

**Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher  
Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Kulturen,  
isoliert von Rindermastitiden**

**NAWARA M. B. EISSA**

نواره محمد بالقاسم عيسى

**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 2007

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.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. C. Lämmler

und der

Abteilung Veterinärmedizin  
des Landesbetriebes Hessisches Landeslabor in Gießen

Betreuer: Dr. M. Zschöck

**Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher  
Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Kulturen,  
isoliert von Rindermastitiden**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Nawara M. B. Eissa**

Tierärztin aus Gernada-Libyen

Gießen 2007

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. C. Lämmler

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Tag der Disputation: 26.10.2007

إلى روح والديَّ رحمهما الله

وإلى أبنائي

Zum Andenken an meine verstorbenen Eltern

und meinen Söhnen

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.“

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>		<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>2</b>
2.1	Euterentzündungen bei Rindern.....	2
2.1.1	Ursachen für Euterentzündungen.....	3
2.1.2	Klinisches Bild und Verlauf.....	4
2.1.2.1	Akute Euterentzündungen.....	4
2.1.2.2	Chronische und subklinische Euterentzündungen.....	4
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> als Mastitiserreger des Rindes.....	5
2.2.1	Morphologie.....	6
2.2.2	Selektivnährmedien.....	7
2.2.3	Epidemiologie.....	7
2.3	Mutmaßliche Virulenzfaktoren.....	8
2.3.1	Extrazelluläre Enzyme.....	10
2.3.1.1	Thermonuklease.....	10
2.3.1.2	Koagulase.....	10
2.3.2	Protein A.....	11
2.3.3.1	Clumping factor.....	13
2.3.3.2	Fibronektin-bindendes Protein.....	14
2.3.3.3	Kollagen-bindendes Protein.....	16
2.3.4	Elastin-bindendes Protein.....	17
2.3.5	Mikrokapsel-Gene.....	17
2.3.6	Hämolysine.....	19
2.3.6.1	Alpha-Toxin.....	19
2.3.6.2	Beta-Toxin.....	20
2.3.7	Enterotoxin.....	21
2.3.8	Superantigen-like-Protein.....	28
2.3.9	Toxic-Shock-Syndrome-Toxin-1.....	29
2.3.10	Exfoliative Toxine.....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
3.1	Bakterienkulturen.....	33
3.1.1	Feldisolate.....	33

---

3.1.2	Referenzstämme.....	36
3.2	Anzüchtungsmedien und Konservierung der Kulturen.....	36
3.2.1	Anzüchtungsmedien.....	36
3.2.2	Konservierung der <i>S. aureus</i> -Isolate.....	37
3.3	Identifizierung der ausgewählten <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	38
3.3.1	Phänotypische Identifizierung.....	38
3.3.1.1	Hämolyseformen.....	38
3.3.1.2	Wachstum auf Baird-Parker-Agar.....	39
3.3.1.3	Nachweis der Koagulasereaktion.....	39
3.3.1.4	Nachweis des Clumping-Faktors.....	40
3.3.1.5	Identifizierung mittels MASTASTAPH-Kit.....	40
3.3.1.6	Weitere Enzymnachweise.....	41
3.3.1.6.1	DNase.....	41
3.3.1.6.2	Hyaluronidase.....	41
3.3.2	Biotypisierung.....	42
3.3.2.1	Nachweis der Koagulation von bovinem Plasma.....	42
3.3.2.2	Wachstum auf Kristallviolett-Agar.....	42
3.4	Auswahl der <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	43
3.4.1	Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese.....	43
3.4.1.1	Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA.....	43
3.4.1.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	44
3.4.1.3	Ethidiumbromidfärbung.....	45
3.4.1.4	Auswertung der PFGE-Muster.....	45
3.4.2	Molekularbiologische Identifizierung und weitergehende Untersuchung.....	45
3.4.2.1	Präparation der bakteriellen DNA.....	45
3.4.2.1.1	Vereinfachte Präparation der bakteriellen DNA.....	45
3.4.2.1.2	DNA-Präparation mit dem Qiagen Tissue Kit.....	46
3.4.2.2	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
3.4.2.2.1	Oligonukleotidprimer.....	47
3.4.2.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	47
3.4.2.2.3	Ethidiumbromidfärbung.....	48
3.4.2.3	Koagulase-Gen-Polymorphismus.....	48

---

3.4.2.4	Nachweis von Enterotoxingenen und weiteren Superantigen-kodierenden Genen mittels „Multiplex-PCR“.....	48
3.5	Analyse der mRNA-Expression mittels Reverser Transkriptions-PCR.....	55
3.5.1	Präparation der bakteriellen Gesamt-RNA.....	55
3.5.2	Durchführung der Reversen Transkriptions-PCR.....	56
3.6	Statistische Auswertung.....	57
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>59</b>
4.1	<i>S. aureus</i> -Identifizierung.....	59
4.1.1	Koagulaseaktivität.....	59
4.1.2	Nachweis des Thermonuklease-Gens ( <i>nuc</i> ).....	59
4.1.3	Nachweis des Koagulase- ( <i>coa</i> ) und des Protein A-Gens ( <i>spa</i> ).....	60
4.2	Phänotypische Hämolyse.....	60
4.3	Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse.....	60
4.4	Ergebnisse der Untersuchung des Koagulase-Gen-Polymorphismus.....	63
4.5	Ergebnisse der Untersuchung des Protein A-Gen-Polymorphismus.....	66
4.6	Zusammenfassung der Genotypisierung.....	68
4.7	Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung.....	71
4.7.1	Hämolyseformen.....	71
4.7.2	Wachstum auf Baird-Parker-Agar.....	71
4.7.3	Clumping Faktor.....	72
4.7.4	Untersuchung mittels MASTASTAPH-Testkit.....	72
4.7.5	DNase.....	72
4.7.6	Hyaluronidase.....	72
4.8	Biotypisierung.....	73
4.9	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Gene bzw. Genabschnitte mittels PCR.....	74
4.9.1	Nachweis des <i>S. aureus</i> -spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens.....	74
4.9.2	Nachweis des Clumping-Factor-Gens.....	75
4.10	Nachweis von mutmaßlichen Virulenzfaktorgenen.....	76

