATGCCGCCACCGGTAATAATTTAATCAATCTAAGT 300
*****
*****

se-int_SIG_AM943367     ATTTAACAATGTATAGTGATAATAAGACCGTTGAATCTAAGACATAAAA 350
se-int_S.intermedius_AB116378  ATTTAACAATGTATAGTGATAATAAGACCGTTGAATCTGAAGACATAAAA 350
*****
*****

se-int_SIG_AM943367     ATTGAAGTTCATTAA 365
se-int_S.intermedius_AB116378  ATTGAAGTTCATTTA 365
*****
*****

```

Abb. 23: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *se-int* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM943367) mit der *se-int*-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (AB116378). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

Enterotoxin_SIG_CAQ15738      NYEGNHLDNHKSQTIYVKVFENSKHIIITFEIQADKKLVTQAQELDAKARKF 50
Enterotoxin_S.intermedius_BAD13763 NYEGNHLDNHKSQTIYVKVFENSKHIIITFEIQADKKLVTQAQELDAKARKF 50
*****

Enterotoxin_SIG_CAQ15738      LIDKLNLYEFKGSFYETGYIKFIENDDKSFWDLMPPPGNNFNQSKYLTM 100
Enterotoxin_S.intermedius_BAD13763 LIDKLNLYEFKGSFYETGYIKFIENDDKSFWDLMPPPGNNFNQSKYLTM 100
*****

Enterotoxin_SIG_CAQ15738      YSDNKTVESKDIKIEVH 117
Enterotoxin_S.intermedius_BAD13763 YSDNKTVESEDIKIEVH 117
*****;*****

```

Abb. 24: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz des Enterotoxins der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAQ15738) mit der Enterotoxin-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (BAD13763). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

4.3.2.2.3 Nachweis der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF* durch Multiplex-PCR

Der Nachweis der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF* erfolgte mit der unter 3.7.8.2.3 beschriebenen Methodik mittels Multiplex-PCR. Die Amplifikatgrößen für die einzelnen Leukotoxin-kodierenden Gene waren für *lukS* ca. 500 Bp (503 Bp erwartete Größe) und für *lukF* ca. 570 Bp (572 Bp erwartete Größe). Die Amplifikate ließen sich eindeutig voneinander unterscheiden (Abb. 25).

Das Gen-*lukS* war bei 29 SIG-Kulturen und zwei *S. pseudintermedius*-Kulturen nachweisbar, das Gen-*lukF* bei 28 SIG-Kulturen und zwei *S. pseudintermedius*-Kulturen.

Die verbleibenden 9 bzw. 10 SIG-Kulturen und eine *S. pseudintermedius*-Kultur waren *lukS*- bzw. *lukF*-negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Multiplex-PCR ist in Tab. 9 wiedergegeben.

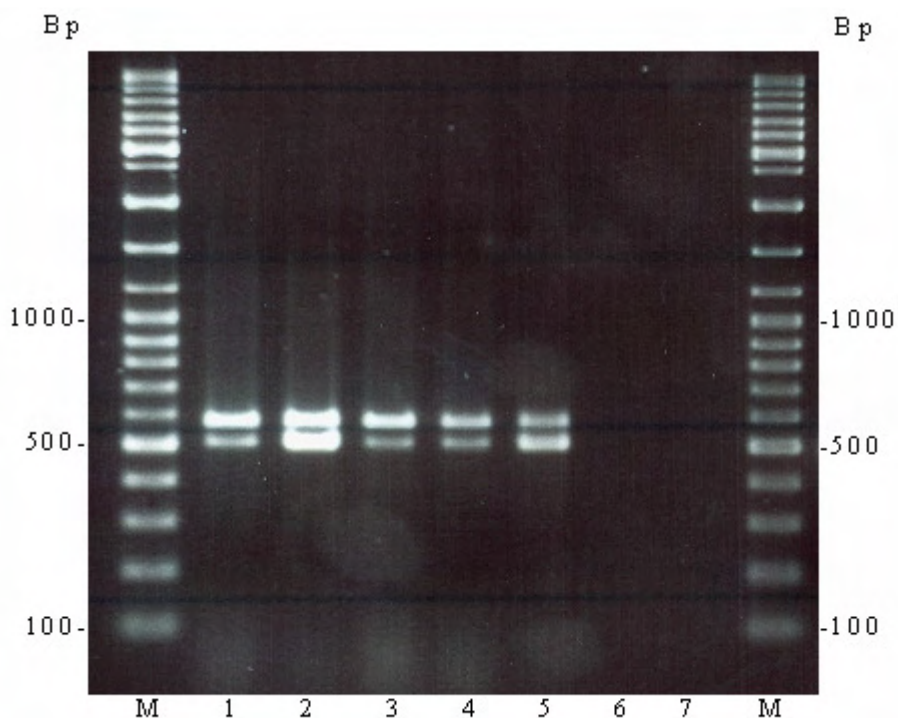


Abb. 25: Typische Amplikons der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* (500Bp) und *lukF* (570Bp) bei fünf SIG-Kulturen (1, 2, 3, 4, 5); *lukS/lukF*-negative SIG-Kulturen (6, 7); M=siehe Abb. 9.

4.3.2.2.4 Nachweis des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB*

Die Amplifizierung des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB* mit der unter 3.7.8.2.4 beschriebenen Methode ergab bei 31 untersuchten SIG-Kulturen und drei *S. pseudintermedius*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 490 Bp (entsprechend Abb. 11, 487 Bp erwartete Größe). Bei 7 untersuchten SIG-Kulturen war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Das *purB*-Amplikon der SIG-Kultur 4191 wurde sequenziert. Die ermittelte *purB*-Basensequenz entsprach zu 99 % der in der Datenbank für *S. aureus* beschriebenen *purB*-Sequenz (Abb. 26). Die Aminosäuresequenz der SIG-Adenylsuccinatlyase der vorliegenden Untersuchung entsprach ebenso zu 99 % der in der Datenbank für *S. aureus* beschriebenen Adenylsuccinatlyase-Sequenz (Abb. 27).

```

purB_SIG_AM950282      TTTGCGACATTAGCATTAAATCGCGACGTCAGAAAAATTTGCCGTTGA 50
purB_S.aureus_AB036769 ATTGCGACATTAGCATTAAATCGCGACGTCAGAAAAATTTGCCGTTGA 50
                        *****

purB_SIG_AM950282      AATTCGTAACCTTCAAAAAACCGAAACAAGAGAAGTTGAAGAAGCATTG 100
purB_S.aureus_AB036769 AATTCGTAACCTTCAAAAAACTGAAACAAGAGAAGTTGAAGAAGCATTG 100
                        *****

purB_SIG_AM950282      CAAAAGGCCAAAAAGGTTTCATCTGCAATGCCTCATAAACGAAATCCAATT 150
purB_S.aureus_AB036769 CAAAAGGTCAAAAAGGTTTCATCTGCAATGCCTCATAAACGAAATCCAATT 150
                        *****

purB_SIG_AM950282      GGTTCGAAAATATCACAGGATTTCAAGAGTCATTCGTGGTTATATTAC 200
purB_S.aureus_AB036769 GGTTCGAAAATATCACAGGATTTCAAGAGTAATTCGTGGTTATATTAC 200
                        *****

purB_SIG_AM950282      TACAGCTTATGAGAAATGTGCCATTATGGCATGAAAGAGATATTTCTCATT 250
purB_S.aureus_AB036769 TACAGCTTATGAGAAATGTGCCATTATGGCATGAAAGAGATATTTCTCATT 250
                        *****

purB_SIG_AM950282      CTTCTGCTGAGCGTATTATGTTACCAGATGTTACAATAGCACTAGATTAT 300
purB_S.aureus_AB036769 CTTCAAGCTGAGCGTATTATGTTACCAGATGTTACAATAGCACTAGATTAT 300
                        *****

purB_SIG_AM950282      GCATTGAATCGTTTCACAATAATATTGGGACCGTTTAACTGTATTTGAAGA 350
purB_S.aureus_AB036769 GCATTGAATCGTTTCACGAATATTGGGACCGTTTAACTGTATTTGAAGA 350
                        *****

purB_SIG_AM950282      TAATATGCGTAATAACATAGATAAAACATTTGGTCTGATTTTCTCACAAC 400
purB_S.aureus_AB036769 TAATATGCGTAATAACATAGATAAAACATTTGGTCTGATTTTCTCACAAC 400
                        *****

purB_SIG_AM950282      GTGTCTTATTAGCATTAAATTAATAAA 426
purB_S.aureus_AB036769 GTGTCTTATTAGCATTAAATTAATAAA 426
                        *****

```

Abb. 26: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *purB* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM950282) mit der *purB*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AB036769). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

Adenylsuccinatlyase_SIG_CAQ34      FATLALIATSLEKFAVEIRNLQKTETREVVEEAFKQKGGSSAMPHKRNPI 50
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412  IATLALIATSLEKFAVEIRNLQKTETREVVEEAFKQKGGSSAMPHKRNPI 50
;*****

Adenylsuccinatlyase_SIG_CAQ34      GSENI TGISRVIRGYITTAYENVPLWHERDISHSSAERIMLPDVTIALDY 100
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412  GSENI TGISRVIRGYITTAYENVPLWHERDISHSSAERIMLPDVTIALDY 100
*****

Adenylsuccinatlyase_SIG_CAQ34      ALNRFTNIVDRLTVFEDNMRNNIDKTFGLIFSQRVLLALINK 142
Adenylsuccinatlyase_S.aureus_BAA99412  ALNRFTNIVDRLTVFEDNMRNNIDKTFGLIFSQRVLLALINK 142
*****

```

Abb. 27: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz der Adenylsuccinatlyase der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung CAQ034 mit der Adenylsuccinatlyase-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (BAA99412). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

4.3.2.2.5 Nachweis des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens *chp*

Die Amplifizierung von *chp* mit der unter 3.7.8.2.5 beschriebenen Methode ergab bei 2 untersuchten SIG-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 410 Bp (entsprechend Abb. 14, 407 erwartete Größe). Bei 36 untersuchten SIG-Kulturen und drei *S. pseudintermedius*-Kulturen war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 9 wiedergegeben.

Das *chp*-Amplikon der SIG-Kultur 4191 wurde sequenziert. Die ermittelte *chp*-Basensequenz entsprach zu 98 % der in der Datenbank für *chp* von *S. aureus* beschriebenen Sequenz (Abb. 28). Die Aminosäuresequenz von CHIPS der SIG-Kultur der vorliegenden Untersuchung entsprach ebenso zu 98% der in der Datenbank für CHIPS von *S. aureus* beschriebenen Sequenz (Abb. 29).

```

chp_SIG_AM943061      TTTTTTACGGCAGGAATCAGGTACACACCATCATTCAGCGAAAGCTTTTA 50
chp_S.aureus_AF285146 TTTTTAACGGCAGGAATCAGCTACACACCATCATTCAGCGAAAGCTTTTA 49
*****

chp_SIG_AM943061      CTTTTGAAACCGTTTCTACAAATGAAGAAATAGAATCAAATAAGAAAATG 100
chp_S.aureus_AF285146 CTTTTGAAACCGTTTCTACAAATGAAGAAATAGAATCAAATAAGAAAATG 99
*****

chp_SIG_AM943061      TTAGAGAAAGAAAAAGCTTATAAAGAATCATTTTAAAAATAGTGGTCTTCC 150
chp_S.aureus_AF285146 TTAGAGAAAGAAAAAGCTTATAAAGAATCATTTTAAAAATAGTGGTCTTCC 149
*****

chp_SIG_AM943061      TACAACGCTAGGAAAATTAGATGAACGTTTGAGAAATTATTTAGAGAAAAG 200
chp_S.aureus_AF285146 TACAACGCTAGGAAAATTAGATGAACGTTTGAGAAATTATTTAAAGAAAAG 199
*****

chp_SIG_AM943061      GCACAAAAAATACTGCTCAATTTGAAAAAATGGTTATTTTAACTGAAAAT 250
chp_S.aureus_AF285146 GCACAAAAAATTCTGCTCAATTTGAAAAAATGGTTATTTTAACTGAAAAT 249
*****

chp_SIG_AM943061      AAAGTTACTATACAGTATATCTGAATACACCACTTGCTGAAGATAGAAA 300
chp_S.aureus_AF285146 AAAGTTACTATACAGTATATCTGAATACACCACTTGCTGAAGATAGAAA 299
*****

chp_SIG_AM943061      AAATGTTGAGTTACTAGGTAAAATGTATAAAACATACTTCTTTAAAAAAG 350
chp_S.aureus_AF285146 AAATGTTGAGTTACTAGGTAAAATGTATAAAACATACTTCTTTAAAAAAG 349
*****

chp_SIG_AM943061      GAGAGCTAAATCATCTTATGAGA 374
chp_S.aureus_AF285146 GAGAGCTAAATCATCTTATGTAA 373
*****

```

Abb. 28: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *chp* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM943061) mit der *chp*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AF285146). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

CHIPS_SIG_CAQ06479      FLRAGIGTHHHSAKAFTFEPFPTNEEIESNKKMLEKEKAYKESFKNSGLP 50
CHIPS_S.aureus_AAQ14339  FLTAGISTHHHSAKAFTFEPFPTNEEIESNKKMLEKEKAYKESFKNSGLP 50
                        **  ***:*****
CHIPS_SIG_CAQ06479      TTLGKLDERLRNYLEKGTKNTAQFEKMVILTENKGYTIVYLNTPLAEDRK 100
CHIPS_S.aureus_AAQ14339  TTLGKLDERLRNYLKKGTKNSAQFEKMVILTENKGYTIVYLNTPLAEDRK 100
                        *****:*****
CHIPS_SIG_CAQ06479      NVELLGKMYKTYFFKKGESKSSYE 124
CHIPS_S.aureus_AAQ14339  NVELLGKMYKTYFFKKGESKSSYV 124
                        *****

```

Abb. 29: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von CHIPS der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAQ06479) mit der CHIPS-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AAQ14339). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

4.3.2.2.6 Nachweis von Resistenzgenen durch Multiplex-PCR

Der Nachweis von Resistenzgenen durch Multiplex-PCR erfolgte mit der unter 3.7.8.2.6 beschriebenen Methodik. Die Amplifikatgröße für das *mecA*-Oxacillinresistenzgen war ca. 530 Bp (532 Bp erwartete Größe) und für das *blaZ*-Penicillinresistenzgen ca. 170 Bp (173 Bp erwartete Größe) (Abb. 30).

Das *mecA*-Oxacillinresistenzgen war bei 11 SIG-Kulturen nachweisbar, das *blaZ*-Penicillinresistenzgen bei 37 SIG-Kulturen und drei *S. pseudintermedius*-Kulturen. Die verbleibenden 27 bzw. 1 SIG-Kultur(en) waren *mecA*- bzw. *blaZ*-negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Multiplex-PCR ist in Tab. 9 wiedergegeben.

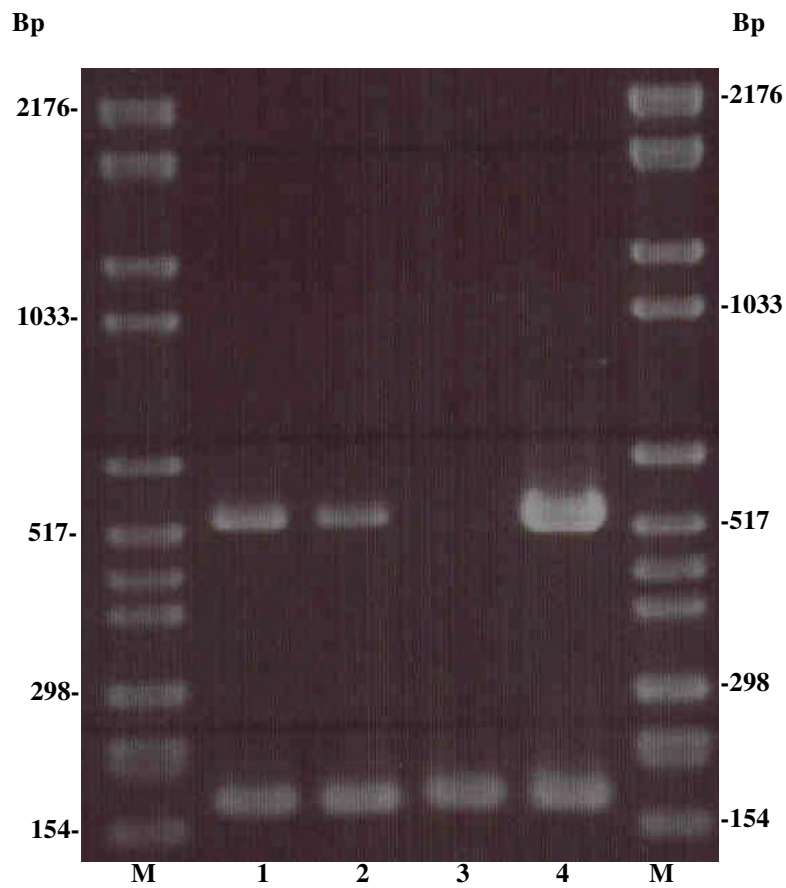


Abb. 30: Multiplex-PCR des *mecA*- (ca. 530 Bp) bzw. *blaZ*- (ca. 170 Bp) Resistenzgens bei zwei SIG-Kulturen (1, 2); *blaZ*-positive SIG-Kultur (3); *mecA*- und *blaZ*-positiver *S. aureus*-Referenzstamm 1150/93 (4); M=siehe Abb. 9.

4.3.2.2.7 Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse

Nach Restriktionsanalyse der chromosomalen DNA der 10 ausgewählten SIG-Kulturen (Tab. 2) konnte nach der Fragmentauftrennung ein einheitliches DNA-Restriktionsmuster nachgewiesen werden (Abb. 31), d.h. die 10 SIG-Kulturen, isoliert von 8 Hunden und 2 Katzen, stellen einen einheitlichen Bakterienklon dar.

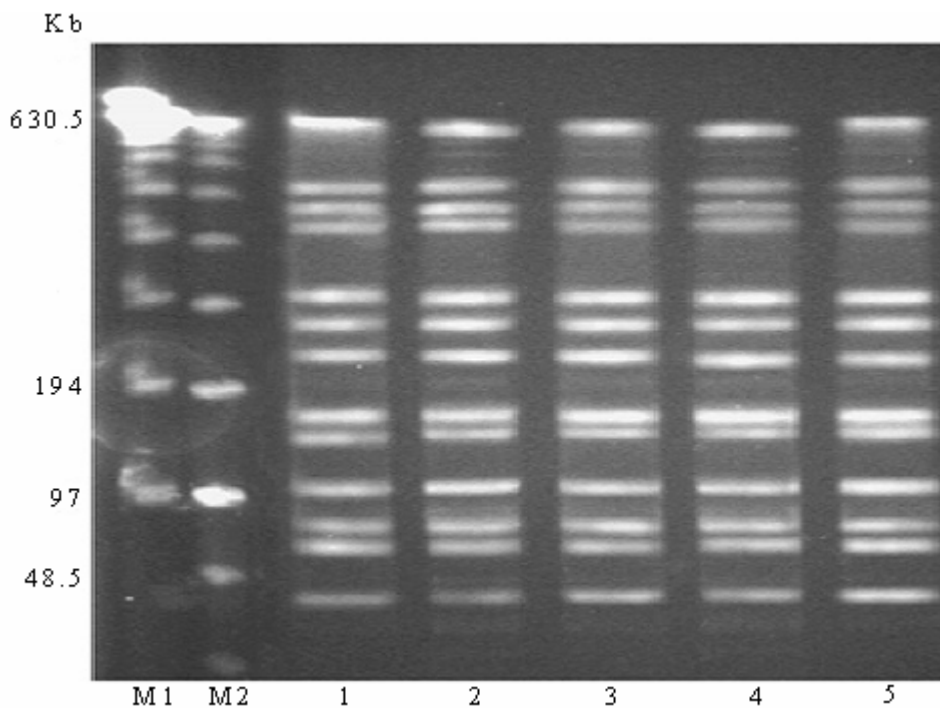


Abb. 31: Makrorestriktionsanalyse von fünf SIG-Kulturen (1-5) nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *ApaI*, M1=Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb); M2=Low Range PFGE Marker (0.1-200 Kb).

Tab. 9: Vorkommen des Exfoliativen Toxingens *siet*, des Enterotoxingens *se-int*, der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF*, des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens *purB*, des „Chemotaxis inhibiting Protein“ (CHIPS)-kodierenden Gens *chp*, der Oxacillin- bzw. Penicillinresistenzgene *mecA* und *blaZ* bei SIG- und *S. pseudintermedius*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft.

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern									
		<i>siet1/siet2</i> (<i>siet</i> , 360*)	<i>se-int1/se-int2</i> (<i>se-int</i> , 400)	<i>lukS/lukF</i> -Multiplex-PCR		<i>purB1/purB2</i> (<i>purB</i> , 490)	<i>chp1/chp2</i> (<i>chp</i> , 410)	<i>mecA/blaZ</i> -Multiplex-PCR			
				<i>lukS1/lukS2</i> (<i>lukS</i> , 500)	<i>lukF1/lukF2</i> (<i>lukF</i> , 570)			<i>mecA1/mecA2</i> (<i>mecA</i> , 530)	<i>blaZ1/blaZ2</i> (<i>blaZ</i> , 170)		
SIG	38	+ (35**/92***); - (3/8)	+ (23/61); - (15/39)	+ (29/76); - (9/24)	+ (28/74); - (10/26)	+ (31/82); - (7/18)	+ (2/5); - (36/95)	+ (11/29); - (27/71)	+ (37/97); - (1/3)		
<i>S. intermedius</i> DSM 20373	1	+	-	-	-	+	-	-	-		
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22219	1	+	+	+	+	+	-	-	+		
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22220	1	-	-	+	+	+	-	-	+		
<i>S. pseudintermedius</i> LMG 22221	1	-	+	-	-	+	-	-	+		

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=spezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat; **Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; ***Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %.