---

4.10.1	IgG-bindende-Region kodierender Teil des Protein A-Gens <i>spa</i> .....	76
4.10.2	Second IgG-binding Protein.....	77
4.10.3	Anheftungsfaktoren kodierende Gene.....	77
4.10.3.1	Fibronectin-bindendes Protein A und B.....	78
4.10.3.2	Kollagen-bindendes Protein.....	79
4.11	Elastin-bindendes Protein.....	82
4.12	Ergebnisse der Untersuchung auf Mikro kapsel-Gene.....	83
4.13	Hämolysin-Gene.....	85
4.14	Leukotoxin ( <i>luk E/D</i> ).....	89
4.15	Ergebnisse des Nachweises von Enterotoxin-Genen.....	90
4.15.1	Nachweis der Enterotoxin-Gene <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sed</i> und <i>see</i> .....	90
4.15.2	Nachweis der Enterotoxingene <i>sec</i> und <i>tst</i> .....	93
4.15.3	Nachweis der Enterotoxine <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> und des 16S rDNA-Gens.....	95
4.15.4	Nachweis der Enterotoxingene <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> und des Superantigen-like-Protein kodierenden Gens <i>ss/7</i> .....	99
4.16	Nachweis der Gene der Exfoliativen Toxine.....	105
4.17	Ergebnisse der explorativen statistischen Auswertung.....	106
4.18	Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR.....	108
4.19	Ergebnisse des genotypischen Nachweises von Resistenzdeterminanten.....	113
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>115</b>
5.1	<i>S. aureus</i> -Identifizierung.....	115
5.2	Hämolysenachweis.....	116
5.3	Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA.....	117
5.4	Weiterführende Untersuchung ausgewählter <i>S. aureus</i> -Stämme.....	121
5.4.1	Phänotypische Charakterisierung ausgewählter <i>S. aureus</i> -Isolate.....	121
5.4.2	Biotypisierung.....	123
5.4.3	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Gene mittels PCR.....	123
5.4.4	Nachweis von mutmaßlichen Virulenzfaktorgenen mittels PCR.....	124
5.5	Reverse Transkriptions-PCR.....	131
5.6	Antibiotische Resistenzgene.....	132

---

5.7	Beurteilung der phänotypischen und genotypischen Marker.....	134
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>181</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>182</b>

**TABELLENVERZEICHNIS**

<u>Tab. 1:</u>	Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer, und Thermocyclerprogramme, der erwarteten Amplikongrößen sowie der Referenzliteratur.....	52
<u>Tab. 2:</u>	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der RT-PCR.....	56
<u>Tab. 3:</u>	Größe und Häufigkeit der Amplifikate bzw. der Restriktionsfragmente der Koagulase-Gen-PCR.....	64
<u>Tab. 4:</u>	Häufigkeit der ermittelten Protein A-Typen.....	67
<u>Tab. 5:</u>	Beziehung zwischen Genotyp und Herkunft der <i>S. aureus</i> -Isolate..	69
<u>Tab. 6:</u>	Zusammenfassende Darstellung der 61 <i>S. aureus</i> -Typen .....	70
<u>Tab. 7:</u>	Hämolysenformen der 76 untersuchten <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	71
<u>Tab. 8:</u>	Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der ausgewählten <i>S. aureus</i> -Isolate (n = 76).....	72
<u>Tab. 9:</u>	Merkmale der ermittelten sieben Biotypen.....	73
<u>Tab. 10:</u>	Statistische Korrelation von epidemiologischem Verhalten, Hämolysenverhalten und Biotyp der 76 <i>S. aureus</i> -Isolate mit dem Nachweis verschiedener Anheftungsfaktor-Gene...81	
<u>Tab. 11:</u>	Statistische Korrelation zwischen durchschnittlicher Zellzahl (Betrieb, Viertel), durchschnittlicher Anzahl an Repeats ( <i>coa</i> , <i>spa</i> ) und dem Nachweis verschiedener Anheftungsfaktor-Gene.....	81
<u>Tab. 12:</u>	Statistische Korrelation zwischen epidemiologischem Verhalten, Hämolysenverhalten, Biotypisierung und dem Nachweis der Kapselgene <i>cap5</i> und <i>cap8</i> .....	84
<u>Tab. 13:</u>	Statistische Korrelation zwischen durchschnittlicher Zellzahl (Betrieb, Viertel), durchschnittlicher Anzahl an Repeats ( <i>coa</i> , <i>spa</i> ) und dem Kapselgen-Nachweis <i>cap5</i> und <i>cap8</i> .....	85
<u>Tab. 14:</u>	Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Hämolysin-Gene, dem epidemiologischen Verhalten, der Hämolysen und dem Biotyp.....	88
<u>Tab. 15:</u>	Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Hämolysin-Gene und der durchschnittlichen Zellzahl (Betrieb/Viertel) bzw. der durchschnittlichen Anzahl von Repeats ( <i>coa/spa</i> ).....	88

---

<u>Tab. 16:</u>	Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Enterotoxin- und weiterer Toxin-Gene, dem epidemiologischen Verhalten, dem Hämolyseverhalten und dem Biotyp.....	102
<u>Tab. 17a, b:</u>	Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Enterotoxin- und weiterer Toxin-Gene und der durchschnittlichen Zellzahl (Betrieb/Viertel) bzw. der durchschnittlichen Anzahl von Repeats ( <i>coa/spa</i> ).....	104
<u>Tab. 18:</u>	Vergleich von PCR- und RT-PCR-Ergebnissen zum Nachweis der Gene <i>sec</i> , <i>tst</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>fnbA</i> , und <i>luk E/D</i> .....	112
<u>Tab. 19:</u>	Nachweis der Resistenzgene <i>mecA</i> und <i>blaZ</i> bei den verschiedenen epidemiologischen Gruppen.....	113
<u>Tab. 20:</u>	Schema zur Beurteilung von PFGE-Gelen nach TENOVER et al. (1995).....	119

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>Seite</b>
<u>Abb. 1:</u> Vorauswahl der 76 untersuchten <i>S. aureus</i> -Feldisolate und weiterführende Untersuchungen.....	35
<u>Abb. 2:</u> Typisches Amplikon des <i>nuc</i> -Gens.....	59
<u>Abb. 3:</u> Makrorestriktionsanalyse von 9 <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb Nr. 23.....	61
<u>Abb. 4:</u> Makrorestriktionsanalyse von sieben <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb Nr. 29.....	62
<u>Abb. 5:</u> Typische Amplikons des Koagulase-Gens <i>coa</i> von 10 <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	65
<u>Abb. 6:</u> Fragmente der Koagulase-Gen-Amplifikate von sechs Isolaten aus Betrieb Nr. 5 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym <i>AluI</i> .....	65
<u>Abb. 7:</u> Fragmente von acht Koagulase-Gen-Amplifikaten aus Betrieb Nr. 18 nach Restriktionsverdau mit <i>AluI</i> .....	66
<u>Abb. 8:</u> Typische Amplikons des die X-Region kodierenden Teils des Protein A-Gens <i>spa</i> von 11 <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	67
<u>Abb. 9:</u> Typisches Amplikon des <i>S. aureus</i> -spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens.....	74
<u>Abb. 10:</u> Amplikons des Clumping-Factor-Gens.....	75
<u>Abb. 11:</u> Typische Amplikons des die IgG-bindende Region kodierenden Teils des Protein A-Gens <i>spa</i> von fünf <i>S. aureus</i> -Isolaten (Feldisolate)...	76
<u>Abb. 12:</u> Typisches Amplikon des <i>sbi</i> -Gens von vier <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	77
<u>Abb. 13:</u> Amplikons des FnBp-kodierenden Gens <i>fnbA</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	78
<u>Abb. 14:</u> Amplikons des FnBp-kodierenden Gens <i>fnbB</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	79
<u>Abb. 15:</u> Typische Amplikons des Abschnitts A des CNA-kodierenden Gens <i>cnaA</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	80
<u>Abb. 16:</u> Typische Amplikons des Abschnitts B des CNA-kodierenden Gens <i>cnaB</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	80
<u>Abb. 17:</u> Typische Amplikons des Gens <i>ebpS</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	82
<u>Abb. 18:</u> Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 5-kodierenden Gens <i>cap5</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	83
<u>Abb. 19:</u> Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 8-kodierenden	

---

Gens <i>cap8</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	84
<u>Abb. 20:</u> Typische Amplikons des Gens <i>hla</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	86
<u>Abb. 21:</u> Typische Amplikons des Gens <i>hlb</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	86
<u>Abb. 22:</u> Typische Amplikons des Gens <i>hld</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	87
<u>Abb. 23:</u> Amplifikate des Gens <i>hlg</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	87
<u>Abb. 24:</u> Ergebnisse der Amplifizierung des <i>luk</i> E/D Gens von vier <i>S. aureus</i> -Isolaten.....	89
<u>Abb. 25:</u> „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sed</i> und <i>see</i> .....	91
<u>Abb. 26:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin D-kodierenden Gens <i>sed</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	92
<u>Abb. 27:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin E-kodierenden Gens <i>see</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	92
<u>Abb. 28:</u> „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene <i>sec</i> und <i>tst</i> .....	93
<u>Abb. 29:</u> Typische Amplikons des <i>sec</i> -Gens von zwei „epidemischen“ <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	94
<u>Abb. 30:</u> Typische Amplikons des <i>tst</i> -Gens von zwei „sporadischen“ <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	94
<u>Abb. 31:</u> „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> und des 16S rDNA-Gens von <i>S. aureus</i> .....	96
<u>Abb. 32:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin H-kodierenden Gens <i>seh</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	97
<u>Abb. 33:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin G-kodierenden Gens <i>seg</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	97
<u>Abb. 34:</u> Typische Amplikons des Gens <i>sei</i> von zwei „epidemischen“ <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	98
<u>Abb. 35:</u> Typische Amplikons des Gens <i>sej</i> von zwei „epidemischen“ <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	98
<u>Abb. 36:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin M-Gens <i>sem</i> von drei <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	100
<u>Abb. 37:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin N-Gens <i>sen</i> von drei <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	100
<u>Abb. 38:</u> Typische Amplikons des Enterotoxin O-Gens <i>seo</i> von zwei <i>S. aureus</i> -Feldisolaten.....	101
<u>Abb. 39:</u> Typische Amplikons des Superantigen-like-Protein kodierenden	