4.3.3 Untersuchung der *S. hyicus*-Kulturen

4.3.3.1 Identifizierung

4.3.3.1.1 Nachweis eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA*

Die Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* nach der unter 3.7.9.1.1 beschriebenen Methode ergab bei allen untersuchten 40 *S. hyicus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 200 Bp (205 Bp erwartete Größe). Die anderen 16 untersuchten Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies (siehe 3.1) erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ (Abb. 32). Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 10 wiedergegeben.

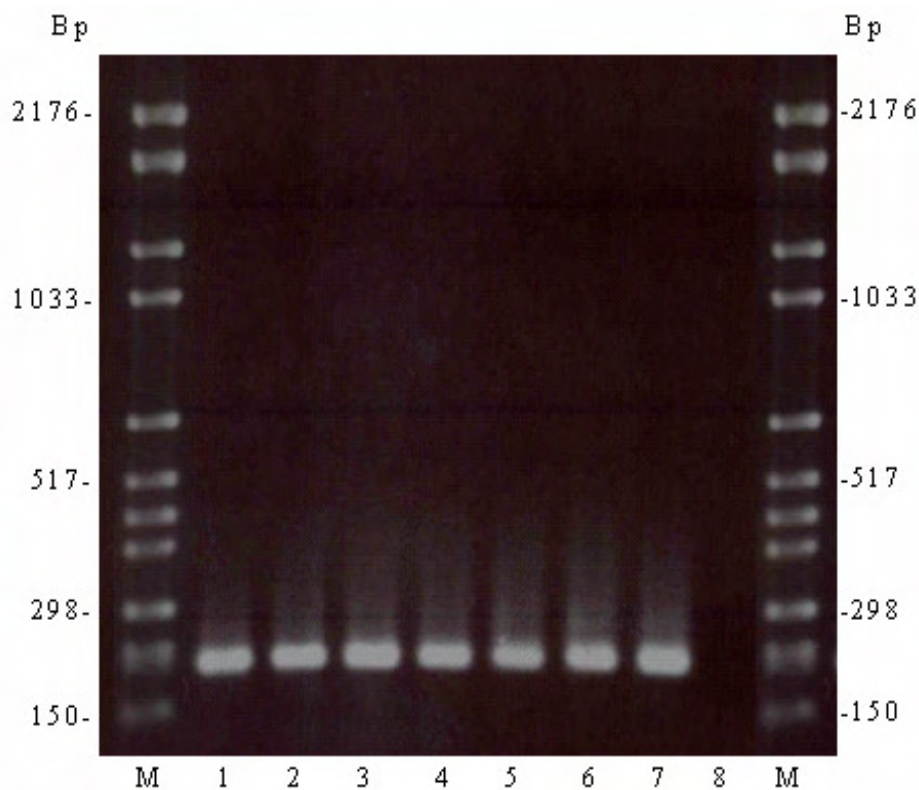


Abb. 32: Typische Amplikons eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* von *S. hyicus*-Kulturen, isoliert vom Schwein (1 bis 7); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. aureus* DSM 346 (8); M=siehe Abb. 8.

4.3.3.1.2 Nachweis eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR)

Die Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR) nach der unter 3.7.9.1.2 beschriebenen Methode ergab bei allen untersuchten 40 *S. hyicus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von ca. 250 Bp (247 Bp erwartete Größe) (Abb. 33). Die anderen 16 untersuchten Staphylokokkenspezies (siehe 3.1) erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 10 wiedergegeben.

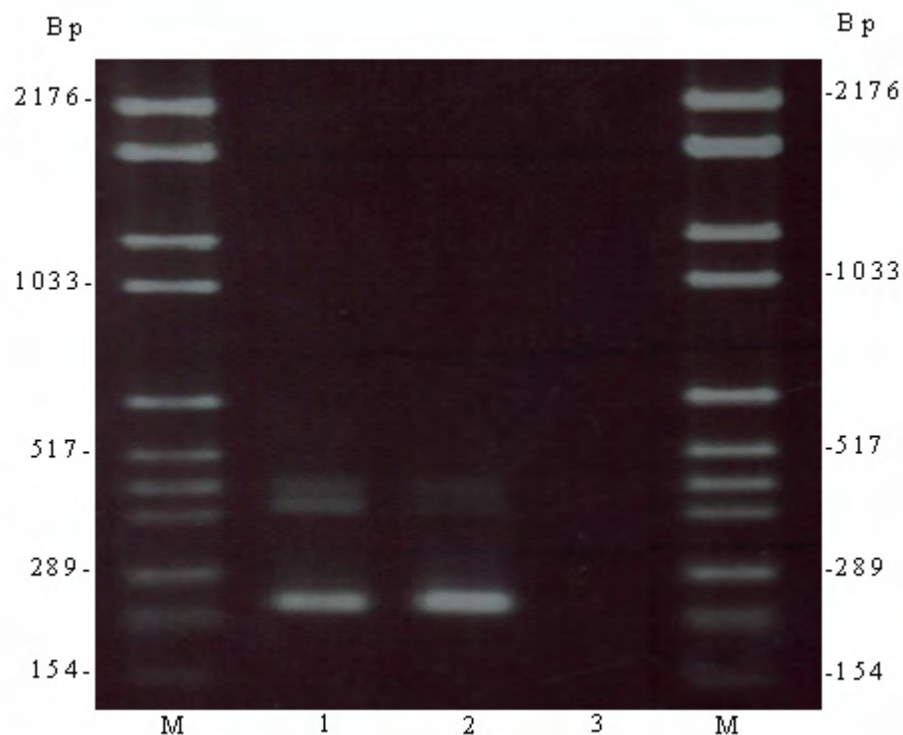


Abb. 33: Typische Amplikons eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR) von *S. hyicus*-Kulturen, isoliert vom Schwein (1, 2); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. aureus* DSM 346 (3); M=siehe Abb. 8.

Tab. 10: Spezifität der Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid DismutaseA-kodierenden Gens *sodA* und eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR)

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern	
		STAH-sodI/STAH-sodII**** (<i>sodA</i> , 200*)	STAH-HyI/STAH-HyII**** (ISR, 250)
<i>S. hyicus</i> aus Deutschland	17	+ (17**/100***)	+ (17/100)
<i>S. hyicus</i> aus Russland	23	+ (23/100)	+ (23/100)
<i>S. hyicus</i> DSM 20459	1	+	+
<i>S. hyicus</i> S3588 (<i>ExhA</i>)	1	+	+
<i>S. hyicus</i> 1289D-88 (<i>ExhB</i>)	1	+	+
<i>S. hyicus</i> 842A-88 (<i>ExhC</i>)	1	+	+
<i>S. hyicus</i> A2869C (<i>ExhD</i>)	1	+	+
<i>S. aureus</i> DSM 346	1	-	-
<i>S. intermedius</i> DSM 20373	1	-	-

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=speziespezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat; **Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; ***Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %; ****die unter 3.1 beschriebenen weiteren 15 Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies waren negativ.

4.3.3.2 Weitergehende Charakterisierung

4.3.3.2.1 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* durch Multiplex-PCR

Der Nachweis der Exfoliativen Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* erfolgte mit der unter 3.7.9.2.1 beschriebenen Methodik mittels Multiplex-PCR. Die Amplifikatgrößen für die einzelnen Exfoliativen Toxingene waren für *exhA* ca. 320 Bp (316 Bp erwartete Größe), für *exhB* ca. 720 Bp (717 Bp erwartete Größe), für *exhC* ca. 520 Bp (525 Bp erwartete Größe) und für *exhD* ca. 590 Bp (588 Bp erwartete Größe). Die Amplifikate ließen sich eindeutig voneinander unterscheiden (Abb. 34).

Das Gen-*exhC* war bei einer *S. hyicus*-Kultur, isoliert in Deutschland, nachweisbar, das Gen-*exhD* bei 2 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Deutschland, und bei 17 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Russland. Die verbleibenden *S. hyicus*-Kulturen waren *exhC*- bzw. *exhD*-negativ.

Die Gene *exhA* und *exhB* waren bei allen 40 *S. hyicus*-Kulturen nicht nachweisbar. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Multiplex-PCR ist in Tab. 12 wiedergegeben.

Das *exhC*-Amplikon der *S. hyicus*-Kultur 6407/01 wurde sequenziert. Die ermittelte *exhC*-Basensequenz entsprach zu 100 % der für *exhC* in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 35). Die Aminosäuresequenz von ExhC der vorliegenden Untersuchung entsprach ebenso zu 100 % der für ExhC in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 36).

Das Amplikon *exhD* der *S. hyicus*-Kultur 2300/79, isoliert in Deutschland, wurde sequenziert. Die ermittelte *exhD*-Basensequenz entsprach zu 100 % der für *exhD* in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 37). Die Aminosäuresequenz von ExhD der vorliegenden Untersuchung entsprach zu 100 % der für ExhD in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 38).

Das Amplikon *exhD* der *S. hyicus*-Kultur P11, isoliert in Russland, wurde sequenziert. Die ermittelte *exhD*-Basensequenz entsprach zu 99 % der für *exhD* in der Datenbank beschriebenen *exhD*-Sequenz (Abb. 37). Die Aminosäuresequenz von ExhD der vorliegenden Untersuchung entsprach zu 99 % der für ExhD in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 38). Die für das aktive Zentrum der Serinproteasen bedeutsamen Aminosäuren His 115 (H), Asp 164 (D) und Ser 219 (S) waren bei allen ExhC-positiven Kulturen nachweisbar. Bei ExhD war die Aminosäure Asp 164 (D) durch die Aminosäure Glu (E) ausgetauscht (Abb. 39).

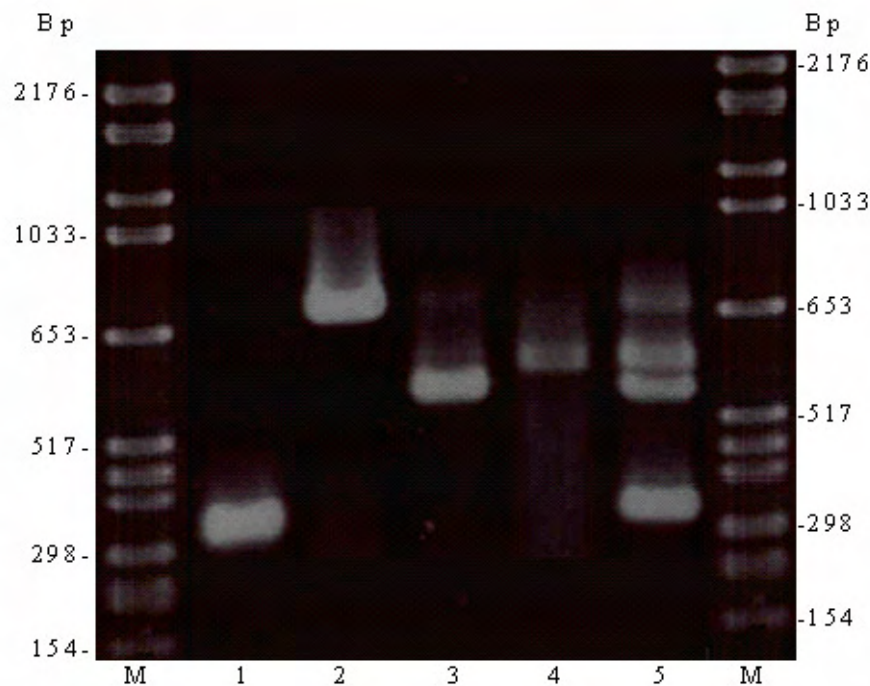


Abb. 34: Typische Amplikons der Exfoliativen Toxingene A, B, C und D von *S. hyicus*-Referenzstämmen: *S. hyicus* S3588 (*exhA*) (1); *S. hyicus* 1289D-88 (*exhB*) (2); *S. hyicus* 842A-88 (*exhC*) (3) und *S. hyicus* A2869C (*exhD*) (4) nach Einzel-PCR (1-4); Multiplex-PCR einer Toxingen-Kontrolle (5); M=siehe Abb. 8.

Tab. 11: Vorkommen von Exfoliative Toxine-kodierenden Genen bei *S. hyicus*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft

Herkunft	Isolate aus Untersuchungsproben von Schwein (n=36), Huhn (n=1), Hund (n=1) und Rind (n=2)	Toxingene			
		<i>exhA</i>	<i>exhB</i>	<i>exhC</i>	<i>exhD</i>
<i>S. hyicus</i> -Kulturen aus Deutschland	Exsudative Epidermitis (Schwein, n=7)	-	-	1* /14**	2/29
	Verschiedene klinische Befunde (Bezug zum Nachweis von <i>S. hyicus</i> unklar) (Schwein, n=6; Rind, n=2; Hund, n=1)	-	-	-	-
	Klinisch unauffällig (Schwein, n=1)	-	-	-	-
<i>S. hyicus</i> -Kulturen aus Russland	Exsudative Epidermitis (Schwein, n=19)	-	-	-	16/84
	Pneumonie (Schwein, n=1)	-	-	-	-
	Klinisch unauffällig (Schwein, n=2; Huhn, n=1)	-	-	-	1/33

n=Anzahl der Kulturen; * Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Toxingen; ** Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Toxingen in %.

```

exhC_S.hyicus_6407/01      AGTCCTGAACAAATCAAAAACCTCCCATATCAATCAGTTGGCAGATTAAA 50
exhC_S.hyicus_AF515455    AGTCCTGAACAAATCAAAAACCTCCCATATCAATCAGTTGGCAGATTAAA 50
*****

exhC_S.hyicus_6407/01      TGTTC AAGGAGAAGCTGTAGCAACAGGTGTATTTATTGGCAAAAATACTG 100
exhC_S.hyicus_AF515455    TGTTC AAGGAGAAGCTGTAGCAACAGGTGTATTTATTGGCAAAAATACTG 100
*****

exhC_S.hyicus_6407/01      TAGTAACTAACCATCATATCGCTAAAGAAGCGAAAAATAATCCGTCTAAA 150
exhC_S.hyicus_AF515455    TAGTAACTAACCATCATATCGCTAAAGAAGCGAAAAATAATCCGTCTAAA 150
*****

exhC_S.hyicus_6407/01      ATCATTTTTTCTCCAGGTAGACATGCTGATGAATCCAACACAGGAACAGT 200
exhC_S.hyicus_AF515455    ATCATTTTTTCTCCAGGTAGACATGCTGATGAATCCAACACAGGAACAGT 200
*****

exhC_S.hyicus_6407/01      TCTCCGCACGGTACTTTTGAAGCATCAGAAATTATAGATGCACCATTG 250
exhC_S.hyicus_AF515455    TCTCCGCACGGTACTTTTGAAGCATCAGAAATTATAGATGCACCATTG 250
*****

exhC_S.hyicus_6407/01      GAACAGGTGTTGATATTTTCAGTAATAATTTTCAAACCTAATGCTGAAGGT 300
exhC_S.hyicus_AF515455    GAACAGGTGTTGATATTTTCAGTAATAATTTTCAAACCTAATGCTGAAGGT 300
*****

```



```

exhC_S.hyicus_6407/01      AAATCTATAGGCGATGTCATTAAAGCTGCTGATTTAGGTAATTCTAATAG 350
exhC_S.hyicus_AF515455    AAATCTATAGGCGATGTCATTAAAGCTGCTGATTTAGGTAATTCTAATAG 350
                            *****

exhC_S.hyicus_6407/01      TTTAAAAAAGGGAGATACAGCTAATTTAATTGGATATCCTTATGATTTG 400
exhC_S.hyicus_AF515455    TTTAAAAAAGGGAGATACAGCTAATTTAATTGGATATCCTTATGATTTG 400
                            *****

exhC_S.hyicus_6407/01      ACTCAAAAACATGTACCGAAGTCAAGTTGAATTTCAAAGTACTGATTTT 450
exhC_S.hyicus_AF515455    ACTCAAAAACATGTACCGAAGTCAAGTTGAATTTCAAAGTACTGATTTT 450
                            *****

exhC_S.hyicus_6407/01      GGATTGAAATACTATGGCTATAACAGTTCCGGGAAATTCAGGATCTGGTAT 500
exhC_S.hyicus_AF515455    GGATTGAAATACTATGGCTATAACAGTTCCGGGAAATTCAGGATCTGGTAT 500
                            *****

exhC_S.hyicus_6407/01      TTTTAATTCTGAAGGTAAATTCGTTGGACTCCACATCGGAAAAGCAAAC 550
exhC_S.hyicus_AF515455    TTTTAATTCTGAAGGTAAATTCGTTGGACTCCACATCGGAAAAGCAAAC 550
                            *****

exhC_S.hyicus_6407/01      ATATAAACAGTCAAATGA 569
exhC_S.hyicus_AF515455    ATATAAACAGTCAAATGA 569
                            *****

```

Abb. 35: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *exhC* der *S. hyicus*-Kultur 6407/01 der vorliegenden Untersuchung mit der *exhC*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AF515455). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert.

```

ExhC_S.hyicus_6407/01      SPEQIKNSPYQSVGRLNVQGEAVATGVFIGKNTVVTNHHIAKEAKNNPSK 50
ExhC_S.hyicus_AAN32972    SPEQIKNSPYQSVGRLNVQGEAVATGVFIGKNTVVTNHHIAKEAKNNPSK 50
*****

ExhC_S.hyicus_6407/01      IIFSPGRHADESNTGTVLPHGTFEASEIIDAPFGTGVDISVIIFKPNAEG 100
ExhC_S.hyicus_AAN32972    IIFSPGRHADESNTGTVLPHGTFEASEIIDAPFGTGVDISVIIFKPNAEG 100
*****

ExhC_S.hyicus_6407/01      KSIGDVIKAADLGNSNSLKKGDTANLIGYPYDFDSKNMYRSQVEFQSTDF 150
ExhC_S.hyicus_AAN32972    KSIGDVIKAADLGNSNSLKKGDTANLIGYPYDFDSKNMYRSQVEFQSTDF 150
*****

ExhC_S.hyicus_6407/01      GLKYYGYTVPGNSGSGIFNSEGKFVGLHIGK 181
ExhC_S.hyicus_AAN32972    GLKYYGYTVPGNSGSGIFNSEGKFVGLHIGK 181
*****

```

Abb. 36: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von ExhC der *S. hyicus*-Kultur 6407/01 der vorliegenden Untersuchung mit der ExhC-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AAN32972). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert.

```
exhD_S.hyicus_AM946621 AAAGTAGAGAATACAAAAGAATATCCTTATCAAGCGGTTGGCTCCATTTT 50
exhD_S.hyicus_AF515456 AAAGTAGAGAAATACAAAAGAATATCCTTATCAAGCGGTTGGCTCCATTTT 50
exhD_S.hyicus_AM950188 AAAGTAGAGGATACAAAAGAATATCCTTATCAAGCGGTTGGCTCCATTTT 50
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 CATAAAACAAAAACCCTTGCTACCGCTTCAGTTGTAGGAAAAAATAAAA 100
exhD_S.hyicus_AF515456 CATAAAACAAAAACCCTTGCTACCGCTTCAGTTGTAGGAAAAAATAAAA 100
exhD_S.hyicus_AM950188 CATAAAACAAAAACCCTTGCTACCGCTTCAGTTGTAGGAAAAAATAAAA 100
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 TTATTACAACTATCATATTGCTAAACAAGCAGAAAACGATCCCTCTAAA 150
exhD_S.hyicus_AF515456 TTATTACAACTATCATATTGCTAAACAAGCAGAAAACGATCCCTCTAAA 150
exhD_S.hyicus_AM950188 TTATTACAACTATCATATTGCTAAACAAGCAGAAAACGATCCCTCTAAA 150
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 GTTATATTCAGACCAGGATTAACAACAGATGAAAATGGGGTTTTTCAAAG 200
exhD_S.hyicus_AF515456 GTTATATTCAGACCAGGATTAACAACAGATGAAAATGGGGTTTTTCAAAG 200
exhD_S.hyicus_AM950188 GTTATATTCAGACCAGGATTAACAACAGATGAAAATGGGGTTTTTCAAAG 200
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 ACCATTTGGAGAGTTTACTGCTAAATCAATTGAAGAAGCACCGTTTGGAG 250
exhD_S.hyicus_AF515456 ACCATTTGGAGAGTTTACTGCTAAATCAATTGAAGAAGCACCGTTTGGAG 250
exhD_S.hyicus_AM950188 ACCATTTGGAGAGTTTACTGCTAAATCAATTGAAGAAGCACCGTTTGGAG 250
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 CAGGTTTAGAATTAGCGATTATAACTCTAAATCCAAATGAAGAAGGAAAA 300
exhD_S.hyicus_AF515456 CAGGTTTAGAATTAGCGATTATAACTCTAAATCCAAATGAAGAAGGAAAA 300
exhD_S.hyicus_AM950188 CAGGTTTAGAATTAGCGATTATAACTCTAAATCCAAATGAAGAAGGAAAA 300
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 GAAATTGGTGAGGTCGTTAAGCCCTTAGAATTAGGTAATGCAAATGCTGT 350
exhD_S.hyicus_AF515456 GAAATTGGTGAGGTCGTTAAGCCCTTAGAATTAGGTAATGCAAATGCTGT 350
exhD_S.hyicus_AM950188 GAAATTGGTGAGGTAGTTAAGCCCTTAGAATTAGGTAATGCAAATGCTGT 350
*****

exhD_S.hyicus_AM946621 AGAACCAAGACAAAAATTATCATTAATTGGATACCCTAACGAGCATGTTC 400
exhD_S.hyicus_AF515456 AGAACCAAGACAAAAATTATCATTAATTGGATACCCTAACGAGCATGTTC 400
exhD_S.hyicus_AM950188 AGAACCAAGACAAAAATTATCATTAATTGGATACCCTAACGAGCATGTTC 400
*****
```

```

exhD_S.hyicus_AM946621      AAAATAAAATGTTTAAATCAAGAAATAGAAGTTCTTTCAACAAAAAATGGA 450
exhD_S.hyicus_AF515456     AAAATAAAATGTTTAAATCAAGAAATAGAAGTTCTTTCAACAAAAAATGGA 450
exhD_S.hyicus_AM950188     AAAATAAAATGTTTAAATCAAGAAATAGAAGTTCTTTCAACAAAAAATGGA 450
                             *****

exhD_S.hyicus_AM946621      CTTAAATATTTTGGATATACAGAGAGTGGTAACTC 485
exhD_S.hyicus_AF515456     CTTAAATATTTTGGATATACAGAGAGTGGTAACTC 485
exhD_S.hyicus_AM950188     CTTAAATATTTTGGATATACAGAGAGTGGTAACTC 485
                             *****