---

Gens <i>ss7</i> einiger <i>S. aureus</i> -Feldisolate.....	101
<u>Abb. 40:</u> Amplikons der Exfoliativen Toxin-Gene <i>eta</i> und <i>etb</i> von <i>S. aureus</i> 114/98.....	105
<u>Abb. 41:</u> Typisches Ergebnis der PCR mit den Oligonucleotidprimern <i>nucA-1</i> und <i>nucA-2</i> zur Kontrolle der DNA-Kontamination nach der RNA-Extraktion ohne RT-Schritt.....	108
<u>Abb. 42:</u> Typische Amplikons der transkribierten <i>sec-</i> , <i>tst-</i> , <i>seg-</i> und <i>sei-</i> Gene von <i>S. aureus</i> -Referenzstämmen mittels RT-PCR.....	109
<u>Abb. 43:</u> Typische Amplikons der transkribierten <i>sem-</i> , <i>sen-</i> und <i>seo-</i> Gene eines <i>S. aureus</i> -Referenzstammes mittels RT-PCR.....	110
<u>Abb. 44:</u> Typisches Amplikon des transkribierten <i>fnbA</i> -Gens des <i>S. aureus</i> -Referenzstammes ATCC 25923 mittels RT-PCR.....	111
<u>Abb. 45:</u> Typisches Amplikon des transkribierten Leukotoxin E/D-Gens des <i>S. aureus</i> -Referenzstammes ATCC 25923 mittels RT-PCR.....	111
<u>Abb. 46:</u> Typische Amplikons des <i>blaZ</i> -Gens.....	114
<u>Abb. 47:</u> Typisches Amplikon des <i>mecA</i> -Gens.....	114
<u>Abb. 48:</u> Schema zu Funktionsweise der PFGE (CHEF-System) nach LAI et al. (1989).....	118

---

**Liste der Abkürzungen oder Einheiten**

Abb.	Abbildung
Aqua dest	Aqua destillata
BHI	Brain-Heart-Infusion
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>cap</i>	Polysaccharidkapsel-kodierendes Gen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CF	Clumping-Factor
<i>clf</i>	Clf-kodierendes Gen
<i>cna</i>	CNA-kodierendes Gen
CNA	Kollagen-bindendes Protein
<i>coa</i>	Koagulase-kodierendes Gen
d.h.	das heißt
DA	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EbpS	Elastin-binding-Protein
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
<i>eta</i> und <i>etb</i>	Epidermolytische Staphylokokkentoxine A und B-kodierende Gene
<i>Fnb</i>	FnBP-kodierendes Gen
FnBp	Fibronectin-bindendes Protein
g	Gramm
h	hora (Stunde)
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
Kb	1000 Basen
kDa	1000 Da

---

l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mmol/l	Millimol pro Liter
Mol	Absolute Menge einer Substanz
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
<i>nuc</i>	Thermonuklease-kodierendes Gen
Ø	Durchschnitt
p	pico ( $10^{-12}$ )
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PT	Pyrogenes Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	Staphylokokkenenterotoxine
<i>sea bis seq</i>	Staphylokokkenenterotoxin A bis Q-kodierende Gene
<i>spa</i>	Protein A-kodierendes Gen
<i>ssI7</i>	SSL-kodierendes Gen
SSL	Staphylokokken-Superantigen-like-Protein
Tab.	Tabelle
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Toxic-Shock-Syndrom
TSST	Toxic-Shock-Syndrom Toxin
<i>tst</i>	TSST-kodierendes Gen
U	Unit (Internationale Einheit)

---

usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	weight/volume
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
z.B.	zum Beispiel
ZZ	Zellzahl
%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
≤	kleiner als oder gleich
≥	größer als oder gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
0,5 x	halbkonzentriert
10 x	zehnfach konzentriert



## 1 EINLEITUNG

*Staphylococcus (S.) aureus* ist weltweit eine häufige Ursache unterschiedlichster Erkrankungen bei Mensch und Tier.

Beim Rind hat *S. aureus* als Erreger sowohl klinischer als auch subklinischer Mastitiden eine herausragende Bedeutung. Die Mastitis des Rindes zählt zu den ökonomisch wichtigsten Rinderkrankheiten, und *S. aureus* ist der am häufigsten nachgewiesene Erreger. Bezüglich seiner Epidemiologie wird *S. aureus* zu den sogenannten kontagiösen Mastitiserregern gezählt. Das natürliche Reservoir ist das infizierte Rindereuter, und die Übertragung findet überwiegend durch kontaminierte Melkgerätschaften während des Melkaktes statt.