```

Abb. 37: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *exhD* der *S. hyicus*-Kultur 2300/79 (AM946621), isoliert in Deutschland, der *S. hyicus*-Kultur P11 (AM950188), isoliert in Russland, der vorliegenden Untersuchung mit der *exhD*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AF515456). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```

ExhD_S.hyicus_CAQ18972      VENTKEYPYQAVGSIFIKQKTIVATASVVGKNKIITNYHIAKQAENDPSKV 50
ExhD_S.hyicus_AAN32973     VENTKEYPYQAVGSIFIKQKTIVATASVVGKNKIITNYHIAKQAENDPSKV 50
ExhD_S.hyicus_CAQ34815     VEDTKEYPYQAVGSIFIKQKTIVATASVVGKNKIITNYHIAKQAENDPSKV 50
                             *.*****

ExhD_S.hyicus_CAQ18972      IFRPGLTTDENGVFQRPFGEFTAKSIEEAPFGAGLELAIITLNPNEEGKE 100
ExhD_S.hyicus_AAN32973     IFRPGLTTDENGVFQRPFGEFTAKSIEEAPFGAGLELAIITLNPNEEGKE 100
ExhD_S.hyicus_CAQ34815     IFRPGLTTDENGVFQRPFGEFTAKSIEEAPFGAGLELAIITLNPNEEGKE 100
                             *****

ExhD_S.hyicus_CAQ18972      IGEVVKPLELGNANAVEPRQKLSLIGYPNEHVQNKMFNQEIEVLSTKNGL 150
ExhD_S.hyicus_AAN32973     IGEVVKPLELGNANAVEPRQKLSLIGYPNEHVQNKMFNQEIEVLSTKNGL 150
ExhD_S.hyicus_CAQ34815     IGEVVKPLELGNANAVEPRQKLSLIGYPNEHVQNKMFNQEIEVLSTKNGL 150
                             *****

ExhD_S.hyicus_CAQ18972      KYFGYTESGN 160
ExhD_S.hyicus_AAN32973     KYFGYTESGN 160
ExhD_S.hyicus_CAQ34815     KYFGYTESGN 160
                             *****

```

Abb. 38: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von *ExhD* der *S. hyicus*-Kultur 2300/79 (CAQ18972), isoliert in Deutschland, der *S. hyicus*-Kultur P11 (CAQ34815), isoliert in Russland, der vorliegenden Untersuchung mit der *ExhD*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AAN32973). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ18972	KVENTKEYPY QAVGSIFIKQ K.TVATASVV GKNKIITNY H IAKQAENDPS
ExhD_ <i>S. hyicus</i> AAN32973	KVENTKEYPY QAVGSIFIKQ K.TVATASVV GKNKIITNY H IAKQAENDPS
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ34815	KVEDTKEYPY QAVGSIFIKQ K.TVATASVV GKNKIITNY H IAKQAENDPS
ExhB_ <i>S. hyicus</i> AAN32971	RIKDTNEYYPY QSVGSIFIKG K.TVATASVV GKNKIITN F H VAREAAKDPS
ExhA_ <i>S. hyicus</i> AAN32970	KVNDTTQTPY QAVGSLFIKN KPMLATGFVV SQNKIITNY H VAREAKNNPE
ExhC_ <i>S. hyicus</i> 6407/01	SPEQIKNSPY QSVGRLNVQG E.AVATGVFI GKNTVVTN H I IAKEAKNNPS
ExhC_ <i>S. hyicus</i> AAN32972	SPEQIKNSPY QSVGRLNVQG E.AVATGVFI GKNTVVTN H I IAKEAKNNPS
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ18972	KVIFRPGLTT DENG.VFQRP FGEFTAKSIE EAPFGAGL E L AIITLNPNEE
ExhD_ <i>S. hyicus</i> AAN32973	KVIFRPGLTT DENG.VFQRP FGEFTAKSIE EAPFGAGL E L AIITLNPNEE
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ34815	KVIFRPGLTT DENG.VFQRP FGEFTAKSIE EAPFGAGL E L AIITLNPNEE
ExhB_ <i>S. hyicus</i> AAN32971	KVLFRRPMTK EELGGEVKLP YGVFEAESIK EAPFGEGV D L AVITLKPNGE
ExhA_ <i>S. hyicus</i> AAN32970	NVKFRPGLTK NSEG.KVELP FGEFEAETID EAPFGAGI D I AIIKLPKNKD
ExhC_ <i>S. hyicus</i> 6407/01	KIIFSPGRHA DESNTGTVLP HGTFEASEII DAPFGTGV D I SVIIFKPNAE
ExhC_ <i>S. hyicus</i> AAN32972	KIIFSPGRHA DESNTGTVLP HGTFEASEII DAPFGTGV D I SVIIFKPNAE
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ18972	GKEIGEIVVKP LELGNANAVE PRQKLSLIGY PNEHVQNKMF NQEIEVLSTK
ExhD_ <i>S. hyicus</i> AAN32973	GKEIGEIVVKP LELGNANAVE PRQKLSLIGY PNEHVQNKMF NQEIEVLSTK
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ34815	GKEIGEIVVKP LELGNANAVE PRQKLSLIGY PNEHVQNKMF NQEIEVLSTK
ExhB_ <i>S. hyicus</i> AAN32971	GKNIGDIVKP LEFGNGDAID PNQSLKLIGY PYNTVQDTMH KHKIEVYSTN
ExhA_ <i>S. hyicus</i> AAN32970	GKNIGEIVVEP LKFGNAEAVG PHQVLRVVG Y PNNVTQFSMY SQKIEVHSTK
ExhC_ <i>S. hyicus</i> 6407/01	GKSIGDVIKA ADLGNSNSLK KGDTANLIGY PYDFDSKNMY RSQVEFQSTD
ExhC_ <i>S. hyicus</i> AAN32972	GKSIGDVIKA ADLGNSNSLK KGDTANLIGY PYDFDSKNMY RSQVEFQSTD
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ18972	NGLKYFGYTE SGNSG S PILD GDNSIVGIHV GK
ExhD_ <i>S. hyicus</i> AAN32973	NGLKYFGYTE SGNSG S PILD GDNSIVGIHV GK
ExhD_ <i>S. hyicus</i> CAQ34815	NGLKYFGYTE SGNSG S PILD GDNSIVGIHV GK
ExhB_ <i>S. hyicus</i> AAN32971	RGLEYFGYTE AGNSG S PILD DDNNIVGMHV GK
ExhA_ <i>S. hyicus</i> AAN32970	QGLKYFGYTE EGNSG S PILD DENNLVGIHA GR
ExhC_ <i>S. hyicus</i> 6407/01	FGLKYYGYTV PGNSG S GIFN SEGKFVGLHI GK
ExhC_ <i>S. hyicus</i> AAN32972	FGLKYYGYTV PGNSG S GIFN SEGKFVGLHI GK

Abb. 39: Vergleichende Betrachtung der aus der Datenbank entnommenen Aminosäuresequenzen der Exfoliativen Toxine A, B, C und D von *S. hyicus* mit Aminosäuresequenzen von zwei ExhD- bzw. einer ExhC-positiven Kultur der vorliegenden Untersuchungen. Die für das aktive Zentrum der Serinproteasen bedeutsamen Aminosäuren His 115 (H), Asp 164 (D) und Ser 219 (S) sind hervorgehoben. Bei ExhD ist Asp 164 (D) ausgetauscht durch Glu (E).

4.3.3.2.2 Nachweis der Exfoliativen Toxingene *sheta* und *shetb* von *S. hyicus*

Die Amplifizierung des Exfoliativen Toxingens *sheta* mit der unter 3.7.9.2.2 beschriebenen Methode ergab bei 5 untersuchten *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Deutschland, und bei 11 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Russland, ein Amplikon mit einer Größe von ca. 610 Bp (613 Bp erwartete Größe) (Abb. 40). Bei 12 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Deutschland, und bei 12 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Russland, war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab.12 wiedergegeben.

Das *sheta*-Amplikon der *S. hyicus*-Kultur S3588 (*exhA*-Referenzstamm) wurde sequenziert. Die ermittelte *sheta*-Basensequenz entsprach zu 93 % der für *sheta* von *S. hyicus* in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 41). Die Aminosäuresequenz des *S. hyicus*-Exfoliativen Toxins SHETA der vorliegenden Untersuchung entsprach zu 98 % der für das Exfoliative Toxin SHETA in der Datenbank beschriebenen Sequenz (Abb. 42) Eine Amplifizierung des Exfoliativen Toxingens *shetb* mit der unter 3.7.9.2.2 beschriebenen Methode war bei allen 40 *S. hyicus*-Kulturen und den *S. hyicus*-Referenzstämmen nicht möglich. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 12 wiedergegeben.

4.3.4 Dendrogrammanalyse der Exfoliativen Toxingene

Die Sequenzanalysen der bislang bekannten und der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Exfoliativen Toxingene innerhalb der Gattung *Staphylococcus* ermöglichte nach 3.7.6 eine Dendrogrammanalyse (Abb. 43).

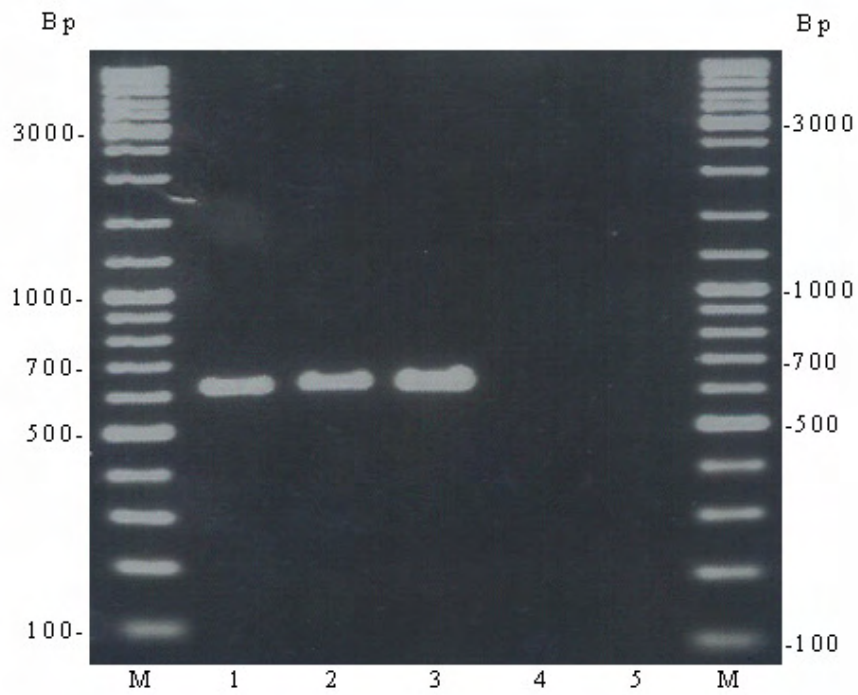


Abb. 40: Typische Amplikons von *sheta* von drei *S. hyicus*-Kulturen (1, 2, 3); *sheta*-negative *S. hyicus*-Kulturen (4, 5); M=siehe Abb. 9.

```

sheta_S.hyicus_AM901042 CCCCTTTATGGCTTCTATGCCTTATTGGAATCTTGACGCATATGATTATT 50
sheta_S.hyicus_AB036768 CACCTTTATGGCTTCTATGCCTTATTGGAATCTTGACGCATATGATTATT 50
* *****

sheta_S.hyicus_AM901042 TTTTCGCACAAATATTTAAAGTCGTTCTCTCTTGAAAACGTATATCCTTC 100
sheta_S.hyicus_AB036768 TTTTCGCACAAATATTTAAAGTCGTTCTCTCTTGAAAACGTATATCCTTC 100
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 TTGGACTGTACTTTTATATTGGTATAGCGATTGCGGGATTAACAGCGCCAG 150
sheta_S.hyicus_AB036768 TTGGACTGTACTTTTATATTGGTATAGCGATTGCGGGATTGACAGCGCCAG 150
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 TAAGCGCTATTTTTTTATAGGTAAATTAACAGTGATTATGGTTTTTTA 200
sheta_S.hyicus_AB036768 TAAGCGCTATTTTTTTATAGGTAAATTAACAGTGATTATGGTTTTGTA 200
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 GCCACATGCATCGTCTTACCACTGGTTTTCAAACGTTTAAAGGTCTATCC 250
sheta_S.hyicus_AB036768 GCCACGTGCATCGTCTTACCACTGGTTTTCAAACGTTTAAAGACCTATCC 250
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 TTTGCAAACGTCCATTAAACCAACACATCCACCATTGTGCGCCATTTT 300
sheta_S.hyicus_AB036768 TTTGCAAACGTCCATTAAACCAACACATCCACAATTGTGCACCATTTT 300
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 CCTTAGTGGCTGCTGCCTATGTTTTAGCTTTTCCTGAAAGCATCATGTGTTT 350
sheta_S.hyicus_AB036768 CTTTAGTAGCAGCAGCCTATGTTTTGGCTTTCCCAGAGGCGCATGATTTT 350
* *****

sheta_S.hyicus_AM901042 GTCGTCATACTTTTTCTTATTCTGTCTCAAATGTTTTATTTTTATATTGT 400
sheta_S.hyicus_AB036768 GTTGTCATCCTTTTTTAAATTGTCTCAAGTTTTTTATTTTTATATCGT 400
** *****

sheta_S.hyicus_AM901042 TTTTCAACTTCCAAAATTATAAGAGAACCGTTTTCACCCGTATTTCAG 450
sheta_S.hyicus_AB036768 TTTTCAGCTTCCAAAATTGCTAAGAGAACCCTTTTCACCGGTATTTCAG 450
*****

sheta_S.hyicus_AM901042 CATTTACATTTCCTTTAGTTATCTCAGCAACGGCTTTAAAAAATAGTATG 500
sheta_S.hyicus_AB036768 CATTCACATTCCCTTTAGTCATTTCAGCAACGGCTTTAAAAAACAGTATG 500
**** *****

sheta_S.hyicus_AM901042 CCTATACTCATATTTCCGGAAATTTGGAATGGGCTCTTAATGTTTGAAAC 550
sheta_S.hyicus_AB036768 CCTATACTCATATTTCCGGAAATTTGGAATGGGCTCTTAATGTTTGAAAC 550
*****

```



```
sheta_S.hyicus_AM901042 GGTATTGGCAACTGGTAATCGAA 573
sheta_S.hyicus_AB036768 GGTATTGGCAACTG-TAATCGTA 572
***** * * *
```

Abb. 41: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *sheta* der *S. hyicus*-Kultur S3588 (AM901042) der vorliegenden Untersuchung mit der *sheta*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AB036768). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

```
Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_CAP15933 PLWLLCLIGILTHMIIFSHKYLKSFLENVYPSWTVLYIGIAIAGLTAPV 50
Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_BAB08178 PLWLLCLIGILTHMIIFSHKYLKSFLENVYPSWTVLYIGIAIAGLTAPV 50
*****

Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_CAP15933 SGYFFFIGKLTVIYGFLATCIVLPLVFKRLKVYPLQTSIKPNTSTICAPFS 100
Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_BAB08178 SGYFFFIGKLTVIYGFVATCIVLPLVFKRLKTYPLQTSIKPNTSTICAPFS 100
*****:*****:*****

Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_CAP15933 LVAAAYVLAFPEAHVFVVILFLILSQMFYFYIVFQLPKLLREPFSPVFSA 150
Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_BAB08178 LVAAAYVLAFPEAHDFVVILFLILSQVFYFYIVFQLPKLLREPFSPVFSA 150
***** *****:*****

Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_CAP15933 FTFPLVISATALKNSMPILIFPEIWNGLLMFETVLATGNR 190
Exfoliativ_Toxin A_S.hyicus_BAB08178 FTFPLVISATALKNSMPILIFPEIWNGLLMFETVLATVIV 190
*****
```

Abb. 42: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von SHETA der *S. hyicus*-Kultur S3588 (CAP15933) der vorliegenden Untersuchung mit der SHETA-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (BAB08178). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.

Tab. 12: Vorkommen der Exfoliativen Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC*, *exhD*, *sheta* und *shetb* bei *S. hyicus* unterschiedlicher Herkunft

Spezies	n	PCR mit den Oligonukleotidprimern						
		Multiplex-PCR						
		MU4FA/MU3RA (<i>exhA</i> , 320*)	F2EB/MU3RB (<i>exhB</i> , 720)	MU3FC/MU4RC (<i>exhC</i> , 520)	F2ED/MU3RD (<i>exhD</i> , 590)	sheta1/sheta2 (<i>sheta</i> , 610)	shetb1/shetb2 (<i>shetb</i> , 740)	
<i>S. hyicus</i> aus Deutschland	17	- (17**/100***)	- (17/100)	+ (1/6); - (16/94)	+ (2/12); - (15/88)	+ (5/29); - (12/71)	-	
<i>S. hyicus</i> aus Russland	23	- (23/100)	- (23/100)	- (23/100)	+ (17/74); - (6/26)	+ (11/48); - (12/52)	-	
<i>S. hyicus</i> DSM 20459	1	+	-	-	-	+	-	
<i>S. hyicus</i> S3588 (<i>ExhA</i>)	1	+	-	-	-	+	-	
<i>S. hyicus</i> 1289D-88 (<i>ExhB</i>)	1	-	+	-	-	+	-	
<i>S. hyicus</i> 842A-88 (<i>ExhC</i>)	1	-	-	+	-	+	-	
<i>S. hyicus</i> A2869C (<i>ExhD</i>)	1	-	-	-	+	+	-	

n=Anzahl der untersuchten Kulturen; *Größe in Bp; +=spezifisches Amplifikat; -=kein Amplifikat · **Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion; ***Anzahl der untersuchten Kulturen mit der jeweiligen PCR-Reaktion in %

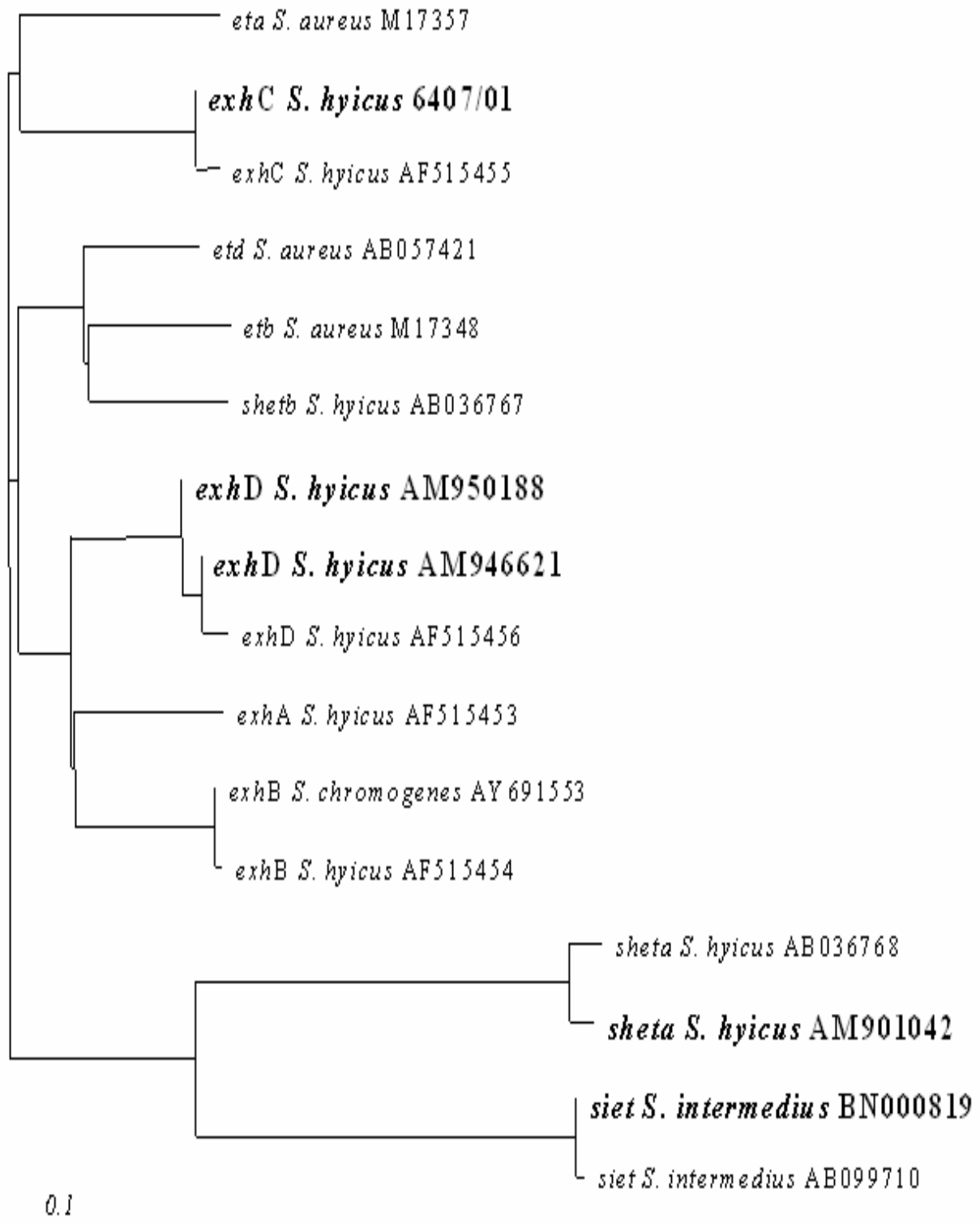


Abb. 43: Dendrogrammanalyse der bislang bekannten und der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Exfoliativen Toxingene innerhalb der Gattung *Staphylococcus*. Die in den vorliegenden Untersuchungen sequenzierten Toxingene sind hervorgehoben.

5 Diskussion

5.1 Differenzierung der Hämolyseformen

Die Bildung von Hämolytinen ist eine typische Eigenschaft der meisten pathogenen Staphylokokkenarten (BRÜCKLER et al., 1994). Diese Exosubstanzen mit Proteinnatur schädigen neben Erythrozyten häufig auch andere Zellarten. Die Schädigung von Erythrozyten zeigt sich in der Regel als Hämolyse auf Blutagarplatten. Bei Staphylokokken werden α -, β -, γ -, δ - und δ -like Hämolytine oder Toxine unterschieden. Sie können neben der direkten Hämolyse auf Blutagarplatten auch aufgrund synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen mit Stoffwechselprodukten weiterer Bakterienspezies unterschieden werden (SKALKA et al., 1979; HÉRBERT und HANCOCK, 1985; LÄMMLER und BLOBEL, 1987). Nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten zeigt sich die α - und δ -Hämolysezone als vollständige Hämolyse um den Staphylokokkenimpfstrich, die β -Hämolyse als unvollständige Hämolyse; die γ -Hämolyse ist auf Blutagar nicht nachweisbar.

Zur Unterscheidung des α - und δ -Hämolytins beschrieben SKALKA et al. (1979) sowie HÉRBERT und HANCOCK (1985) antagonistische bzw. synergistische Reaktionen dieser Hämolytine mit dem Staphylokokken- β -Hämolytin. Die α -Hämolyse zeigte sich als vollständige Hämolyse um den Impfstrich mit einer Hemmung im Bereich des β -Hämolytins. Im Gegensatz dazu wies das δ -Hämolytin im Bereich des Staphylokokken- β -Hämolytins eine synergistische Reaktion auf, die sich als eine Verstärkung der Hämolyse darstellte. Das β -Hämolytin ergab eine unvollständige Hämolyse auch im Bereich des β -Hämolytinproduzierenden Referenzstammes. Nach SKALKA et al. (1979) waren so einzelne Hämolytine, aber auch das Vorkommen von Hämolytinkombinationen der zu untersuchenden Kulturen differenzierbar.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit den oben beschriebenen Methoden das α -, β - und δ -Hämolytin nachgewiesen werden. Dabei wies das δ -Hämolytin 2 Formen auf, die hier als δ_1 und δ_2 bezeichnet wurden. Die als δ_1 -Hämolytin bezeichnete Form zeigte sich auf Schafblutagarplatten als schmale Zone einer vollständigen Hämolyse mit einer synergistisch-hämolytischen Reaktion im Bereich des β -Hämolytins; die als δ_2 -Hämolyse bezeichnete Form zeigte keine Hämolyse auf Schafblutagar. Hierbei war lediglich eine synergistisch auftretende Hämolysereaktion im Bereich des Staphylokokken- β -Hämolytins feststellbar.

Dabei zeigten 24 *S. aureus*-Kulturen eine α -Hämolyse, eine β -Hämolyse trat bei 23 *S. aureus*- und 36 SIG-Kulturen auf. Bei 7 *S. aureus*- und einer SIG-Kultur war eine δ_1 -Hämolyse nachweisbar, eine δ_2 -Hämolyse zeigten 6 *S. aureus*-Kulturen. Bei 26 *S. hyicus*-Kulturen konnte eine schwache δ_2 -Hämolyse beobachtet werden und bei 12 *S. aureus*-, einer SIG- und 14 *S. hyicus*-Kulturen war keine Hämolyse auf Schafblutagarplatten festzustellen.

Die Benennung dieser Substanzen als Hämolytine wird der eigentlichen Bedeutung nicht gerecht; umfassender und treffender ist die Bezeichnung Toxine, die in der Literatur teilweise auch als membranzerstörende Toxine (membrane-damaging-toxins) bzw. Zytolytine benannt werden (McCATNEY und ARBUTHNOTT, 1978).

Funktionell handelt es sich bei dem α -Hämolysin um ein wasserlösliches Polypeptid, welches ein zytotoxisches, hauptsächlich von *S. aureus* gebildetes Exotoxin darstellt. Durch Aneinanderlagern von 6 Toxinmolekülen entsteht eine Ringstruktur, die sich in die Membran der Zelle einsenkt und zur Bildung von transmembranalen Kanälen führt (BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991). Durch diese Kanäle kommt es zur Freisetzung von Ionen und letztendlich zum Platzen der Membran durch osmotische Lyse (BRÜCKLER et al., 1994). Neben der Hämolyse zeigte das α -Hämolysin auch eine dermonekrotische und neurotoxische Wirkung (ROGOLSKY, 1979).

Das Staphylokokken- β -Hämolysin ist eine Phospholipase C mit einer Spezifität für Sphingomyelin und wird deshalb auch als Sphingomyelinase bezeichnet. Durch eine Freisetzung von Phosphorylcholin aus dem Sphingomyelin der Erythrozytenmembran bewirkt das β -Hämolysin eine Membranschädigung. Der Nachweis des β -Hämolytins erfolgte bevorzugt auf Schafblutagarplatten, da die Empfindlichkeit der Erythrozyten vom Anteil an Sphingomyelin in der Membran abhängig ist. Dieser ist bei Erythrozyten von Rind, Ziege und Schaf im Gegensatz zu anderen Säugetieren mit 50 % relativ hoch; der Anteil bei anderen Säugetieren liegt bei 15-25 % Sphingomyelin (THELESTAM, 1983).

Die β -Hämolyse stellt sich nach der Bebrütung als unvollständige Hämolyse um die Staphylokokkenkolonien dar; nach anschließender Inkubation von 1h bei 4°C kommt es jedoch zur vollständigen Hämolyse. Auf Grund dessen wird das β -Hämolysin auch als „hot-cold“-Hämolysin bezeichnet (BRÜCKLER et al., 1994). TITBALL (1993) führte dies auf die Veränderung des Sphingomyelins in der Erythrozytenmembran zurück, die nach Einwirkung des β -Hämolytins als monomolekularer Lipidfilm vorlag und bei erniedrigter Temperatur zerfiel. Neben der enzymatischen Wirkung auf das Sphingomyelin in der Zellmembran, hat das β -Hämolysin weitere membranschädigende Eigenschaften. So wiesen WALEV et al. (1996) einen toxischen Effekt des β -Hämolytins auf Monozyten nach, wobei jedoch der zytotoxische Effekt aufgrund des niedrigen Sphingomyelingehalts in der Monozytenmembran (10,9-20,8 %) ungeklärt blieb.

Ein weiteres Hämolysin von *S. aureus*, das γ -Hämolysin, lässt sich nach herkömmlicher Anzucht der Staphylokokkenkulturen auf Festnährmedien nicht nachweisen. Bei der routinemäßigen Überprüfung der hämolytischen Aktivität auf Blutagarplatten wird das γ -Hämolysin durch sulfonierte Polymere, wie Agar, Heparin, Dextran-Sulfat, aber auch durch einige Lipide, wie Phospholipide, Fettsäuren und Cholesterol, gehemmt (CLYNE et al., 1992). Der Nachweis des γ -Hämolytins erfolgte deswegen als Röhrchentest mit Schaf-, Kaninchen- oder Ziegenerythrozyten. Gegenüber Pferdeerythrozyten konnten in den Untersuchungen von FACKRELL und WISEMAN (1976) keine hämolytischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Das γ -Hämolysin, das wie das Panton-Valentin-Leukozidin (PVL) zur Gruppe der synergohymenotropen Toxine zählt, besitzt nach den Untersuchungen von SUPERSAC et al. (1998) eine stark inflammatorische Wirkung. FACKRELL und WISEMAN (1976) beschrieben in Versuchen mit Meerschweinchen die letale Wirkung des γ -Toxins.

Das δ -Hämolysin ist ein Polypeptid, bestehend aus 26 hydrophoben Aminosäuren (FITTON et al., 1984). Wie bei dem α -Hämolysin kommt es durch Bildung von Toxin-Hexameren zur Porenbildung in der Membran, zu Permeabilitätsstörungen und damit zur Lyse der Erythrozyten (MELLOR et al., 1988). Das δ -Hämolysin kann sowohl bei koagulasenpositiven als auch bei koagulasenegativen Staphylokokkenspezies vorkommen und zeigt sich als Zone

vollständiger Hämolyse um die Staphylokokkenkolonien (HÉRBERT und HANCOCK, 1985 und HÉRBERT, 1990). Im Gegensatz zum α -Hämolysin zeigte das δ -Hämolysin synergistisch mit dem β -Hämolysin eine Hämolyseverstärkung (SKALKA et al. 1979; HÉRBERT und HANCOCK, 1985). Die in den vorliegenden Untersuchungen als δ_2 -Hämolyse bezeichnete Form ist möglicherweise auf ein geringeres Toxinbildungsvermögen dieser Kulturen zurückzuführen. Diese geringere Toxinmenge könnte nicht ausreichend sein, die intakte Erythrozytenmembran zu lysieren. Bei Erythrozyten, deren Zellmembran durch die Sphingomyelinase C vorgeschädigt ist, wäre dann doch eine Zerstörung der monomolekulare Lipidschicht der Erythrozytenmembran möglich, die sich anschließend als vollständige Hämolyse darstellt.

SCHEIFELE et al. (1987) beschrieben ein Hämolysin bei *S. epidermidis* und bezeichneten es als δ -like Hämolysin. Auch VANDENESCH et al. (1991) berichteten von einem hitzestabilen Hämolysin bei *S. lugdunensis* und wiesen eine starke Aktivität gegenüber Kaninchenerythrozyten nach. In beiden Fällen konnten Homologien mit dem δ -Hämolysin von *S. aureus* nachgewiesen werden.

Das δ -Hämolysin besitzt neben einer hämolytischen Eigenschaft auch eine bereite zellzerstörende Aktivität (BRÜCKLER et al., 1994). Die in Meerschweinchenversuchen getesteten Reaktionen ergaben neben der Permeabilitätserhöhung der Hautgefäße auch eine Hemmung der Wasserresorption durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase im Ileum (SCHMITZ et al., 1997). Die pathogene Bedeutung könnte nach Untersuchungen dieser Autoren auch am direkten Einfluß des δ -Hämolysins auf Monozyten liegen. Es induziert die Produktion des „Tumor Necrosis Factor alpha“ (TNF- α), der ein Zytokin darstellt, das eine Reihe weiterer entzündlicher Veränderungen, bis hin zum Schock hervorrufen kann (MATTSSON et al., 1996 und SCHMITZ et al., 1997).

5.2 Phänotypische Eigenschaften

Das Enzym Katalase war bei allen 150 Kulturen der vorliegenden Untersuchung nachweisbar. Die Bildung des Enzyms Katalase gilt als eine typische Eigenschaft von Staphylokokken (BRÜCKLER et al., 1994). TU und PALUTKE (1976) beschrieben allerdings das Vorkommen von katalasenegativen *S. aureus*. Die Gattung *S. aureus* subsp. *anaerobius* ist stets katalasenegativ (KLOOS und LAMBE, 1991). Katalase zersetzt H_2O_2 ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). Dadurch schützen sich phagozytierte Staphylokokken gegen das in den Phagozyten gebildete H_2O_2 . Stark katalasepositive Staphylokokken wurden, nach BRÜCKLER et al. (1994), langsamer abgetötet als schwache Katalasebildner. Die Ersteren haben auch eine höhere Virulenz im Mäuseversuch (MANDELL, 1975).

Die 150 der Gattung *Staphylococcus* zugeordneten Kulturen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Koagulasereaktion untersucht. Die Koagulasereaktion, die bereits 1903 von LOEB beschrieben worden war, ermöglichte eine Unterteilung in 72 *S. aureus*-, 27 *S. hyicus*- und 38 SIG-Kulturen die koagulasepositiv waren, 13 *S. hyicus*-Kulturen waren koagulasenegativ. Die Koagulasereaktion stellt seit langem ein wichtiges taxonomisches Kriterium zur Differenzierung innerhalb der Gattung *Staphylococcus* dar. Die extrazelluläre Substanz „Koagulasereaktion“ besitzt

nach BRÜCKLER et al. (1994) keinen Enzymcharakter. Durch Bindung des Prothrombins entsteht der proteolytisch wirkende Komplex des „Staphylothrombins“, der ähnlich dem Thrombin, zu einer Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinogenmolekül führt und so durch Polymerisation des Fibrinogens eine Koagulation des Plasmas bewirkt. USHIODA et al. (1981) beschrieben 8 serologisch unterscheidbare Koagulasen.

Zu den koagulasepositiven Staphylokokken zählen neben *S. aureus* auch *S. aureus* subsp. *anarobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae* und *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (BRÜCKLER et al., 1994; FOSTER et al. 1997).

Ein Nachweis des Clumping-Factors im Objektträgertest war bei allen 72 *S. aureus*-Kulturen und bei 24 SIG-Kulturen festzustellen. Bei 14 SIG- und 40 *S. hyicus*-Kulturen war keine vergleichbare Reaktion vorhanden. Der Clumping-Factor gilt als taxonomisches Kriterium für *S. aureus* (KLOOS und SCHLEIFER, 1986) und mit Einschränkung für *S. intermedius*, *S. hyicus* (DEVERIESE und HAJEK, 1980; LÄMMLER et al., 1985, LÄMMLER, 1991a, b) *S. lugdunensis* und *S. schleiferi* (KLOOS und LAMBE, 1991). Nach HUMMEL et al. (1992) müssen nicht alle *S. aureus*-Kulturen Clumping-Factor-positiv sein. Bei bekapselten *S. aureus*-Stämmen können, nach BLACKSTOCK et al. (1968), z. B. überlagernde Polysaccharide den Clumping-Factor abdecken.

Der Nachweis des Enzyms β -Galactosidase ermöglichte eine weitergehende Differenzierung zwischen den einzelnen Staphylokokkenspezies. Bei allen 38 SIG-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen konnte dieses Enzym nachgewiesen werden; alle 72 *S. aureus*- und 40 *S. hyicus*-Kulturen erwiesen sich als negativ. Der Nachweis des Enzyms erfolgte nach MADDOCKS und GREENAN (1975) durch Abspaltung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons vom nicht-fluoreszierenden 4-Methylumbelliferyl- β -Galactosid; im positiven Fall zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz unter UV-Licht. Das Ergebnis nach der Methode von MADDOCKS und GREENAN (1975) konnte bereits nach 1h beurteilt werden, so dass mit diesem Verfahren eine Differenzierung der koagulasepositiven Staphylokokkenspezies *S. aureus* und *S. intermedius* sehr schnell und einfach möglich war. Das Enzym β -Galactosidase bewirkt eine hydrolytische Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose und wird innerhalb der koagulasepositiven Staphylokokken von *S. intermedius* und *S. lutrae* gebildet (HÁJEK, 1976, FOSTER et al., 1997). Das Enzym Hyaluronidase war bei allen 72 *S. aureus*- und allen 40 *S. hyicus*-Kulturen nachweisbar. Bei allen 38 SIG-Kulturen war keine vergleichbare Reaktion festzustellen.

Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase wurde mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests geprüft und zeigte sich als Hemmung des mukoiden Wachstums einer *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-Test Kultur. SKALKA (1985) beschrieb diesen Dekapsulationstest als geeignete und zuverlässige Methode zur Differenzierung von *S. aureus* und *S. intermedius*.

Eine positive Voges-Proskauer-Reaktion konnte bei allen 72 *S. aureus*-Kulturen ermittelt werden; bei allen 38 *S. intermedius*- und 40 *S. hyicus*-Kulturen war diese Reaktion negativ.

5.3 Empfindlichkeit gegenüber Colistin

Nach Untersuchungen von HELTBERG und BRUN (1983, 1984) sowie CASALS und PRINGLER (1989) eignete sich Colistin aufgrund einer Resistenz von *S. aureus* zur Abgrenzung dieser Staphylokokkenspezies. Ebenfalls als resistent erwiesen sich nach den Angaben von CASALS und PRINGLER (1989) sowie MONSEN et al. (1998) einige Kulturen der Spezies *S. epidermidis*. Innerhalb der SIG-Kulturen der vorliegenden Untersuchung reagierten alle 38 Kulturen empfindlich gegenüber Colistin. Zum Vergleich diente die *S. aureus*-Kultur DSM 346.

5.4 Untersuchung der *S. aureus*-Kulturen

5.4.1 Identifizierung

S. aureus bildet zahlreiche mutmaßliche Virulenzfaktoren, die als konstante Eigenschaften bei nahezu allen *S. aureus*-Kulturen auftreten. Dazu gehören, wie bereits beschrieben, unter anderem die verschiedenen Hämolyseformen, die Thermonuklease, das Staphylokokken-Protein A, die Koagulase und der Clumping-Factor. Die Auffindung dieser zellwandassoziierten und teilweise extrazellulären Substanzen gilt bislang als wesentliches Kriterium des klinisch-mikrobiologischen Labors zur Identifizierung und Differenzierung von Staphylokokken, insbesondere von *S. aureus*. Ein Hauptnachteil dieser konventionellen Tests liegt in der zuvor häufig notwendigen Reindarstellung des zu identifizierenden Mikroorganismus, in falsch-negativen Ergebnissen aufgrund verminderter Expression des jeweiligen zellwandgebundenen oder extrazellulären Proteins oder auch in einer mangelnden Empfindlichkeit des Nachweissystems. Zur Umgehung dieser Probleme eignete sich der Nachweis der Gene, die die jeweiligen Proteine kodieren. Dies beinhaltete das die Thermonuklease-kodierende Gen *nuc* (BRAKSTAD et al., 1992) und das Protein A-kodierende Gen *spa* (LÖFDAHL et al., 1983).

In den vorliegenden Untersuchungen diente das Thermonuklease-kodierende Gen *nuc* als Zielgen zur molekularen Identifizierung von *S. aureus*. *S. aureus*-Kulturen produzieren eine extrazelluläre thermostabile Nuklease mit einer Molekülmasse von 17 kDa. Das Thermonuklease-kodierende Gen *nuc* wurde bereits von KOVACEVIC et al. (1985) sequenziert. In der vorliegenden Arbeit konnte das Thermonuklease-kodierende Gen *nuc* bei allen 72 *S. aureus*-Kulturen amplifiziert werden. Dies erfolgte mit den von BRAKSTAD et al. (1992) entwickelten *nuc*-spezifischen Oligonukleotidprimern. Alle *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen hatten ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von ca. 280 Bp. Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies wurden nicht beobachtet. Auch BRAKSTAD et al. (1992) amplifizierten das Thermonuklease-kodierenden Gen *nuc* einiger *S. aureus*-Kulturen und erhielten ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe. Ebenso wie in den Untersuchungen dieser Autoren zeigten die vorliegenden Untersuchungsergebnisse, dass sich der Nachweis des *nuc*-Gens zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* eignete.

Den *S. aureus*-spezifischen Abschnitt Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA dieser Spezies (siehe AF033191) und speziesspezifische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung dieses Genabschnitts beschrieben MARTINEAU et al. (1998). Dieser Genabschnitt ist wahrscheinlich ein Teil des Gens, das die Glutamatsynthase kodiert (siehe MW2383). In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit den von MARTINEAU et al. (1998) beschriebenen Oligonukleotidprimern bei allen 72 *S. aureus*-Kulturen ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von ca. 110 Bp nachgewiesen werden. Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies wurden nicht beobachtet.

Bei dem Staphylokokken-Protein A handelt es sich um einen mutmaßlichen Pathogenitätsfaktor, der einen Zellwandbestandteil von *S. aureus* darstellt und unter anderem die Eigenschaft hat, das Fc-Fragment des Immunglobulin G (IgG)-Moleküls unterschiedlicher Säugetierspezies zu binden. Das Protein A besitzt 5 homologe Fc-bindende Domänen, die als Regionen E, D, A, B und C bezeichnet werden. Jede Domäne beinhaltet ca. 60 Aminosäuren und besteht aus ca. 160 Bp großen sich wiederholenden Einheiten („Repeats“). SEKI et al. (1998) amplifizierten den Protein A-*spa*-Genabschnitt, der die IgG-bindende Region kodiert. Dies erfolgte mit den Oligonukleotidprimern Spa1, der seine Ansatzstelle vor der Domäne E des IgG-bindenden Abschnittes hat, sowie mit Spa2, welcher kurz hinter der Domäne C ansetzt.