Neuere Befunde konnten jedoch bei einzelnen *S. aureus*-Stämmen ein abweichendes epidemiologisches Verhalten belegen. Unabhängig von den hygienischen Rahmenbedingungen verhalten sich einzelne Stämme wie umweltassoziierte Mastitiserreger, das heißt sie zeigen eine vergleichsweise geringe Kontagiosität und breiten sich entsprechend nicht oder nur sehr langsam innerhalb des betroffenen Bestandes aus (SOMMERHÄUSER, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit sich diese Unterschiede im epidemiologischen Verhalten einzelner *S. aureus*-Stämme in der Ausstattung mit verschiedenen Virulenzgenen dieser Stämme widerspiegeln. Auch sollte untersucht werden, ob sich genotypische oder phänotypische Merkmale finden lassen, die eine Voraussage über Klinik und Epidemiologie ermöglichen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Euterentzündungen bei Rindern

Die bovine Milchdrüse besteht aus einem lobulär-duktalem Netzwerk von Parenchymzellen (epitheliale und myoepitheliale Zellen bzw. Vorläufer- oder Stammzellen) sowie einem Stroma aus fibrösem und elastischem Bindegewebe (DEGO et al., 2002).

Das Milchdrüsenepithel unterliegt dynamischen Veränderungen, die mit der Sekretion von Milch und verschiedenen Proteinen sowie nicht-Protein-Substanzen verbunden sind. Diese sekretorische Aktivität kann sich, in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad, von Zelle zu Zelle im gleichen Viertel unterscheiden.

Für die Milchkuh ist die Mastitis weltweit eine der wichtigsten Erkrankungen mit bedeutenden ökonomischen Konsequenzen für den Landwirt. Sie führt zu Milchverlust, geringerer Milchproduktion, erhöhten Abgangsraten und zu einer schlechteren Bezahlung infolge erhöhter somatischer Zellzahlen (SMITH und HOGAN, 1993). Die Milchdrüse kann zu jedem Zeitpunkt während der Laktation und sogar noch vor der ersten Laktation infiziert werden (OLIVER und MITCHELL, 1983). Dabei handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung. Als Mastitis wird die Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden Gewebeanteile angesehen. Diese Entzündung kann sich in einem akuten oder in einem chronischen Verlaufsstadium befinden. Ihre Symptome können klinisch manifest, d.h. durch Sinnesprüfung feststellbar oder subklinisch, d.h. nur durch labordiagnostische Untersuchungen der Milch feststellbar sein (WENDT et al., 1994).

Die bovine Mastitis ist eine Entzündung der Milchdrüse, die durch eine somatische Zellzahl von in der Regel über  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml Milch gekennzeichnet ist (DEGO et al., 2002). Die somatische Zellzahl von Milch aus gesunden Eutervierteln liegt meistens unter  $10^5$  Zellen pro ml Milch. Nach experimenteller intramammärer Inokulation von *S. aureus* steigt der somatische Zellgehalt nach 1 bis 3 h und kann innerhalb von 24 bis 48 h Zellzahlen von mehreren Millionen Zellen pro ml erreichen (SUTRA und POUTREL, 1994).

Der Zellgehalt der Milch ist daher ein wichtiges Kriterium zur Erkennung insbesondere von subklinischen Mastitiden. Die Zellen in der Milch sind zum größten

Teil polymorphkernige Leukozyten, außerdem Lymphozyten und Makrophagen. Daneben befinden sich nicht differenzierbare Zellen oder Zelltrümmer in der Milch (MIELKE und MICHEL, 1994).

In den letzten Jahren haben Verfahren zur Kontrolle der Mastitis geführt, die auf hygienischen Maßnahmen während des Melkens, kombiniert mit einer systematischen antibiotischen Behandlung der Kuh in der Trockenstehzeit basieren. Da der häufigste Übertragungsweg im Übergang der Erreger von einer infizierten auf eine nicht-infizierte Milchdrüse, aus Vektoren wie Melkzeug, Eutertücher oder die Hände des Melkers, besteht (ROBERSON et al., 1998), kommt den hygienischen Maßnahmen während des Melkens eine besondere Bedeutung zu.

Viele Faktoren, wie Gravidität und Laktationsstadium (ZADOKS et al., 2000), Zitzenverletzungen, Rasse und Jahreszeit (DEGO et al., 2002) beeinflussen ebenso das Entstehen einer Mastitis.

### **2.1.1 Ursachen für Euterentzündungen**

Eine Entzündung der Milchdrüse kann auch durch chemische, physikalische und traumatische Faktoren, d.h. ohne Einwirkung infektiöser Agentien hervorgerufen werden. Nach WENDT et al. (1994) weisen subklinische oder klinische Mastitiden ohne Erregernachweis ein Vorkommen von 15 bis 20%, in Ausnahmefällen von 50 bis 80% auf. Diese subklinischen und klinischen Euterentzündungen ohne Erregernachweis werden durch einen Komplex von Faktoren verursacht, die die Milchdrüse direkt oder indirekt schädigen (WEISS, 1988; SCHULZ, 1994; WENDT et al., 1994).

Nach COENEN (2000) sind allerdings mehr als 95% aller Euterentzündungen durch kontagiöse Erreger oder Umweltkeime verursacht, die zunächst als Kontamination am Zitzenende beginnen. Mikrobielle Krankheitserreger sind in den meisten Fällen Bakterien, seltener Pilze, Algen oder Viren (WENDT et al., 1994).