In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte ebenso der PCR-vermittelte Nachweis des Genabschnitts, der die IgG-bindende Region des Protein A-Gens *spa* kodiert. Dies konnte mit den von SEKI et al. (1998) beschriebenen Oligonukleotidprimern durchgeführt werden. Dabei wiesen 70 *S. aureus*-Isolate der vorliegenden Untersuchungen ein Amplikon mit einer Größe von 920 Bp und zwei Isolate ein Amplikon mit einer Größe von 750 Bp auf. Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies waren nicht nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse fanden AKINEDEN et al. (2001). SCHWARZKOPF et al. (1993) amplifizierten ebenso den Protein A-*spa*-Genabschnitt der die IgG-bindende Region kodiert mit Hilfe der Oligonukleotidprimer Spa1 und Spa2.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das Thernonuklease-kodierende Gen *nuc*, der *S. aureus*-spezifische Abschnitt Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA und das Protein A-kodierende Gen *spa* zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* einsetzen lassen. Einige dieser Genabschnitte zeigen Genpolymorphismen und erlauben neben der Identifizierung eine Genotypisierung von Kulturen dieser Spezies.

5.4.2 Weitergehende Charakterisierung

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* veröffentlichten JOHNSON et al. 1991. In den vorliegenden Untersuchungen konnten mit den von JOHNSON et al. (1991) beschriebenen Oligonukleotidprimern die Gene *eta* und *etb* bei zwei *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Wundabstrichen von Humanpatienten, und das Gen *eta* bei einer *S. aureus*-Kultur, isoliert aus dem Nabel eines Humanpatienten, nachgewiesen werden. Die verbleibenden 69 bzw. 70 *S. aureus*-Kulturen, isoliert vom Rind, verschiedenen anderen Tierarten und Mensch, waren *eta*- bzw. *etb*-negativ. Somit scheinen die Exfoliativen Toxine ETA und ETB bei *S. aureus*, isoliert vom Mensch von geringerer Bedeutung zu sein und überwiegend mit der Herkunft „Haut“ in Verbindung zu stehen. Bei Isolaten vom Tier scheinen diese Toxine keinerlei Bedeutung zu haben. Ähnliches beschrieben bereits CABRAL (2003) und EISSA (2007).

Sequenzanalysen von *etc* in den vorliegenden Untersuchungen zeigten eine Homologie zu dem die Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gen *purB*. Das von SATO et al. (1994) beschriebene Toxin ETC scheint somit nicht zu den Exfoliativen Toxinen zu gehören. Das *purB*-Genprodukt Adenylsuccinatlyase katalysiert eine Reaktion in der de novo Synthese von Purin. Das tetramere Enzym Adenylsuccinatlyase spaltet von β -D-5'-Phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamid)-5-amino-imidazol Fumarsäure ab. Damit ist der erste Stickstoff-Substituent des Purin-Skeletts angebracht, wobei β -D-5'-Phosphoribosyl-4-carboxyamid-5-amino-imidazol entsteht.

Die im vorliegenden verwendeten Oligonukleotidprimer wurden anhand der Sequenz des von SATO et al. (1994) beschriebenen Gens *etc* bzw. *purB* erstellt (3.7.7.2.2). Das Adenylsuccinatlyase-kodierende Gen *purB* konnte bei allen 72 untersuchten *S. aureus*-Kulturen nachgewiesen werden. Alle *S. aureus*-Kulturen zeigten ein einheitliches Amplikon mit einer Größen von ca. 490 Bp. Eine Sequenzanalyse von *purB* einer *S. aureus*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 100 % der in der Datenbank beschriebenen *S. aureus-purB*-Sequenz. Die mögliche Bedeutung von *purB* als bakterieller Virulenzfaktor wurde von PAIK et al. (2005) beschrieben. Die von diesen Autoren untersuchten *Streptococcus sanguinis-purB*-Mutanten zeigten eine signifikante Reduktion der Virulenz.

Da ein *etd*-Referenzstamm nicht verfügbar war konnte das Vorkommen dieses Exfoliativen Toxingens für die Stämme der vorliegenden Untersuchungen nicht untersucht werden.

CHIPS ist ein erst vor wenigen Jahren beschriebenes Exoprotein, das von verschiedenen *S. aureus*-Stämmen, isoliert vom Mensch, gebildet wird (POSTMA et al., 2004). Dieses Exoprotein hat eine relative Molekülmasse von 14.1 kDa und wird bei ca. 60 % der klinischen Isolate gefunden (De HAAS et al., 2004). CHIPS ist ein spezifischer Inhibitor der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Dieses Exoprotein hemmt die Bindung von C5a und von formylierten Peptiden an Rezeptoren durch Bindung an den jeweiligen Rezeptor. Diese antagonistische Wirkung macht CHIPS möglicherweise zu einem Hilfsmittel zur Unterdrückung von Entzündungen. Über das Vorkommen von CHIPS bei *S. aureus*-Isolaten vom Tier liegen bisher noch keine Ergebnisse vor.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte durch PCR-vermittelten Nachweis das CHIPS kodierende-Gen *chp* bei 10 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Untersuchungsmaterialien vom Tier, und bei 13 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Untersuchungsmaterialien vom Mensch, nachgewiesen werden. Dies erfolgte mit den von De HAAS et. al (2004) beschriebenen Oligonukleotidprimern. Die verbleibenden 49 *S. aureus*-Kulturen, darunter alle *S. aureus*, isoliert von Rindmastitiden, waren *chp*-negativ. Eine Sequenzanalyse von *chp* einer *S. aureus*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen, isoliert aus Rinderkot, entsprach zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen *S. aureus-chp*-Sequenz. Die vorliegende Arbeit zeigt somit erstmalig, dass das Gen *chp* auch bei *S. aureus*, isoliert vom Tier, gefunden werden kann. Die Bedeutung des Gens *chp* und der Expression von CHIPS bei *S. aureus*-Isolaten vom Tier bleibt zukünftigen Untersuchungen überlassen.

5.5 Untersuchung der *S. intermedius*-Gruppe (SIG)

5.5.1 Identifizierung

In der vorliegenden Arbeit diente die von BARON et al. (2004) vorgeschlagene Multiplex-PCR mit den Thermonuclease-Genen *nuc* von *S. intermedius* und *S. aureus* als Zielgene zur molekularen Identifizierung. Die PCR zeigte eine eindeutige Unterscheidung von SIG und *S. aureus*. Das Thermonuclease-kodierende Gen *nuc* von *S. intermedius* war bei allen 38 SIG, der *S. intermedius*-Referenzkultur und bei drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen nachweisbar, nicht dagegen bei *S. aureus* DSM 346 und bei *S. delphini* DSM 20771. Die von BARON et al. (2004) vorgeschlagene Multiplex-PCR ermöglichte somit keine Unterscheidung von *S. intermedius* und *S. pseudintermedius*; eine Abgrenzung von *S. aureus* und *S. delphini* war dagegen möglich. Der Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. aureus* diente als Kontrolle. Alle 38 SIG, drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen und die anderen untersuchten Staphylokokkenspezies zeigten für den universellen 16S rDNA Genabschnitt eine positive Reaktion. Dies diente als interne PCR-Kontrolle.

Ein neuartiges Konzept zur Identifizierung von Spezies der Gattung *Staphylococcus* basiert auf einem spezifischen Abschnitt des Co-Chaperon-DnaJ-kodierenden Gens *dnaJ* (SHAH et al., 2007). Durch DnaJ wird die ATPase-Aktivität gesteigert und es kommt zur Hydrolyse von ATP zu ADP. Anschließend bildet sich ein stabiler ternärer Komplex aus dem Substratpeptid DnaK und DnaJ.

Zur Amplifizierung des *dnaJ*-Gens von SIG wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer entwickelt. Ein spezifischer *dnaJ*-Genabschnitt konnte bei allen 38 untersuchten SIG, der *S. intermedius*-Referenzkultur und bei drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen nachgewiesen werden, nicht dagegen bei *S. delphini* DSM 20771. Die anderen 25 untersuchten Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies (siehe 3.1) erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern ebenso als negativ. Die vorgeschlagene PCR-vermittelte

Identifizierung ermöglichte somit eine molekulare Identifizierung von *S. intermedius* und *S. pseudintermedius*, aber wiederum keine Unterscheidung dieser beiden Spezies, weswegen die im vorliegenden untersuchten *S. intermedius* auch weiter als SIG bezeichnet werden. Die Sequenz des Co-Chaperon-DnaJ-kodierenden Gens *dnaJ* von *S. pseudintermedius* ist bislang noch nicht verfügbar.

5.5.2 Weitergehende Charakterisierung

Eine Sequenzanalyse des Exfoliative Toxin SIET-kodierenden Gens *siet* einer SIG-Kultur der vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen *S. intermedius-siet*-Sequenz.

Zur Amplifizierung des *siet*-Gens von SIG wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer entwickelt. Das Exfoliative Toxin *siet* konnte durch PCR-vermittelten Nachweis bei 35 SIG-Kulturen, der *S. intermedius*-Referenzkultur und bei einer *S. pseudintermedius*-Referenzkultur nachgewiesen werden. Die verbleibenden 3 SIG-Kulturen, zwei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen und *S. delphini* DSM 20771 waren *siet*-negativ. Die Bedeutung dieses Toxins von SIG für das jeweilige Krankheitsbild ist allerdings bislang noch unklar.

Die Staphylokokken-Enterotoxine (SE) von *S. aureus* werden in der Zellwand gebildet und als Exotoxine in die Umgebung abgegeben. Die SE gehören zu einer größeren Gruppe von pyrogenen Toxinen (PT) und können Lebensmittelintoxikationen, den toxischen Schock, sowie verschiedene allergische und autoimmune Erkrankungen hervorrufen. Diese PT scheinen in vivo die Immunantwort des Wirtsorganismus gegen *S. aureus* zu hemmen. Allen Enterotoxinen gemeinsam ist ihre Manifestation im Verdauungstrakt und ihre Wirkung als Superantigen, d.h. sie führen zu einer unspezifischen T-Zell-Proliferation (BALABAN und RASOOLY, 2000; DINGES et al., 2000). Aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften und unterschiedlichen Gensequenzen kennt man bislang bei *S. aureus* die Toxine SEA bis SEE und SEG bis SEQ (KURODA et al., 2001; BABA et al., 2002; YARWOOD et al., 2002).

SE-INT wurde erstmals von FUTAGAWA-SAITO et al. (2004b) bei *S. intermedius*-Kulturen, isoliert von Hund und Taube, beschrieben. SE-INT zeigte eine signifikante Homologie mit SEC (59-61 %) und mit SEB (56.6 %) von *S. aureus* (FUTAGAWA-SAITO et al., 2004b). Die Sequenzanalyse von *se-int* einer SIG-Kultur in den vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen *S. intermedius-se-int*-Sequenz. Zur Amplifizierung des *se-int*-Gens von SIG wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer entwickelt. Das Enterotoxin *se-int* konnte durch PCR-vermittelten Nachweis bei 23 SIG-Kulturen und bei zwei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen nachgewiesen werden. Die verbleibenden 15 SIG-Kulturen, die *S. intermedius*-Referenzkultur, eine *S. pseudintermedius*-Referenzkultur und *S. delphini* DSM 20771 waren *se-int*-negativ. Nach SASAKI et al. (2005) scheint *se-int* vermehrt bei *S. intermedius*-Isolaten von erkrankten Hunden vorzukommen. Eine Beziehung zwischen dem Krankheitsbild und dem Vorkommen von *se-int* lässt sich bei den Isolaten der vorliegenden Untersuchungen allerdings nicht herstellen.

Die Virulenzfaktoren von Staphylokokken kann man in extrazelluläre und zelluläre Faktoren einteilen. Die Leukotoxine werden zu den wichtigsten extrazellulären Toxinen von *S. aureus* gezählt (CIBOROWSKI und JELJASZEWICZ, 1985). Viele *S. aureus*-Isolate aus nekrotischen Hautläsionen und Furunkeln produzieren Leukotoxine (SZMIGIELSKI et al., 1999). Leukotoxine führten zu einer vollständigen Zerstörung der neutrophilen Granulozyten und der monozytären Zellen.

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* und *lukF* von *S. intermedius* beschrieben FUTAGAWA-SAITO et al. (2004a). In den vorliegenden Untersuchungen konnten mit den von FUTAGAWA-SAITO et al. (2004a) beschriebenen Oligonukleotidprimern die Gene *lukS* und *lukF* bei 28 SIG-Kulturen, zwei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen und das Gen *lukS* alleine bei einer SIG-Kultur nachgewiesen werden. Die verbleibenden 9 bzw. 10 SIG-Kulturen, die *S. intermedius*-Referenzkultur, eine *S. pseudintermedius*-Referenzkultur und *S. delphini* DSM 20771 waren *lukS*-bzw. *lukF*-negativ. Nach FUTAGAWA-SAITO et al. (2004a) zeigten *lukS*- und *lukF*-positive *S. intermedius* eine vermehrte Zytotoxizität gegenüber Kaninchenleukozyten. Die Bedeutung der vermehrt vorkommenden Gene *lukS* und *lukF* bei *S. intermedius* bzw. *S. pseudintermedius* für das jeweilige Krankheitsbild lässt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht feststellen und bleibt im Moment noch unklar.

Das Gen *purB* (ehemals *etc*) wurde in den vorliegenden Untersuchungen erstmals auch bei SIG-Kulturen beschrieben. Eine Sequenzanalyse von *purB* einer SIG-Kultur in den vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen *S. aureus-purB*-Sequenz. Die im vorliegenden verwendeten Oligonukleotidprimer wurden, wie bereits für *S. aureus* beschrieben (3.7.7.2.2), anhand der Sequenz des von SATO et al. (1994) beschriebenen Gens *etc* bzw. *purB* erstellt. Das Adenylsuccinatlyase-kodierende Gen *purB* konnte bei 31 SIG-Kulturen und bei allen drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen nachgewiesen werden. Bei 7 untersuchten SIG-Kulturen, der *S. intermedius*-Referenzkultur und *S. delphini* DSM 20771 war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Das Gen *purB* scheint auch bei SIG-Kulturen vermehrt vorzukommen. Die Bedeutung ist allerdings noch unklar.

Das für *S. aureus* bekannte Gen *chp* wurde in den vorliegenden Studien erstmals auch bei SIG-Kulturen beschrieben. Eine Sequenzanalyse von *chp* einer SIG-Kultur in den vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 98 % der in der Datenbank beschriebenen *S. aureus-chp*-Sequenz. Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung des Gens *chp* beschrieben De HAAS et al. (2004). In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit den von De HAAS et al. (2004) beschriebenen Oligonukleotidprimern das Gen *chp* bei 2 SIG-Kulturen, isoliert von einer Hautinfektion und einer Otitis externa des Hundes, nachgewiesen werden. Bei 36 untersuchten SIG-Kulturen, der *S. intermedius*-Referenzkultur, drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen und *S. delphini* DSM 20771 war keine vergleichbare Amplifizierung möglich. Die Bedeutung des Gens *chp* und der Expression von CHIPS bei SIG-Isolaten aus Hund und Katze bleibt zukünftigen Untersuchungen überlassen.

Obwohl bei den im vorliegenden aufgeführten Virulenzfaktoren keine direkte Beziehung zu dem jeweiligen Krankheitsbild hergestellt werden konnte, beeinflusst die Expression dieser Toxine sicherlich den klinischen Verlauf einer SIG-Infektion bei Hund und Katze.

Infektionsversuche mit Virulenzfaktor-positiven und -negativen SIG-Kulturen könnten hierbei Aufschluss geben.

5. 6 Antibiotische Resistenzgene

Penicillin gehört, nach einer zusammenfassenden Darstellung von WALTHER et al. (2006), zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika und wirkt bakterizid auf proliferierende Keime. Schon 1944 ist ein extrazelluläres Enzym bei Staphylokokken beschrieben worden, welches die Wirkung von Penicillin hemmt (KIRBY, 1944). Die Gruppe der β -Lactamasen ist sehr vielfältig und bei gramnegativen wie grampositiven Spezies weit verbreitet (AMYES, 1997; KERNODLE et al., 1998; BOOTSMA et al., 2000). Die mikrobielle Synthese der β -Lactamase, kodiert durch das Gen *blaZ*, führt zur Hydrolyse des β -Lactamrings und so zu einer Inaktivierung der antiinfektiven Wirkung. Staphylokokken, die über eine β -Lactamase verfügen, tragen auf ihrer Oberfläche vereinzelt Prometalloproteasen (BlaR1). Diese sind Sensor-Proteine, die durch Bindung eines β -Lactam-Antibiotikums an ihre Penicillin-bindende Domäne eine schnelle autokatalytische Spaltung in Gang setzen, die eine aktivierte Metalloprotease hervorbringt. Diese Protease spaltet entweder direkt oder in Verbindung mit Co-Faktoren das Regulatorprotein BlaI, wodurch ein 11 kDa großes Fragment mit einer DNS-bindenden Domäne (7 kDa) und ein weiteres Fragment mit einer Dimerisations-Domäne (3 kDa) entstehen. Durch diesen Prozess wird die repressive Wirkung von BlaI aufgehoben und *blaZ* kann transkribiert werden. β -Lactamase wird produziert und führt zur Resistenz von Staphylokokken gegen β -Lactam-basierte Antibiotika (ZHANG et al., 2001). Penicillinase-feste Antiinfektiva, wie Cephalosporine und Carbapeneme, werden in ihrer Wirkung durch β -Lactamasebildung nicht gehemmt (GEISS et al., 2004).

Über das Auftreten von Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) als Mastitiserreger in belgischen Rinderherden wurde erstmals von DEVRIESE und HOMMEZ (1975) berichtet. In den Niederlanden erfolgte eine Beschreibung von MRSA erstmalig 2003 bei einer postoperativen Wundheilungsstörung bei einem Hund (VAN DUIJKEREN et al., 2003). Die Auswertung publizierter Berichte der jüngeren Zeit zeigte, dass sich Infektionskrankheiten durch MRSA bei Hunden sowie Pferden zunehmend häufen. Auch (nasal) kolonisierte Tiere konnten als MRSA-Träger identifiziert werden (WALTHER et al., 2005). Die Methicillin-Resistenz, welche durch das *mecA*-Gen determiniert wird, führt zur Resistenz gegen alle Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme. *mecA* kodiert für das Penicillin-bindende Protein PBP2a. Staphylokokken besitzen fünf verschiedene membrangebundene Penicillin-bindende Proteine, die die Quervernetzung der Peptidoglykanschichten der Zellwand durch eine Transpeptidation bewirken. Die kovalente Bindung von β -Lactamen an das katalytisch aktive Zentrum (Serin) der PBPs 1-3 wirkt letal. PBP2a zeigt eine 1000fach niedrigere Affinität zu allen β -Lactamantibiotika und übernimmt in Gegenwart eines Antibiotikums dieser Klasse die essentielle Transpeptidase-Reaktion (PINHO et al., 2001).

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung des *blaZ*-Penicillinresistenzgens beschrieben MARTINEAU et al. (2000) und des *mecA*-Oxacillinresistenzgens STROMMENGER et al. (2003). In den vorliegenden Untersuchungen konnten innerhalb der 28 SIG-Kulturen bei 27 Kulturen eine Resistenz gegenüber Penicillin festgestellt werden und bei einer Kultur eine

Resistenz gegenüber Methicillin. Die 10 weiteren SIG-Kulturen, diese waren ausgewählte tiermedizinische Isolate (siehe Tab. 2), zeigten eine Resistenz gegenüber Penicillin und Methicillin. Die *S. intermedius*-Referenzkultur erwies sich als empfindlich gegenüber Penicillin und Methicillin, drei *S. pseudintermedius*-Referenzkulturen als resistent gegenüber Penicillin und empfindlich gegenüber Methicillin. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen ergibt sich die Frage nach der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von SIG zwischen Mensch und Hund bzw. Katze und umgekehrt. Dies ist zunächst unabhängig davon, ob es sich um Methicillin-Susceptible *Staphylococcus intermedius* (MSSI) oder Methicillin-Resistant *Staphylococcus intermedius* (MRSI) handelt. GUARDABASSI et al. (2004) und SASAKI et al. (2007) berichteten von einer Übertragung von Methicillin-resistenten *S. intermedius* bzw. *S. pseudintermedius* zwischen Hunden und ihren Besitzern. Das Auftreten von Methicillin-resistenten *S. intermedius* bei Hunden und Katzen beschrieben ferner PAK (2003) und KANIA et al. (2004). Die Bedeutung einer Übertragung von SIG zwischen Mensch, insbesondere auch bei Tierärztinnen bzw. Tierärzten und Klinikpersonal, und Hund bzw. Katze bleibt zukünftigen Untersuchungen überlassen. Ähnlich wie für MRSA berichtet (MANIAN, 2003; VAN DUIJKEREN et al., 2004; WEESE et al., 2006), könnten Tierärztinnen und Tierärzte in Praxen und Kliniken als Träger von MRSI zur Verbreitung der MRSI und zur Ansteckung der Patienten beitragen.

Das „DNA-Fingerprinting“ mittels PFGE beruht auf der Spaltung der chromosomalen DNA durch sogenannte „selten schneidende“ Restriktionsendonukleasen und der Auftrennung der entstandenen Fragmente im elektrischen Wechselfeld. Dieses Verfahren wurde 1982 zuerst von SCHWARTZ et al. beschrieben. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass mehrere Proben in einem Gel parallel bearbeitet werden können. RÖMLING et al. (1995) stellten fest, dass der visuelle Vergleich der Fragmentlängenmuster in der Regel ausreichte, wenn alle Stämme auf einem einzigen Gel analysiert werden konnten. Der Vergleich von Mustern verschiedener Gele erfordert eine sorgfältige Kontrolle. Die experimentellen Bedingungen sollten so weit wie möglich standardisiert werden, um Inhomogenitäten des elektrischen Felds zu vermeiden.

Die Makrorestriktionsanalyse der Gesamt-DNA der 10 ausgewählten Methicillin-resistenten SIG-Kulturen ergab in der vorliegenden Arbeit ein identisches PFGE-Muster, d.h., ähnlich wie bereits für die Verbreitung von MRSA in Krankenhäusern beschrieben (GERMAP, 2008), scheinen auch nur wenige Methicillin-resistente SIG-Stämme in der Hunde- und Katzenpopulation verbreitet zu sein. Weitere Untersuchungen zur Verbreitung einzelner Methicillin-resistenter SIG-Kulturen in Untersuchungsmaterialien von Hund und Katze stehen noch aus.

5.7 Untersuchung der *S. hyicus*-Kulturen

5.7.1 Identifizierung