Verschiedene endogene Ursachen (z.B. herabgesetzte Körperabwehr) und exogene Faktoren (z.B. mangelhafte Haltungsbedingungen, übermäßiger Keimdruck) begünstigen die Entstehung von Mastitiden und können in der Summe zur Erkrankung führen.

Zu den wichtigsten Mastitiserregern zählen neben *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, nicht-spezifizierte Streptokokken, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, coliforme Keime, *Enterococcus sp.*, *Mannheimia sp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella sp.*, *Pseudomonas sp.*, Hefen, *Serratia marcescens*, *Proteus sp.* und auch Prototheken (DINGWELL et al., 2003).

## **2.1.2 Klinisches Bild und Verlauf**

### **2.1.2.1 Akute Euterentzündungen**

Die an akuter Mastitis erkrankten Euterviertel sind umfangsvermehrt und schmerzhaft, gerötet und vermehrt warm. Die Milch solcher Viertel ist in der Regel verändert: es finden sich Flocken, der Zellgehalt ist erhöht, die Milch ist salzig und der Geruch kann verändert sein. Häufig haben die erkrankten Tiere Fieber.

Eine akute entzündliche Reaktion ist entscheidend in der Abwehr des Wirtsgewebes gegen invasive pathogene Keime. Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, leisten den wichtigsten Beitrag zu diesem natürlichen Abwehrmechanismus und ihre Migration zum Infektionsort bzw. zur Eintrittspforte der Infektion bestimmt den Ausgang der Infektion (DEGO et al., 2002).

### **2.1.2.2 Chronische und subklinische Euterentzündungen**

Die chronische Euterentzündung kann der akuten Verlaufsform folgen oder von vornherein als schleichendes, klinisch zunächst wenig auffälliges Geschehen auftreten. Es ist ein Zustand, bei dem klinisch keine nachweisbare Entzündung am Euter vorliegt und grobsinnlich keine Abweichungen im Milchcharakter feststellbar sind. Chronische Euterentzündungen sind durch latent erhöhte Zellzahlen ohne äußerlich sichtbares Krankheitsbild gekennzeichnet (subklinische Mastitis). Oft findet in diesem Stadium keine Erregerausscheidung statt. Kommt es jedoch zum Ausbruch einer akuten Mastitis kann es zur Erregerausscheidung kommen. Meistens geht die subklinische Mastitis der klinischen Form voraus (AHLNER, 2004).

Eine Kuh mit bis zu 100000 Zellen pro ml Milch gilt als eutergesund, andererseits muss unter veränderten Bedingungen eine Kuh mit 300000 Zellen und mehr nicht zwangsläufig eine Mastitis haben (DEGO et al., 2002).

## 2.2 *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger des Rindes

Beim Haustier ist *S. aureus* hauptsächlich in intramammäre Infektionen (intramammary infections/IMI) der laktierenden Kuh involviert (SUTRA und POUTREL, 1994). Milch ist ein besonders geeignetes Medium für das Wachstum von *S. aureus*, da der Erreger Kasein hydrolysieren und Laktose fermentieren kann (DEGO et al., 2002).

Das infizierte Euterviertel scheint auch das wichtigste Reservoir für *S. aureus* zu sein. Die Übertragung zwischen den Kühen erfolgt gewöhnlich während des Melkens (TOLLERSRUD, 2000). Neben infizierten Eutervierteln sind Läsionen der Haut von Euter und Zitze ebenfalls wichtige Reservoirs (ROBERSON et al., 1998).

Wenn *S. aureus* die Zitzenöffnung kontaminiert hat, kann der Keim dort bis zu 18 Wochen persistieren, ohne in die Milchdrüse einzudringen (FROST et al., 1977). Der Erreger kann sich aber auch vermehren und in den Zitzenkanal entweder durch fortschreitende Besiedlung oder durch geänderte Druckverhältnisse im Euter - insbesondere gegen Ende des Melkens – eindringen (DEGO et al., 2002).

Die Staphylokokken-Mastitis verläuft häufig subklinisch, unterbrochen durch gelegentliches akutes Aufflackern der Infektion (BRÜCKLER et al., 1994). Bei der *S. aureus*-Mastitis handelt es sich um eine katarrhalisch-eitrige Mastitis und Galaktophoritis, die chronisch oder akut verläuft mit verschiedenen klinischen und pathologisch-anatomischen Bildern. Am häufigsten tritt die chronisch-katarrhalische Galaktophoritis und Mastitis auf, die oft subklinisch verläuft und besonders postpartal akut aufflackern kann.

Die *S. aureus*-Mastitis ist nach wie vor ein großes Problem in der Milchproduktion und die antibiotische Therapie ist nicht sehr effektiv (PYÖRÄLÄ et al., 1998).

### 2.2.1 Morphologie

Der Ausdruck „Staphylococcus“ stammt von dem griechischen Wort „staphyle“ (Bündel von Weintrauben) und beschreibt die charakteristische Anordnung im mikroskopischen Präparat: die Kokken mit einem Durchmesser von 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  liegen meistens in unregelmäßigen, traubenförmigen Haufen vor, aber auch einzeln, in Paaren oder kurzen Ketten. 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).