Zur Amplifizierung eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* und somit zur molekularen Identifizierung der bereits phänotypisch charakterisierten *S. hyicus* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer entwickelt. Ein *S. hyicus*-spezifischer Abschnitt des *sodA* Gens konnte bei allen 40 untersuchten *S. hyicus*-Kulturen nachgewiesen werden. Die anderen 25 untersuchten Staphylokokkenspezies bzw. Staphylokokkensubspezies erwiesen sich mit den beschriebenen Oligonukleotidprimern als negativ.

In den vorliegenden Untersuchungen diente im weiteren ein *S. hyicus*-spezifischer Abschnitt der ISR als Zielstruktur zur molekularen Identifizierung von *S. hyicus*. Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung von ISR von *S. hyicus* beschrieben bereits FORSMAN et al. (1997). In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit diesen Oligonukleotidprimern der *S. hyicus*-spezifische Abschnitt der ISR bei allen 40 *S. hyicus*-Kulturen nachgewiesen werden. Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies wurden nicht beobachtet.

In Zusammenfassung der vorliegenden Ergebnisse kann festgestellt werden, dass sich der *S. hyicus*-spezifische Genabschnitt des Gens *sodA* und der *S. hyicus*-spezifische Abschnitt der ISR zur molekularen Identifizierung von *S. hyicus* einsetzen lassen. Dies könnte zu einer zukünftigen präziseren Erkennung dieser Krankheitserreger beitragen.

5.7.2 Weitergehende Charakterisierung

Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung der Exfoliativen Toxingene *exhA*, *exhB*, *exhC* und *exhD* beschrieben ANDRESEN und AHRENS (2004). Die Gene *exhC* und *exhD* waren in den vorliegenden Untersuchungen bei einer bzw. zwei *S. hyicus*-Kulturen, isoliert von Schweinen mit dem Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis in Deutschland, und *exhD* bei 17 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert von 17 Schweinen in Russland, nachweisbar. Von den 17 Schweinen zeigten 16 Tiere das Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis. Die verbleibenden *S. hyicus*-Kulturen waren *exhC*- bzw. *exhD*-negativ. Die Gene *exhA* und *exhB* waren bei allen 40 *S. hyicus*-Kulturen nicht nachweisbar. Das Auftreten der *S. hyicus*-Toxingene schien mit dem Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis in hohem Maße korreliert zu sein (AHRENS und ANDRESEN, 2004; ANDRESEN, 2005). Eine Sequenzanalyse von *exhC* einer *S. hyicus*-Kultur der vorliegenden Untersuchungen, isoliert in Deutschland, entsprach zu 100 % der in der Datenbank beschriebenen *S. hyicus-exhC*-Sequenz. Zwei Sequenzanalysen von *exhD*-positiven *S. hyicus*-Kulturen, eine Kultur isoliert in Deutschland und eine Kultur in Russland, entsprachen zu 99 % der in der Datenbank beschriebenen *S. hyicus-exhD*-Sequenz. Die für das aktive Zentrum der Serinprotease, diese ist für eine Ablösung der oberen Hautschichten zwischen Stratum granulosum und Stratum

spinosum und damit für das Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis verantwortlich, bedeutsamen Aminosäuren His 115 (H), Asp 164 (D) und Ser 219 (S) waren bei der *exhC*-positiven Kultur nachweisbar (siehe Abb. 39). Ähnlich wie bereits von AHRENS und ANDRESEN (2004) beschrieben, waren bei den Sequenzen der *exhD*-positiven Kulturen die Aminosäure Asp 164 (D) durch die Aminosäure Glu (E) ausgetauscht (siehe Abb. 39). Diese Aminosäuresubstitution könnte biochemische Eigenschaften des Toxins ändern. Experimentell mit einem *ExhD*-positiven *S. hyicus* infizierte Ferkel zeigten allerdings auch das Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis. (AHRENS und ANDRESEN, 2004).

Ferner wurden die erstmalig in Japan (SATO et al., 1991; SATO et al., 1999) beschriebenen Exfoliativen Toxingene *sheta* und *shetb* untersucht. Eine Sequenzanalyse von *sheta* der *S. hyicus*-Kultur S3588 (*exhA*-Referenzstamm) der vorliegenden Untersuchungen entsprach zu 93 % der in der Datenbank beschriebenen *S. hyicus-sheta*-Sequenz. Zur Amplifizierung des *sheta*-Gens von *S. hyicus* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer verwendet. Das Exfoliative Toxingen *sheta* konnte durch PCR-vermittelten Nachweis bei 5 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Deutschland, und bei 11 *S. hyicus*-Kulturen, isoliert in Russland, nachgewiesen werden. Drei bzw. acht der *sheta*-positiven *S. hyicus* wurden von Schweinen mit Exsudativer Epidermitis isoliert. Bemerkenswert war, dass die *exhA*-, *exhB*-, *exhC*-, *exhD*-Referenzstämme und der *exhA*-positive *S. hyicus*-Referenzstamm DSM 20459 *sheta*-positiv waren. Das Auftreten des *S. hyicus sheta*-Gens bzw. die Expression von SHETA schien somit ebenso für das Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis mit verantwortlich zu sein. Ähnliches beschrieben bereits SATO et al. (2000).

Zur Amplifizierung des *shetb*-Gens von *S. hyicus* wurden die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Oligonukleotidprimer verwendet. Mit diesen Oligonukleotidprimern war das Exfoliative Toxingen *shetb* bei keiner der 40 *S. hyicus*-Kulturen nachweisbar. Ähnliches beschrieben bereits FUTAGAWA-SAITO et al. (2007). Da ein *shetb*-Referenzstamm für die vorliegenden Untersuchungen nicht verfügbar war, kann über die Verbreitung und das Vorkommen dieses mutmaßlichen Toxingens keine Aussage getroffen werden.

Diese vorgestellten PCR-vermittelten Nachweisverfahren für fünf Exfoliative Toxingene von *S. hyicus* ermöglichten einen einfachen und sicheren Nachweis dieser Toxingene und könnten zukünftig wesentlich zum Verständnis des Krankheitsbilds der Exsudativen Epidermitis des Schweines beitragen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten *S. aureus*-, *S. intermedius*- und *S. hyicus*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft zunächst durch phänotypische und genotypische Eigenschaften identifiziert und anschließend weitergehend, unter besonderer Berücksichtigung der Exfoliativen Toxingene, charakterisiert werden. Aufgrund der unklaren taxonomischen Stellung und einer fehlenden Abgrenzung gegenüber *S. pseudintermedius* wurden die *S. intermedius*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen als *S. intermedius*-Gruppe (SIG) bezeichnet.

Eine Differenzierung der Staphylokokkenkulturen war aufgrund von kulturellen Eigenschaften, durch Nachweis der Hämolyseformen, der Koagulasereaktion und verschiedener anderer biochemischer Kriterien möglich. Eine molekulare Identifizierung der *S. aureus*-Kulturen erfolgte durch PCR-vermittelten Nachweis des Thermonuklease-kodierenden Gens *nuc*, des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA und des Protein A-kodierenden Gens *spa*, der SIG-Kulturen durch Nachweis des Thermonuklease-kodierenden Gens *nuc* und eines speziesspezifischen Abschnitts des Co-Chaperon-DnaJ-kodierenden Gens *dnaJ* und der *S. hyicus*-Kulturen durch Nachweis des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* und eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region.

Die Etablierung eines PCR-vermittelten Nachweissystems für Exfoliative Toxingene ergab für *S. aureus*, isoliert vom Menschen, nicht aber vom Tier, den vereinzelt Nachweis der ETA- und ETB-kodierenden Gene *eta* und *etb*, für SIG bei nahezu allen untersuchten Kulturen den Nachweis des SIET-kodierenden Gens *siet* und für *S. hyicus* den Nachweis der Exfoliativen Toxine ExhC-, ExhD- und SHETA-kodierenden Gene *exhC*, *exhD* und *sheta*. Der Nachweis der Exfoliativen Toxingene bei *S. hyicus* schien mit dem Krankheitsbild der Exsudativen Epidermitis korreliert zu sein. Die Bedeutung des bei nahezu allen SIG-Kulturen vorkommenden Toxingens *siet* ist bislang noch unklar. Für *S. aureus*-Isolate vom Menschen und erstmalig bei *S. aureus*-Isolaten vom Tier konnte im weiteren das Chemotaxis inhibiting Protein-kodierende Gen *chp* nachgewiesen werden.

Eine weitergehende Charakterisierung der SIG war durch Nachweis der Enterotoxin-, Leukotoxin-, Adenylsuccinatlyase- und Chemotaxis inhibiting Protein-kodierenden Gene *se-int*, *lukS*, *lukF*, *purB* und *chp* möglich. Bei ausgewählten SIG-Kulturen waren ferner die gemeinsam auftretenden Resistenzgene gegenüber Penicillin und Methicillin *blaZ* und *mecA* feststellbar. Diese ausgewählten SIG-Kulturen zeigten einen identischen DNA-Fingerprint, was auf die Verbreitung eines einheitlichen Methicillin-resistenten Bakterienklons in der Hunde und Katzenpopulation hindeutet.

Die in den vorliegenden Untersuchungen vorgestellten PCR-vermittelten Nachweissysteme ermöglichten eine eindeutige Identifizierung und, insbesondere für SIG und *S. hyicus*, eine weitergehende Charakterisierung hinsichtlich des Vorkommens mutmaßlicher Toxin- und Resistenzgene. Der Nachweis unterschiedlicher Genausstattungen bei *S. aureus*, SIG und *S. hyicus* durch die teilweise erstmals vorgestellten molekularen Nachweisverfahren könnte zu einer Abschätzung des krankmachenden Potentials einzelner Staphylokokkenstämme beitragen und letztlich eine Erklärung für das jeweilige Krankheitsbild bei Tier und Mensch geben.

7 Summary

Within the framework of the present study, *S. aureus*-, *S. intermedius*- und *S. hyicus*-cultures of different origins could be firstly identified through phenotypic and genotypic properties and further characterized with the exfoliative toxigenes been taken under consideration. As a result of the unclear taxonomic situation and a missing border opposite to *S. pseudintermedius*, the *S. intermedius*-cultures of the present study, were characterized as *S. intermedius*-Group (SIG).

A differentiation of the staphylococcal cultures was based on cultural properties, through proving hemolysis forms, the coagulase reaction and other biochemical criteria. A molecular identification of *S. aureus*-cultures was carried out through PCR-mediated detection of the thermonuclease-encoding gene *nuc*, of the *S. aureus*-specific section Sa442 within the chromosomal DNA and the protein A-encoding gen *spa*, the SIG-cultures by detection of the thermonuclease encoding gene *nuc* and a specific part of the Co-Chaperon-DnaJ-encoding gene *dnaJ* and the *S. hyicus*-cultures by detection of the superoxide Dimutase A-encoding gene *sodA* and a *S. hyicus*-specific section of the 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ region.

Establishment of PCR-mediated detection-systems for exfoliative toxigenes has shown for *S. aureus*, isolated from man, not from animal, the separate proof of the ETA-and ETB-encoding gens *eta* and *etb* for SIG for almost all tested cultures the evidence of SIET-encoding gene *siet* and for *S. hyicus* the evidence of the exfoliative toxins ExhC-, ExhD- und SHETA-encoding genes *exhC*, *exhD* and *sheta*. Evidence of the exfoliative toxigenes in *S. hyicus* seemed to be correlated with clinical picture of the disease exudative epidermitis. The significance of the occurring toxigenes *siet* in almost all SIG-cultures is so far vague. For *S. aureus*-isolates from man and for the first time for *S. aureus*-isolates from animal, the chemotaxis inhibiting protein- encoding gene *chp* could be furthermore identified. A further characterization of the SIG was possible through identifying the enterotoxin-, leucotoxin-adenylsuccinatlyase- and chemotaxis-inhibiting protein-encoding genes *se-int*, *lukS*, *lukF*, *purB* and *chp*. In selected SIG-cultures the commonly occurring resistance-genes against penicillin und methicillin *blaZ* und *mecA* were detectable. These selected SIG-cultures showed an identical DNA-fingerprint, pointing to the spread of a unique methicillin-resistant bacterial clone in dog and cat population.

The PCR-mediated detection systems presented in this study have enabled a definite identification and, particularly for SIG and *S. hyicus*, a further characterization regarding the appearance of supposable toxin- und resistance gene. The recognition of different gene configurations, in *S. aureus*, SIG and *S. hyicus* through the partially for the first time presented molecular evidence process could help an estimation of the pathogenic potentials of single staphylococcus strains and finally an explanation for the particular disease symptoms in animal and man.

8 Literaturverzeichnis

- AHRENS, P., ANDRESEN, L.O., 2004. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. J. Bacteriol. 186, 1833-1837.
- AKINEDEN, O., ANNEMÜLLER, C., HASSAN, A.A., LÄMMLER C., WOLTER W., ZSCHÖCK M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 959-964.
- AMAGAI, M., MATSUYOSHI, N., WANG, Z.H., ANDL, C., STANLEY, J.R., 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nat. Med. 6, 1275-1277.
- AMTSBERG, G., 1979a. Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an Staphylokokken von Schweinen und Rindern unter besonderer Berücksichtigung von *Staphylococcus hyicus* bzw. *Staphylococcus epidermidis* Biotyp 2. Zbl. Veterinärmed. 26, 137-152.
- AMTSBERG, G., 1979b. Nachweis von Exfoliation auslösenden Substanz in Kulturen von *Staphylococcus hyicus* des Schweines und *Staphylococcus epidermidis* Biotyp 2 des Rindes. Zbl. Veterinärmed. 26, 257-272.
- AMTSBERG, G., HAZEM, S., 1978. Vergleichende experimentelle Untersuchungen zum Nachweis der Pathogenität von *Staphylococcus hyicus* des Schweines bzw. von *Staphylococcus epidermidis* Biotyp 2 des Rindes an gnotobiotischen Ferkeln und Kaninchen. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 91, 299-301.
- AMYES, S.G., 1997. Antibiotic resistance. Resistance mediated by inhibitor-resistant and extended-spectrum TEM and SHV beta-lactamases. J. Med. Microbiol. 46, 454-457.
- ANDRESEN, L.O., 1998. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 20, 301-311.
- ANDRESEN, L.O., 2005. Production of exfoliative toxin by isolates of *Staphylococcus hyicus* from different countries. Vet. Rec. 157, 376-378.
- ANDRESEN, L.O., AHRENS, P., DAUGAARD, L., BILLE-HANSEN, V., 2005. Exudative epidermitis in pigs caused by toxigenic *Staphylococcus chromogenes*. Vet. Microbiol. 25, 291-300.
- ANDRESEN, L.O., AHRENS, P., 2004. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. J. Appl. Microbiol. 96, 1265-1270.
- BABA, T., TAKEUCHI, F., KURODA, M., YUZAWA, H., AOKI, K., OGUCHI, A., NAGAI, Y., IWAMA, N., ASANO, K., NAIMI, T., KURODA, H., CUI, L., YAMAMOTO, K., HIRAMATSU, K., 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 359, 1819-1827.

- BAILEY, C.J., DE AZAVEDO, J., ARBUTHNOTT, J.P., 1980. A comparative study of two serotypes of epidermolytic toxin from *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 624, 111-120.
- BALABAN, N., RASOOLY, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food. Microbiol.* 61, 1-10.
- BARON, F., COCHET, M., PELLERINI, J.L., ZAKOUR, N.B., LEBON, A., NAVARRO, A., PROUDY, I., LOIR, Y.L., GAUTIER, M., 2004. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J. Food. Prot.* 67, 2302-2305.
- BAUMGART, S., HALL, S.E., CAMPOS, J.M., POLIN, R.A., 1983. Sepsis with coagulase-negative staphylococci in critically ill newborns. *Am. J. Dis. Child.* 137, 461-463.
- BECKER, K., HARMSSEN, D., MELLMANN, A., MEIER, C., SCHUMANN, P., PETERS, G., Von EIFF, C., 2004. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4988-4995.
- BES, M.L., SLIM, S., BECHARNIA, F., MEUGNIER, H., VANDENESCH, F., ETIENNE, J., FRENEY, J., 2002. Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2275-2277.
- BEUTH, J., Ko, H.L., TUNGGAL, L., PULVERER, G., 1992. Harnwegsinfektionen durch *Staphylococcus saprophyticus*. *Deutsche Med. Wochenschr.* 117, 687-691.
- BHAKDI, S., TRANUM-JENSEN, J., 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55, 733-751.
- BIBERSTEIN, E.L., JANG, S.S., HIRSH, D.C., 1984. Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *J. Clin. Microbiol.* 19, 610-615.
- BISPING, W., AMTSBERG, G., 1988. *Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere* 1. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- BJURSTRÖM, L., LINDE-FORSBERG, C., 1992a. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am. J. Vet. Res.* 53, 665-669.
- BJURSTRÖM, L., LINDE-FORSBERG C., 1992b. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in stud dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53, 670-673.
- BLACKSTOCK, R., HYDE, R.M., KELLY, F.C., 1968. Inhibition of fibrinogen reaction by polysaccharide of encapsulated *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 96, 799-803.
- BLOBEL, H., BRÜCKLER, J., 1984. Staphylococcal diseases in animals. In: Meyer, W. (Hrsg.): *Staphylokokken und Staphylokokken-Erkrankungen. Infektionskrankheiten und ihre Erreger.* Gustav Fisher Verlag. Bd. 20, 405-419.
- BOERLIN, P., NICOLET, J., 2002. Grampositive Kokken. *Kompodium der Veterinärmedizinischen Bakteriologie 2002*, 9. Kapitel. Institut der Veterinär-Bakteriologie, Universität Bern.

- BÖHM, K.H., RÜFFER, A., SIESENOP, U., BECKMANN, G., 1993. Mikrobiologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Vaginalflora der Hündin. WSAVA Weltkongreß und FKDVG 1993: Kongreßband 275.
- BOOTSMA, H.J., VAN DIJK, H., VAUTERIN, P., VERHOEF, J., MOOI, F.R., 2000. Genesis of BRO beta-lactamase-producing *Moraxella catarrhalis*: evidence for transformation-mediated horizontal transfer. *Mol. Microbiol.* 36, 93-104.
- BRAKSTAD, O.G., AASBAKK, K., MAELAND, J.A., 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654-1660.
- BRÜCKLER, J., SCHWARZ, S., UNTERMANN, F., 1994. Staphylokokken-Infektionen und Enterotoxine. Band II/I. In: Blobel, H., und Th. Schließer, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- CABRAL, K., 2003. Phäno- und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von Rindermastitiden aus dem Bundesstaat São Paulo, Brasilien. *Vet. Med. Diss.*, Justus-Liebig Universität Gießen.
- CADNESS-GRANVES, B., WILLIAMS, R., HARPER, G.J., Miles, A.A., 1943. Slide-test for coagulase-positive staphylococci. *Lancet* 1, 736-738.
- CASALS, J.B., PRINGLER, N., 1989. Identification of staphylococci using a combination chromogenic substrates and sensitivities towards furazolidone, novobiocin and colistin. Workshop on Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infection. Lund University.
- CHESNEAU, O., MORVAN, A., GRIMONT, F., LABISCHINSKI, H., EL SOLH, N., 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 237-244.
- CIBOROWSKI, P., JELJASZEWICZ, J., 1985. Staphylococcal enzymes and virulence. In: A. HOLDER (Hrsg.): *Bacterial enzymes and virulence*. CRC Press, Boca Raton, S. 146-183.
- CLYNE, M., BIRKBECK, T.H., ARBUTHNOTT, J.P., 1992. Characterization of staphylococcal gamma-lysin. *J. Gen. Microbiol.* 138, 923-930.
- COX, H.U., HOSKINS, J.D., NEWMAN, S.S., FOIL, C.S., TURNWALD, G.H., ROY A.F., 1988. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 49, 747-751.
- COX, H.U., NEWMAN, S.S., ROY, A.F., HOSKINS, J.D., FOIL, C.S., 1985. Comparison of coagulase test methods for identification of *Staphylococcus intermedius* from dogs. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1522-1525.
- DAJANI, A.S., 1972. The scaled-skin syndrome: relation to phage group II staphylococci. *J. Infect. Dis.* 5, 548-551.
- DEBOER, D.J., 1990. Strategies for management of recurrent pyoderma in dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 20, 1509-1524.

- DE BUYSER, M.L., MORVAN, A., AUBERT, S., DILASSER, F., EL SOLH, N., 1992. Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. J. Gen. Microbiol. 138, 889-899.
- DEGO, O.K., VAN DIJK, J.E., NEDERBRAGT, H., 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet. Quart. 24, 181-198.
- De HAAS, P.J., de HAAS, C.J., KLEIBEUKER, W., POPPELIER, M.J., van KESSEL, K.P., KRUIJTZER, J.A., LISKAMP, R.M., van STRIJP, J.A., 2004. Terminal residues of the chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are essential for blocking formylated peptide receptor but not C5a receptor. J. Immunol. 173, 5704-5711.
- DE LA FUENTE, R., SUAREZ, G., SCHLEIFER, K.H., 1985. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess of sheep. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 99-102.
- DEVRIESE, L.A., 1977. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. Am. J. Vet. Res. 38, 787-792.
- DEVRIESE, L.A., DE PELSMAECKER, K., 1987. The anal region as a main carrier site of *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs. Vet. Rec. 121, 302-303.
- DEVRIESE, L.A., HÁJEK, V., 1980. Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals. J. Appl. Bacteriol. 49, 1-11.
- DEVRIESE, L.A., HÁJEK, V., OEDING, P., MEYER, S.A., SCHLEIFER, K.H., 1978. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. Nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 482-490.
- DEVRIESE, L.A., HERMANS, K., BAELE, M., HAESEBROUCK, F., 2008. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. Vet. Microbiol. 1, 206-207.
- DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. Res. Vet. Sci. 19, 23-27.
- DEVRIESE, L.A., VANCANNEYT, M., BAELE, M., VANEECHOUTTE, M., De GRAEF, E., SNAUWAERT, C., CLEENWERCK, I., DAWYNDT, P., SWINGS, J., DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F., 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1569-1573.
- DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34.
- EISSA, N., 2007. Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden. Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen.
- ELEK, S.D., LEVY, E., 1950. Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. J. Pathol. Bacteriol. 62, 541-554.

- FACKRELL, H.B., WISEMAN, G.M., 1976. Properties of the gamma haemolysin of *Staphylococcus aureus* "Smith 5R". J. Gen. Microbiol. 92, 11-24.
- FALK, D., GUERING, S.J., 1983. Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the Taxo A bacitracin disk. J. Clin. Microbiol. 18, 719-721.
- FALLER, A., SCHLEIFER, K.H., 1981. Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci from micrococci. J. Clin. Microbiol. 13, 1031-1035.
- FALLER, A.H., GÖTZ, F., SCHLEIFER, K.H., 1980. Cytochrome patterns of staphylococci and micrococci and their taxonomic implications. Zbl. I. Ab. Orig. C 1, 26-39.
- FITTON, J.E., HUNT, D.F., MARASCO, J., SHABANOWITZ, J., WINSTON, S., DELL, A., 1984. The amino acid sequence of delta-haemolysin purified from canine isolate of *S. aureus*. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 169, 25-29.
- FITZGERALD, J., PENADÉS, R.J., 2008. Staphylococci of Animals. Edited by: Lindsay, J.A, Department of Cellular and Molecular Medicine, St George's, University of London, UK.
- FITZGERALD, J.R., MONDAY, S.R., FOSTER, T.J., BOHACH, G.A., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., SMYTH, C.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J. Bacteriol. 183, 63-70.
- FLEER, A., SENDERS, R.C., VISSER, M.R., BIJLMER, R.P., GERARDS, L.J., KRAAIJEVELD, C.A., VERHOEF, J., 1983. Septicemia due to coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: clinical and bacteriological features and contaminated parenteral fluids as a source of sepsis. Pediatr. Infect. Dis. 2, 426-431.
- FLEER, A., VERHOEF, J., 1984. New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens. Antonie van Leeuwenhoek. 50, 729-744.
- FORSMAN, P., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., ALATOSSAVA, T., 1997. Identification of *Staphylococcal* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis using 16S–23S rRNA spacer regions. Microbiol. 143, 3491–3500.
- FRÉNAY, H.M., BUNSCHOTEN, A.E., SCHOOLS, L.M., van LEEUWEN, W.J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., VERHOEF, J., MOOI, F.R., 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 60-64.
- FTHENAKIS, G.C., MARPLES, R.R., RICHARDSON, J.F., JONES, J.E., 1994. Some properties of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. Epidemiol. Infect. 112, 171-176.
- FUTAGAWA-SAITO, K., Ba-THEIN, W., HIGUCHI, T., SAKURAI, N., FUKUYASU, T., 2007. Nationwide molecular surveillance of exfoliative toxigenic *Staphylococcus hyicus* on pig farms across Japan. Vet. Microbiol. 124, 370-374.
- FUTAGAWA-SAITO, K., SUGIYAMA, T., KARUBE, S., SAKURAI, N., BA-THEIN, W., FUKUYASU, T., 2004a. Prevalence and characterization of leukotoxin-producing

- Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons. J. Clin. Microbiol. 42, 5324-5326.
- FUTAGAWA-SAITO, K., SUZUKI, M., OHSAWA, M., OHSHIMA, S., SAKURAI, N., BA-THEIN, W., FUKUYASU, T., 2004b. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, *se-int*, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. J. Appl. Microbiol. 96, 1361-1366.
- GEISS, H., MACK, D., SEIFERT, H., 2004. Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotika Empfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern. Chemotherapie. J. 13, 1-16.
- GERMAP. 2008. Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. <http://www.p-e-g.org/econtext/germap2008>.
- GLIMAKER, M., GRANERT, C., KROOK, A., 1988. Septicemia caused by *Staphylococcus saprophyticus*. Scand. J. Infect. Dis. 20, 347-348.
- GOH, S.H., POTTER, S., WOOD, J.O., HEMMINGSEN, S.M., REYNOLDS, R.P., CHOW, A.W., 1996. *HSP60* gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 34, 818-823.
- GOH, S.H., SANTUCCI, Z., KLOOS, W.E., FALTYN, M., GEORGE, C.G., DRIEDGER, D., HEMMINGSEN, S.M., 1997. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. J. Clin. Microbiol. 35, 3116-3121.
- GUARDABASSI, L., LOEBER, M.E., JACOBSON, A., 2004. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet. Microbiol. 14, 23-27.
- HÁJEK, V., 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 401–408.
- HÁJEK, V., DEVRIESE, L.A., MORDARSKI, M., GOODFELLOW, M., PULVERER, G., VARALDO, P.E., 1986. Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* (Devriese et al., 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenes* (Devriese et al., 1978) comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 8, 169-173.
- HÁJEK, V., MARŠÁLEK, E., 1971. The differentiation of pathogenic Staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 217, 176-182.
- HÉBERT, G.A., 1990. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. J. Clin. Microbiol. 28, 2425-2431.
- HÉBERT, G.A., HANCOCK G.A., 1985. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J. Clin. Microbiol. 22, 409-415.

- HELTBERG, O., BRUUN, B., 1983. Polymyxin susceptibility in staphylococci differentiating coagulase positive and coagulase negative strains. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sec. Immun. 91, 157-161.
- HELTBERG, O., BRUUN, B., 1984. Recognition of coagulase negative *Staphylococcus aureus* strains by primary polymyxin susceptibility testing. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sec. Immun. 92, 115-118.
- HESSELBARTH, J., WITTE, W., CUNY, C., ROHDE, R., AMTSBERG, G., 1994. Characterization of *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and cases of superficial pyoderma by DNA restriction endonuclease patterns. Vet. Microbiol. 41, 259-266.
- HILL, P.B., MORIELLO, K.A., 1994. Canine pyoderma. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 334-340.
- HUMMEL, R., DEVRIESE, L.A., LEHMANN, G., 1992. Characteristics of bovine *Staphylococcus aureus* with special regard to clumping factor activity. Zentralbl. Bakteriologie 276, 487-492.
- IHRKE, P.J., SCHWARTZMAN, R.M., MCGINLEY, K., HORWITZ, L.N., MARPLES R.R., 1978. Microbiology of normal and seborrheic canine skin. Am. J. Vet. Res. 39, 1487-1489.
- IVERSEN, O.J., GROV, A., 1973. Studies of lysostaphin. J. Biochem. 38, 293-300.
- JELJASZEWICZ, J., SWITALSKI, L.M., ADLAM, C., 1983. Staphylocoagulase and clumping factor. In: EASMON, C.S.F., und ADLAM, C., (Hrsg): Staphylococci und staphylococcal infections. Vol. 2. The organism in vivo and in vitro. Academic Press, London, New York, 525-557.
- JOHNSON, A.D., SPERO, L., CADES, J.S., DE CICCO, B.T., 1979. Purification and characterization of different types of exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 24, 679-684.
- JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R., ROZEE, K.R., 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426-430.
- KANIA, S.A., WILLIAMSON, N.L., FRANK, L.A., WILKES, R.P., JONES, R.D., BEMIS, D.A., 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. Am. J. Vet. Res. 65, 1265-1268.
- KERNODLE, D.S., VOLADRI, R.K., KAISER, A.B., 1998. Beta-lactamase production diminishes the prophylactic efficacy of ampicillin and cefazolin in a guinea pig model of *Staphylococcus aureus* wound infection. J. Infect. Dis. 177, 701-706.
- KILPPER-BÄLZ, R., SCHLEIFER, K.H., 1981. Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. Zbl. Bakteriologie. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. I Orig. C 2, 324-331.

- KIRBY, W.M., 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*. 99, 452-453.
- KLOOS, W.E., JR LAMBE, D.W., 1991. *Staphylococcus*. In: Balows, A., jr Hausler, W.J., Herrmann, K.I., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., (Hrsg). *Manual of clinical microbiology*. 5. edition. Am. Microbiol. Sci. Washington, D.C., 222-237.
- KLOOS, W.E., SCHLEIFER K.H., 1986. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1013-1035.
- KONDO, I., SAKURAI, S., SARAI, Y., 1973. Purification of exfoliatin produced by *Staphylococcus aureus* of bacteriophage group 2 and its physicochemical properties. *Infect. Immun.* 8, 156-164.
- KOVACEVIC, S., VEAL, L.E., HSIUNG, H.M., MILLER, J.R., 1985. Secretion of staphylococcal nuclease by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 162, 521-528.
- KURODA, M., OHTA, T., UCHIYAMA, I., BABA, T., YUZAWA, H., KOBAYASHI, I., CUI, L., OGUCHI, A., AOKI, K., NAGAI, Y., LIAN, J., ITO, T., KANAMORI, M., MATSUMARU, H., MARUYAMA, A., MURAKAMI, H., HOSOYAMA, A., MIZUTANI-UI, Y., TAKAHASHI, N.K., SAWANO, T., INOUE, R., KAITO, C., SEKIMIZU, K., HIRAKAWA, H., KUHARA, S., GOTO, S., YABUZAKI, J., KANEHISA, M., YAMASHITA, A., OSHIMA, K., FURUYA, K., YOSHINO, C., SHIBA, T., HATTORI, M., OGASAWARA, N., HAYASHI, H., HIRAMATSU, K., 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357, 1225-1240.
- KWOK, A.Y., SU S.C., REYNOLDS, R.P., BAY, S.J., AV-Gay, Y., DOVICH, N.J., CHOW, A.W., 1999. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1181-1192.
- LADHANI, S., JOANNOU, C.L., LOCHRIE, D.P., EVANS, R.W., POSTON S.M., 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 224-242.
- LÄMMLER, C., 1990. *Staphylococcus hyicus*, der Erreger der exsudativen Epidermitis des Schweines. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 103, 60-63.
- LÄMMLER, C., 1991a. Bacteriolytic properties of an extracellular product of *Staphylococcus hyicus*. In: Jeljaszewicz, J. und P. Ciborowski (Hrsg). *The Staphylococci*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 189-190.
- LÄMMLER, C., 1991b. Characterization of *Staphylococcus hyicus* with the ATB 32 Staph system and with conventional tests. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1221-1224.
- LÄMMLER, C., de FREITAS, J.C., CHHATWAL, G.S., BLOBEL, H., 1985. Interactions of immunoglobulin G, fibrinogen and fibronectin with *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg A.* 260, 232-237.

- LÄMMLER, C.H., BLOBEL, H., 1987. Synergistische und antagonistische hämolytische Reaktionen bakterieller Proteine. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 100, 95-99.
- LANE, D.J., PACE, B., OLSEN, G.J., STAHL, D.A., SOGIN, M.L., PACE, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 82, 6955-6959.
- LEIGHTON, P.M., LITTLE, J.A., 1986. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from urinary tract infections. Am. J. Clin. Pathol. 85, 92-95.
- LEWIN, B., 1998. Proteinsynthese. In: Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, 145-146.
- LOEB, L., 1903. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. J. Med. Res. 10, 407-419.
- LÖFDAHL, S., GUSS, B., UHLÉN, M., PHILIPSON, L., LINDBERG, M., 1983. Gene for staphylococcal protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 80, 697-701.
- LOWDER, J.N., LAZARUS, H.M., HERZIG, R.H., 1982. Bacteremias and fungemias in oncologic patients with central venous catheters: changing spectrum of infection. Arch. Intern. Med. 142, 1456-1459.
- LOWY, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339, 520-532.
- MADDOCKS, J.L., GREENAN, M.J., 1975. A rapid method for identifying bacterial enzymes. J. Clin. Pathol. 28, 686-687.
- MAES, N., DE GHELDRE, Y., DE RYCK, R., VANEECHOUTTE, M., MEUGNIER, H., ETIENNE, J., STRUELENS, M.J., 1997. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 35, 2477-2481.
- MANDELL, G.L., 1975. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal leukocyte interaction. J. Clin. Invest. 55, 561-566.
- MANIAN, F.A., 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. Clin. Infect. Dis. 15, 26-28.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., GRENIER, L., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G., 2000. Multiplex PCR assays for detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. J. Antimicrob. Chemother. 41, 4089-4094.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., KE, D., PARADIS, S., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G., 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. J. Clin. Microbiol. 39, 2541-2547.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36, 618-623.

- MATTSSON, E., VAN DIJK, H., VERHOEF, J., NORRBY, R., ROLLOF, J., 1996. Supernatants from *Staphylococcus epidermidis* grown in the presence of different antibiotics induce differential release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *Infect. Immun.* 64, 4351-4355.
- McCATNEY, C.A., ARBUTHNOTT, J.P., 1978. Mode of action of membrane damaging toxins produced by staphylococci. In: Wadström, T., and J. Jeljaszewicz (Hrsg). Bacterial toxins and cell membranes. Academic Press Inc., London, 89-127.
- MCNAMEE, P.T., McCULLAGH, J.J., RODGERS, J.D., THORP, B.H., BALL, H.J., CONNOR, T.J., MCCONAGHY, D., SMYTH, J.A., 1999. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to *Staphylococcus aureus* by aerosol, and inoculation with chicken anaemia and infectious bursal disease viruses. *Avian. Pathol.* 28, 26-35.
- MELLOR, I.R., THOMAS, D.H., SANSOM, M.S., 1988. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 942, 280-294.
- MONSEN, T., RÖNNMARK, M., OLOFSSON, C., WISTRÖM, J., 1998. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 327-335.
- MUNSON, D.P., THOMPSON, T.R., JOHNSON, D.E., RHAME, F.S., VanDRUNEN, N., FERRIERI, P., 1982. Coagulase-negative staphylococcal septicemia: experience in a newborn intensive care unit. *J. Pediatr.* 101, 602-605.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Informational supplement. NCCLS document M31-S1, Wayne, Pa.
- NISHIFUJI, K., FUDABA, Y., YAMAGUCHI, T., IWASAKI, T., SUGAI, M., AMAGAI, M., 2005. Cloning of swine desmoglein 1 and its direct proteolysis by *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins isolated from pigs with exudative epidermitis. *Vet. Dermatol.* 16, 315-323.
- ODENWÄLLER, M., 1988. Charakterisierung von *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* unter besonderer Berücksichtigung der Koagulase. *Vet. Med. Diss., Justus-Liebig Universität Gießen.*
- OEDING, P., DIGRANES, A., 1977. Classification of coagulase-negative staphylococci in the diagnostic laboratory. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand B.* 85, 136-142.
- OLUOCH, A.O., 1996. Trends of bacterial infections in dogs: Characterisation of *Staphylococcus intermedius* isolates (1990 - 1992). *Canine-Practice.* 30, 12-19.
- OSLAND, A., GROV, A., OEDING, P., 1979. Immunochemical analysis of the teichoic acid from *Staphylococcus hyicus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 87, 165-169.
- PAIK, S., SENTY, L., DAS, S., NOE, J.C., MUNRO, C.L., KITTEN, T., 2005. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 73, 6064-6074.

- PAK, S.I., 2003. Study on methicillin-resistant gene distribution of staphylococci isolated from dogs and cats. *J. Vet. Clin.* 20, 302–307.
- PEACOCK, S.J., MOORE, C.E., JUSTICE, A., KANTZANOU, M., STORY, L., MACKIE, K., O'Neill G., DAY, N.P., 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70, 4987-4996.
- PHILLIPS, W.E. KING, R.E., KLOOS, W.E., 1980. Cytotoxische Wirkungen eines Leukozidins von *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 233, 147-152.
- PIÉMONT, Y., RIFAI, S., MONTEIL. H., 1988. Les exfoliatines de *Staphylococcus aureus* *Bull. Inst. Pasteur* 86, 263-269.
- PINHO, M.G., De LENCASTRE, H., TOMASZ, A., 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 11, 10886-10891.
- POSTMA, B., POPPELIER, M.J., van GALEN, J.C., PROSSNITZ, E.R., van STRIJP, J.A., de HAAS C.J., van KESSEL, K.P., 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* 172, 6994-7001.
- POUTREL, B., 1984a. Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. *Vet. Microbiol.* 9, 131-137.
- POUTREL, B., 1984b. *Staphylococcus sciuri* subsp *lentus* associated with goat mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2084-2085.
- POUTREL, B., DUCCELLIEZ, M., 1979. Evaluation of three rapid tests for identification of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine milk. *Ann. Rech. Vet.* 10, 125-129.
- POYART, C., QUESNE, G., BOUMAILA, C., TRIEU-CUOT, P., 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4296-4301.
- PRÉVOST, G., COUPPIÉ, P., MONTEIL, H., 2003. Staphylococcal epidermolysins. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 71–76.
- PULVERER, G., HALSWICK, R., 1967. Coagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus albus*) als Krankheitserreger. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 25, 1141-1145.
- PULVERER, G., PETERS, G., SCHUMACHER-PERDREAU, F., 1987. Coagulase-negative staphylococci. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 264, 1-28.
- RAADD, I.I., DAROUICHE, R.O., HACHEM, R., ABI-SAID, D., SAFAR, H., DARNULE, T., MANSOURI, M., MORCK, D., 1998. Antimicrobial durability and rare ultrastructural colonization of indwelling central catheters coated with minocycline and rifampin. *Crit. Care. Med.* 26, 219-224.
- ROGOLSKY, M., 1979. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 43, 320-360.

- ROLLE, M., MAYR, A., 2002. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
- RÖMLING, U., FISLAGE, R., TÜMMLER, B., 1995. Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern. *Immunol. Infekt.* 23, 4-8.
- ROSYPAL, S., ROSYPALOVÁ, A., HOREJS, J., 1966. The classification of micrococci and staphylococci based on their DNA base composition and adansonian analysis. *J. Gen. Microbiol.* 44, 281-292.
- SASAKI, A., SHIMIZU, A., KAWANO, J., WAKITA, Y., HAYASHI, T., OTSUKI, S., 2005. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 103-106.
- SASAKI, T., KIKUCHI, K., TANAKA, Y., TAKAHASHI, N., KAMATA, S., HIRAMATSU, K., 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2770-2788.
- SATO, H., KURAMOTO, M., TANABE, T., SAITO, H., 1991. Susceptibility of various animals and cultured cells to exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. *Vet. Microbiol.* 2, 157-169.
- SATO, H., MATSUMORI, Y., TANABE, T., SAITO, H., SHIMIZU, A., KAWANO J., 1994. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect. Immun.* 62, 3780-3785.
- SATO, H., WATANABE, T., HIGUCHI, K., TERUYA, K., OHTAKE, A., MURATA, Y., SAITO, H., AIZAWA, C., DANBARA, H., MAEHARA, N., 2000. Chromosomal and extrachromosomal synthesis of exfoliative toxin from *Staphylococcus hyicus*. *J. Bacteriol.* 182, 4069-4100.
- SATO, H., WATANABE, T., MURATA, Y., OHTAKE, A., NAKAMURA, M., AIZAWA, C., SAITO, H., MAEHARA, N., 1999. New exfoliative toxin produced by a plasmid-carrying strain of *Staphylococcus hyicus*. *Infect. Immun.* 67, 4014-4018.
- SCHEIFELE, D.W., BJORNSON, G.L., DYER, R.A., DIMMICK, J.E., 1987. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infect. Immun.* 55, 2268-2273.
- SCHLEIFER, K.H., 1986. Gram-positive cocci. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt (Hrsg). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Gram-positive cocci. 9. edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 999-1035.
- SCHLEIFER, K.H., FISCHER, U., 1982. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 153-156.
- SCHLEIFER, K.H., KLOOS, W.E., 1975. A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* 1, 337-338.
- SCHMITZ, F.J., VELDKAMP, K.E., VAN KESSEL, K.P., VERHOEF, J., VAN STRIIP, J.A., 1997. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst. *J. Infect. Dis.* 176, 1531-1537.

- SCHWARTZ, D.C., SAFFRAN, W., WELSH, J., HAAS, R., GOLDENBERG, M., CANTOR, C.R., 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold. Spring. Harb. Symp. Quant Biol. 1983; 189-195
- SCHWARZKOPF, A., KARCH, H., SCHMIDT, H., LENZ, W., HEESEMANN J., 1993. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin Microbiol. 31, 2281-2285.
- SEKI, K., SAKURADA, J., SEONG, H.K., MURAI, M., TACHI, H., ISHII, H., MASUDA, S., 1998. Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals special reference to correlation with size of protein-A gene. Microbiol. Immunol. 42, 407-409.