Bakterien benötigen zum Leben und zur Vermehrung eine geeignete Umgebung, in der Salze, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren enthalten sind. Ein bestimmter Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt und die richtige Temperatur muss ebenfalls vorhanden sein. *S. aureus* zeichnet sich durch ein schnelles aerobes oder anaerobes Wachstum auf einem breiten Spektrum von Nährmedien aus (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994). Der Keim stellt keine besonderen Wachstumsansprüche, so dass seine Anzucht auch auf einfachen Nährböden gelingt. Innerhalb von 12 bis 24 h wächst er in einer einfachen Bouillon unter Trübung und Bodensatzbildung. Außerdem wächst *S. aureus* unter aeroben Bedingungen schnell und üppig auf Blutagar bei 37 °C (BLOBEL und SCHLIESSER, 1994).

Auf festen Nährböden bilden sich mittelgroße, glatte, unregelmäßig goldgelbe und feucht glänzende, ca. 2-3 mm große Kolonien mit verschiedenen Hämolyseformen: *S. aureus* bildet 4 verschiedene Hämolsine (Toxine), die mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  bezeichnet werden.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxin scheinen eine Hauptrolle bei der Virulenz von *S. aureus* zu spielen;  $\alpha$ -Toxin wird von 20 bis 50% der Stämme (ELEK und LEVY, 1950),  $\beta$ -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  $\alpha$ -Hämolsin kommt hauptsächlich bei Staphylokokkenstämmen humaner Herkunft vor und verursacht eine breite vollständige Hämolyse. Das  $\beta$ -Hämolsin findet sich besonders bei bovinen Stämmen und verursacht bei 37 °C eine unvollständige Hämolyse. Das  $\delta$ -Hämolsin bewirkt eine schmale, scharf begrenzte, vollständige Hämolyse bei *S. aureus*, isoliert von Mensch und Tier (BISPING und AMTSBERG, 1988).

### 2.2.2 Selektivnährmedien

Zur Anzüchtung von *S. aureus* eignen sich auch Selektivmedien wie der Chapman-Agar und der Vogel-Johnson-Agar. Diese nutzen beispielsweise die Kochsalz- bzw. Telluritresistenz der Staphylokokken und zeigen auch die Mannitspaltung an. Natriumazid, Lithiumchlorid, Polymyxin und Neomycin sind weitere Zusätze für Selektivmedien, die zur Anzüchtung von *S. aureus* genutzt werden können (ROLLE und MAYR, 2002). Für die Isolierung von *S. aureus* aus kontaminiertem Material sind verschiedene feste und flüssige Selektivnährböden entwickelt worden, die meistens als Fertignährböden im Handel erhältlich sind. Dies sind z.B. Mannit-Kochsalz-Phenolrot-Agar und Eigelb-Tellurit-Glycin-Pyruvat-Agar (BISPING und AMTSBERG, 1988).

### 2.2.3 Epidemiologie

Aus dem Verständnis der Epidemiologie von *S. aureus*-Infektionen, d.h. in der Kenntnis über Reservoir, Übertragungswege und Risikofaktoren, besteht in vielen Herden eine gute Kontrolle dieses wichtigen Mastitiserregers. Der Durchbruch kam mit der Erkenntnis, dass der Erreger vor allem beim Melken von Kuh zu Kuh übertragen wird. Dies führte zur Einführung melkhygienischer Maßnahmen, die den Transfer von Kuh zu Kuh und die Neuinfektionsrate reduzierten. Die Melkhygiene allein ist allerdings für die Kontrolle der Erkrankung nicht ausreichend.

Der häufigste Übertragungsweg besteht im Transfer von einem infizierten Euterviertel zu einem nicht infizierten Viertel mittels Vektoren wie z.B. Melkzeug, Eutertücher oder die Hände des Melkers. Wenn die zuletzt gemolkene Kuh eine intramammäre Infektion mit *S. aureus* hat, wird die als nächstes gemolkene Kuh, wenn sie mit demselben Melkzeug gemolken wird, direkt *S. aureus*-belasteter Milch ausgesetzt.

Die Übertragungswege, die für Neuinfektionen mit *S. aureus* während der Trockenstehphase verantwortlich sind, sind - da beide Tiergruppen unter ähnlichen Umweltbedingungen leben - denjenigen von Färsen vor der ersten Abkalbung ähnlich. Als Quelle für *S. aureus*, der die Zitzenhaut von Färsen kolonisiert und eine intramammäre Infektion hervorruft, wurde unter anderem die Verfütterung von

Mastitis-Milch identifiziert, wenn die Färsen sich anschließend gegenseitig besaugen (BRÜCKLER et al, 1994).

*S. aureus* kann auch aerogen verbreitet werden. Der Erreger wurde aus der Luft in einem Melkstand sowohl vor als auch während des Melkens isoliert, allerdings nicht aus der Luft in der Stallumgebung. Weiterhin wurde *S. aureus* aus 5 Luftproben aus einer Scheune, in der zuchtfähige Färsen gehalten wurden, isoliert, sowie von einer Weide mit tragenden Färsen, aus einer Scheune mit Färsen kurz vor der Geburt und einer Kälberhütte (ROBERSON et al., 1998). *S. aureus* konnte auch von Stallgeräten, Instrumenten, aus Häusern, Wasser und Futtermitteln sowie von nicht-bovinen Tierarten isoliert werden (ROBERSON et al., 1998). In einer Herde mit exzellenter Kontrolle kontagiöser Mastitiserreger wurde der Ausbruch einer *S. aureus*-Infektion auf die Übertragung eines einzelnen Stammes zurückgeführt. Dieser Ausbruch konnte schließlich durch ein Programm mit strikter Melkhygiene, Intensivierung der präventiven Keulung von infizierten Kühen, Abtrennung von Kühen mit intramammärer Infektion in eine separate Abteilung und Melken dieser Kühe als letzte kontrolliert werden (SMITH et al., 1998).