- SHAH, M.M., IIHARA, H., NODA, M., SONG, S.X., NHUNG, P.H., OHKUSU, K., KAWAMURA, Y., EZAKI, T., 2007. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 25-30.
- SKALKA, B., 1985. Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci. Vet. Med. (Praha). 30, 373-378.
- SKALKA, B., SMOLA, J., PILLICH, J., 1979. A simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zentralbl. Bakteriol. Orig. A. 245, 283-286.
- SLIFKIN, M., GIL, G.M., 1983. Rapid biochemical tests for the identification of groups A, B, C, F, and G streptococci from throat cultures. J. Clin. Microbiol. 18, 29-32.
- SOMPOLINSKY, D., 1953. De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n. sp. Schwein. Arch. Tierheilk. 95, 302-309.
- STROMMENGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE, W., 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 41, 2480-2482.
- SUPERSAC, G., PIÉMONT, Y., KUBINA, M., PRÉVOST, G., FOSTER, T.J., 1998. Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. Microb. Pathog. 24, 241-251.
- SZMIGIELSKI, S., PREVOST, G., MONTEIL, H., COLIN, D.A., JELJASZEWICZ, J., 1999. Leukocidal toxins of staphylococci. Zentralbl. Bakteriol. 289, 185-201.
- TAKEUCHI, S., KOBAYASHI, Y., MOROZUMI, T., NIIBORI, S., 1985. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cow. Jap. J. Vet. Sci. 47, 841-843.
- TERAUCHI, R., SATO, H., ENDO, Y., AIZAWA, C., MAEHARA, N., 2003b. Cloning of the gene coding for *Staphylococcus intermedius* exfoliative toxin and its expression in *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 94, 31-38.
- TERAUCHI, R., SATO, H., HASEGAWA, T., YAMAGUCHI, T., AIZAWA, C., MAEHARA, N., 2003a. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. J. Vet. Microbiol. 94, 19-29.

- THELESTAM, M., 1983. Modes of membrane damaging action of staphylococcal toxins. In: Easmon, C. S. F. and C. Adlam Wadström, T., und J. Jeljaszewicz (Hrsg). *Staphylococci and staphylococcal infection*. Academic Press, London, New York, 705-744.
- TITBALL, R., 1993. Bacterial phospholipase C. *Mirobiol. Rev.* 57, 347-366.
- TRÜPER, H.G., DÉ CLARI, L., 1998. Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 615.
- TU, K.K., PALUTKE, W.A., 1976. Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 3, 77-78.
- USHIODA, H., TERAYAMA, T., SAKAI, S., ZEN-YOJI, H., NISHIWAKI, M., HIDANO, A., 1981. Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work. *Zbl. Bakteriol. Suppl.* 10. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 77-83.
- VANDENESCH, F., STORRS, M.J., POITEVIN-LATER, F., ETIENNE, J., COURVALIN, P., FLEURETTE, J., 1991. Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 62, 65-68.
- VAN DUIJKEREN, E., BOX, A.T., MULDER, J., WANNET, W.J., FLUIT, A.C., HOUWERS, D.J., 2003. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in a dog in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 15, 314-315.
- VAN DUIJKEREN, E., WOLFHAGEN, M.J., BOX, A.T., HECK, M.E., WANNET, W.J., FLUIT, A.C., 2004. Human to dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2235-2237.
- VAN HOOVELS, L., VANKEERBERGHEN, A., BOE, A., VAN VAERENBERGH, K., De BEENHOUWER, H., 2006. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4609-412.
- VARALDO, P.E., KILPPER-BÄLZ, R., BIAVASCO, F., SATTA, G., SCHLEIFER, K.H., 1988. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 436-439.
- WADE, J.C., SCHIMPF, S.C., NEWMAN, K.A., WIERNIK, P.H., 1982. *Staphylococcus epidermidis*: an increasing cause of infection in patients with granulocytopenia. *Ann. Intern. Med.* 97, 503-508.
- WALEV, I., WELLER, U., STRAUCH, S., FOSTER, T., BHAKDI, S., 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 64, 2974-2979.
- WEBSTER, J.A., BANNERMAN, T.L., HUBNER, R.J., BALLARD, D.N., COLE, E.M., BRUCE, J.L., FIEDLER, F., SCHUBERT, K., KLOOS, W.E., 1994. Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 454-460.

- WEESE, J.S., DICK, H., WILLEY, B.M., MCGEER, A., KREISWIRTH, B.N., INNIS, B., LOW, D.E., 2006. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet. Microbiol.* 115, 148–155.
- WALTHER, B., FRIEDRICH, A.W., BRUNNBERG, L., WIELER, L.H., LÜBKE-BECKER, A., 2006. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Veterinärmedizin: ein „New Emerging Pathogen“? *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 6, 222-232.
- WALTHER, B., WIELER, L.H., KOHN, B., BRUNNBERG, L., LÜBKE-BECKER, A., 2005. Monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a small animal hospital. 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Göttingen. 25, 9-28. Abstr. in: *Biospektrum Tagungsband* S. 88.
- WINKLE, S., 1979. *Mikrobiologische und Serologische Diagnostik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 3. Auflage.
- WINSTON, D.J., DUDNICK, D.V., CHAPIN, M., HO, W.G., GALE, R.P., MARTIN, W.J., 1983. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in patients receiving immunosuppressive therapy. *Arch. Intern. Med.* 143, 32-36.
- YAMAGUCHI, T., NISHIFUJI, K., SASAKI, M., FUDABA, Y., AEPFELBACHER, M., TAKATA, T., OHARA, M., KOMATSUZAWA, H., AMAGAI, M., SUGAI, M., 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* 70, 5835-5845.
- YARWOOD, J.M., McCORMICK, J.K., PAUSTIAN, M.L., ORWIN, P.M., KAPUR, V., SCHLIEVERT, P.M., 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* 277, 13138-13147.
- ZHANG, H.Z., HACKBARTH, C.J., CHANSKY, K.M., CHAMBERS H.F., 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science.* 291, 1962-1965.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einige bedeutende tierpathogene Staphylokokkenspezies nach FITZGERALD und PENADÉS (2008)	4
Tab. 2: Herkunft und Isolierungszeitraum der zu untersuchenden Staphylokokkenkulturen ..	20
Tab. 3: Hämolyseformen der 150 untersuchten Staphylokokkenkulturen auf Schafblutagar..	40
Tab. 4: Phänotypische Eigenschaften der 150 untersuchten Staphylokokkenkulturen.....	41
Tab. 5: Antibiotikaempfindlichkeiten der untersuchten 38 SIG-Kulturen und von <i>S. aureus</i> 1150/93.....	42
Tab. 6: Spezifität der Oligonukleotidprimer des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i> , des <i>S. aureus</i> -spezifischen Abschnitts Sa442 innerhalb der chromosomalen DNA und des die IgG- bindende Region-kodierenden Teils des Protein A-Gens <i>spa</i>	46
Tab. 7: Vorkommen der Exfoliativen Toxingene <i>eta</i> und <i>etb</i> , des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i> und des Chemotaxis inhibiting Protein (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i> bei <i>S. aureus</i> -Kulturen unterschiedlicher Herkunft.....	53
Tab. 8: Spezifität der Oligonukleotidprimer des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i> von SIG, des Thermonuclease-kodierenden Gens <i>nuc</i> von <i>S. aureus</i> , eines universellen Genabschnitts der 16S rDNA und des <i>dnaJ</i> -Gens von SIG	56
Tab. 9: Vorkommen des Exfoliativen Toxingens <i>siet</i> , des Enterotoxingens <i>se-int</i> , der Leukotoxin-kodierenden Gene <i>lukS</i> und <i>lukF</i> , des Adenylsuccinatlyase-kodierenden Gens <i>purB</i> , des „Chemotaxis inhibiting Protein“ (CHIPS)-kodierenden Gens <i>chp</i> , der Oxacillin- bzw. Penicillinresistenzgene <i>mecA</i> und <i>blaZ</i> bei SIG- und <i>S. pseudintermedius</i> -Kulturen unterschiedlicher Herkunft.....	70
Tab. 10: Spezifität der Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts des Superoxid DismutaseA-kodierenden Gens <i>sodA</i> und eines <i>S. hyicus</i> -spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR).....	73
Tab. 11: Vorkommen von Exfoliative Toxine-kodierenden Genen bei <i>S. hyicus</i> -Kulturen unterschiedlicher Herkunft	75
Tab. 12: Vorkommen der Exfoliativen Toxingene <i>exhA</i> , <i>exhB</i> , <i>exhC</i> , <i>exhD</i> , <i>sheta</i> und <i>shetb</i> bei <i>S. hyicus</i> unterschiedlicher Herkunft.....	85

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Interzellulärer Zusammenhalt epithelialer Strukturen durch Punktdesmosomen (Macula adhaerens) (A); Desmosomale Verbindung von zwei Zellen durch das Cadherin Desmoglein (B) 12
- Abb. 2: Dendrogrammanalyse der 16S rDNA von unterschiedlichen Spezies der Gattung *Staphylococcus*. Die Erstellung des Dendrogramms erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)..... 13
- Abb. 3: Dendrogrammanalyse des *dnaJ*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*. 14
- Abb. 4: Dendrogrammanalyse des *sodA*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*. 15
- Abb. 5: Dendrogrammanalyse des *tuf*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus *Staphylococcus*. 16
- Abb. 6: Dendrogrammanalyse des *hsp60*-Gens unterschiedlicher Spezies des Genus 17
- Abb. 7: Hämolyseformen der Staphylokokkenkulturen (horizontal links: α -Hämolyse (a), β -Hämolyse (b), keine Hämolyse (c); rechts: δ_1 -Hämolyse (d), δ_2 -Hämolyse (e), typische schwache δ_2 -Hämolyse von *S. hyicus* (f); vertikal: β -hämolisierender *S. aureus*). 40
- Abb. 8: Amplikon des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. aureus* DSM 346 (1) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *nucA*-1 und *nucA*-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (2). Amplikon des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts Sa44 innerhalb der chromosomalen DNA von *S. aureus* DSM 346 (3) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Sa442-1 und Sa442-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (4); M= Längenstandard Serva DNA Standard pBR 328 Mix, Serva, Heidelberg. 44
- Abb. 9: Unterschiedliche Amplikons des Genabschnitts, der die IgG-bindende Region des Protein A-Gens *spa* kodiert (1=920 Bp, entsprechend 5 IgG-bindende „Repeats“, 2=750 Bp, entsprechend 4 IgG-bindende „Repeats“); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* DSM 20044 (3); M=GeneRulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas, St. Leon-Rot 45
- Abb. 10: Amplikons der Exfoliativen Toxingene *eta* und *etb* der *S. aureus*-Kultur 114/92 (1) mit einer Größe von ca. 120 Bp bzw. von ca. 200 Bp; 2 bis 5=negative PCR-Reaktionen von weiteren *S. aureus*-Kulturen ; M=siehe Abb. 9..... 47
- Abb. 11: Typisches Amplikon des *purB*-kodierenden-Gens von drei *S. aureus*-Kulturen (1, 2, 3); M =siehe Abb. 9..... 48
- Abb. 12: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *purB* der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der *purB*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank

- (AB036769). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.
..... 49
- Abb. 13: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz der Adenylsuccinatlyase der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der Adenylsuccinatlyase-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (BAA99412). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert. 50
- Abb. 14: Typische Amplikons des Chemotaxis Inhibiting Protein-kodierenden Gens *chp* von *S. aureus*- Kulturen, isoliert von Rind (1) und Mensch (3); *chp*-negative *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rind (2) und Mensch (4); M=siehe Abb. 8. 51
- Abb. 15: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *chp* der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der *chp*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AF285146). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben.
..... 52
- Abb. 16: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von CHIPS der *S. aureus*-Kultur P1444/05 der vorliegenden Untersuchung mit der CHIPS-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AAQ14339). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben..... 53
- Abb. 17: Nachweis des Thermonuclease-kodierenden Gens *nuc* von *S. intermedius* (ca. 120 Bp) und *S. aureus* (ca. 420 Bp) und eines universellen Genabschnitts der 16S rDNA (ca. 250 Bp) durch Multiplex-PCR; *S. intermedius* DSM 20373 (1); *S. aureus* DSM 346 (2); *S. hyicus* DSM 20459 (3); M=siehe Abb. 8..... 54
- Abb. 18: Typische Amplikons des *dnaJ*-Gens von SIG-Kulturen (1, 3) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *dnaJ*-1 und *dnaJ*-2; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. hyicus* DSM 20459 (2); M=siehe Abb. 9..... 55
- Abb. 19: Typische Amplikons des Exfoliativen Toxingens *siet* von drei SIG-Kulturen (1, 2, 3); *siet*-negative SIG-Kultur (4); M=siehe Abb. 8. 57
- Abb. 20: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *siet* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (BN000819) mit der *siet*-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (AB099710). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 58
- Abb. 21: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz des Exfoliativen Toxins der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAJ29275) mit der Exfoliativen Toxinsequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (BAC79152). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben..... 59
- Abb. 22: Typische Amplikons des *se-int* Gens von drei SIG-Kulturen (1, 2, 3); *se-int*-negative SIG-Kulturen (4, 5); M=siehe Abb. 8..... 60
- Abb. 23: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *se-int* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM943367) mit der *se-int*-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (AB116378). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 61

Abb. 24: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz des Enterotoxins der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAQ15738) mit der Enterotoxin-Sequenz einer *S. intermedius*-Kultur der Datenbank (BAD13763). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäure- austausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 62

Abb. 25: Typische Amplikons der Leukotoxin-kodierenden Gene *lukS* (500Bp) und *lukF* (570Bp) bei fünf SIG-Kulturen (1, 2, 3, 4, 5); *lukS/lukF*-negative SIG-Kulturen (6, 7); M=siehe Abb. 9. 63

Abb. 26: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *purB* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM950282) mit der *purB*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AB036769). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 64

Abb. 27: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz der Adenylsuccinatlyase der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung CAQ034 mit der Adenylsuccinatlyase-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (BAA99412). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 65

Abb. 28: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *chp* der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (AM943061) mit der *chp*-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AF285146). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 66

Abb. 29: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von CHIPS der SIG-Kultur 4191 der vorliegenden Untersuchung (CAQ06479) mit der CHIPS-Sequenz einer *S. aureus*-Kultur der Datenbank (AAQ14339). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäure- austausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 67

Abb. 30: Multiplex-PCR des *mecA*- (ca. 530 Bp) bzw. *blaZ*- (ca. 170 Bp) Resistenzgens bei zwei SIG-Kulturen (1, 2); *blaZ*-positive SIG-Kultur (3); *mecA*- und *blaZ*- positiver *S. aureus*-Referenzstamm 1150/93 (4); M=siehe Abb. 8. 68

Abb. 31: Makrorestriktionsanalyse von fünf SIG-Kulturen (1-5) nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *ApaI*, M1=Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb); M2=Low Range PFGE Marker (0.1-200 Kb). 69

Abb. 32: Typische Amplikons eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts des Superoxid Dismutase A-kodierenden Gens *sodA* von *S. hyicus*-Kulturen, isoliert vom Schwein (1 bis 7); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. aureus* DSM 346 (8); M=siehe Abb. 8. 71

Abb. 33: Typische Amplikons eines *S. hyicus*-spezifischen Abschnitts der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“ Region (ISR) von *S. hyicus*-Kulturen, isoliert vom Schwein (1, 2); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. aureus* DSM 346 (3); M=siehe Abb. 8. 72

Abb. 34: Typische Amplikons der Exfoliativen Toxingene A, B, C und D von *S. hyicus*-Referenzstämmen: *S. hyicus* S3588 (exhA) (1); *S. hyicus* 1289D-88 (exhB) (2); *S. hyicus* 842A-88 (exhC) (3) und *S. hyicus* A2869C (exhD) (4) nach Einzel-PCR (1-4); Multiplex-PCR einer Toxingen-Kontrolle (5); M=siehe Abb. 8. 74

Abb. 35: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *exhC* der *S. hyicus*-Kultur 6407/01 der vorliegenden Untersuchung mit der *exhC*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AF515455). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert. 76

Abb. 36: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von ExhC der *S. hyicus*-Kultur 6407/01 der vorliegenden Untersuchung mit der ExhC-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AAN32972). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert. 77

Abb. 37: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *exhD* der *S. hyicus*-Kultur 2300/79 (AM946621), isoliert in Deutschland, der *S. hyicus*-Kultur P11 (AM950188), isoliert in Russland, der vorliegenden Untersuchung mit der *exhD*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AF515456). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 79

Abb. 38: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von ExhD der *S. hyicus*-Kultur 2300/79 (CAQ18972), isoliert in Deutschland, der *S. hyicus*-Kultur P11 (CAQ34815), isoliert in Russland, der vorliegenden Untersuchung mit der ExhD-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AAN32973). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 79

Abb. 39: Vergleichende Betrachtung der aus der Datenbank entnommenen Aminosäuresequenzen der Exfoliativen Toxine A, B, C und D von *S. hyicus* mit Aminosäuresequenzen von zwei ExhD- bzw. einer ExhC-positiven Kultur der vorliegenden Untersuchungen. Die für das aktive Zentrum der Serinproteasen bedeutsamen Aminosäuren His 115 (H), Asp 164 (D) und Ser 219 (S) sind hervorgehoben. Bei ExhD ist Asp 164 (D) ausgetauscht durch Glu (E). 80

Abb. 40: Typische Amplikons von *sheta* von drei *S. hyicus*-Kulturen (1, 2, 3); *sheta*-negative *S. hyicus*-Kulturen (4, 5); M=siehe Abb. 9. 82

Abb. 41: Vergleich von einem Teil der Gensequenz von *sheta* der *S. hyicus*-Kultur S3588 (AM901042) der vorliegenden Untersuchung mit der *sheta*-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (AB036768). Die Übereinstimmungen sind mit * markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 84

Abb. 42: Vergleich von einem Teil der Aminosäuresequenz von SHETA der *S. hyicus*-Kultur S3588 (CAP15933) der vorliegenden Untersuchung mit der SHETA-Sequenz einer *S. hyicus*-Kultur der Datenbank (BAB08178). Die Übereinstimmungen sind mit *, konservative Aminosäureaustausche mit ; markiert, Unterschiede sind hervorgehoben. 84

Abb. 43: Dendrogrammanalyse der bislang bekannten und der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Exfoliativen Toxingene innerhalb der Gattung *Staphylococcus*. Die in den vorliegenden Untersuchungen sequenzierten Toxingene sind hervorgehoben. 86

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. C. Lämmler danke ich herzlich für sein nicht ermüdendes Interesse, für seine stets gewährte Unterstützung, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hilfen bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die sorgfältige und rasche Durchsicht des Manuskript.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. R. Weiß für die überaus freundliche Hilfsbereitschaft.

Im weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. J. Alber für die Einführung in molekularbiologische Techniken, für seine hilfreichen Vorschläge, seine Geduld und freundschaftliche Anteilnahme an meinen Studien. Herrn Prof. Dr. E. Petzinger danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. M. Zschöck und Herrn Prof. Dr. E. Domann.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern, meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Republik Syrien bedanken, die mir durch die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums die Durchführung und erfolgreiche Beendigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mich während des Entstehens dieser Arbeit immer wieder ermutigt und unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5426-6

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 178383 519342 8 1