Ausmerzungen sind häufig die Methode der Wahl für die Eliminierung chronisch infizierter Kühe (National Mastitis Council). Es gibt nur wenige Gründe dafür, Kühe mit kontinuierlich erhöhter Zellzahl, sporadisch aufflammenden Mastitiden und persistierenden Infektionen zu behalten. Diese Tiere können als Reservoir für Infektionen fungieren und andere Kühe während des Melkprozesses anstecken. Die Ausmerzungen chronisch infizierter Kühe sind einer der empfohlenen Eckpfeiler des ursprünglichen 5-Punkte-Mastitis-Kontrollprogramms und spielen immer noch eine wichtige Rolle bei vergleichbaren Programmen (SMITH et al., 1998).

### 2.3 Mutmaßliche Virulenzfaktoren

*S. aureus* besitzt 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 Toxinen, Enzymen und Oberflächenproteinen (DEGO et al., 2002; PEACOCK et al., 2002).

Bei euterpathogenen *S. aureus* wurden folgende Virulenzfaktoren und Mechanismen beschrieben:

- 1.) Die Produktion von "antiphagozytierenden Faktoren" (Protein A und Kapselbildung; DEGO et al., 2002)
- 2.) Die Adhäsion an Epithelzellen der Milchdrüse (SHOSHANI et al., 2000)
- 3.) Das intrazelluläre Überleben in Makrophagen und Epithelzellen der Milchdrüse (ALMEIDA et al., 1996 und 1997)
- 4.) Die Produktion von Exotoxinen, bakteriellen Superantigenen und Proteasen (ANDERSON, 1976)

Auf der Grundlage ihrer biologischen Aktivitäten können nach DEGO et al. (2002) die Virulenzfaktoren in drei funktionelle Kategorien eingeteilt werden: solche, die die Adhäsion der Bakterien an Wirtszelle oder -gewebe unterstützen, solche, die die Zerstörung von Wirtsgewebe und die Verbreitung fördern und in der dritten Kategorie potentielle Virulenzfaktoren, die durch Umweltbedingungen reguliert werden.

Nach DINGES et al. (2000) produziert *S. aureus* verschiedene Exoproteine, die zu der Fähigkeit des Mikroorganismus beitragen, im Wirtssäugetier Krankheiten hervorzurufen. Diese Exotoxine umfassen Hämolysine, verschiedene Enzyme und eine Substanzgruppe, die verwandt ist mit pyrogenen Toxinen, insbesondere die Staphylokokken-Enterotoxine, das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin und die Exfoliativen Toxine.

Außerdem produziert *S. aureus* zahlreiche extrazelluläre Enzyme, wie Koagulase, Kollagenase, Proteasen, Nuklease, Elastase, Lipase, beta-Lactamase, Glycerolester-Hydrolase, Hyaluronat-Lyase, Thernonuklease, Enzyme zur Modifizierung von Fettsäuren und Staphylokinase, welche an der Pathogenese von Euterinfektionen und Infektionen des Menschen beteiligt sind. Einige dieser Enzyme erlauben es *S. aureus* Substrate der Milch für den eigenen Metabolismus zu verwenden. Allerdings sind die Beteiligung und spezifischen Effekte dieser Enzyme bei der bovinen intramammären Infektion durch *S. aureus* noch nicht geklärt (DEGO et al., 2002).

### 2.3.1 Extrazelluläre Enzyme

#### 2.3.1.1 Thermonuklease

Hitzeresistente Nukleasen (Thermonukleasen, TNase) werden regelmäßig von *S. aureus* gebildet und sind somit für diese Keime charakteristisch (BISPING und AMTSBERG, 2000). Eine extrazelluläre thermostabile Nuklease wird von 98 bis 100% der aus Milch isolierten Koagulase-positiven Staphylokokken produziert (STUMPF, 1988; MÜLLER, 1996), so dass ihr Nachweis als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokkenarten genutzt werden kann (KLOOS und SCHLEIFER, 1986).

Die TNase ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17000 Dalton. Es handelt sich um eine Endonuklease, die sowohl DNA als auch RNA spaltet. Die enzymatische Aktivität bleibt für mindestens 1 Stunde auch bei 100 °C erhalten (BRAKSTAD et al., 1992; MÜLLER, 1996).

Die TNase ist ein gut charakterisiertes Protein und ein enzymatischer Test für die TNase-Produktion wird in vielen Labors zur Identifizierung von *S. aureus*-Isolaten genutzt. Das kodierende Gen (*nuc*) wurde sequenziert (BRAKSTAD et al., 1992). Der Nachweis dieses für die spezifische TNase von *S. aureus* kodierenden-Gens ist durch molekularbiologische Methoden, wie z.B. PCR oder die DNA-Hybridisierung, möglich (MÜLLER, 1996).

#### 2.3.1.2 Koagulase

Die Koagulase ist ein bifunktionales Rezeptin mit der Fähigkeit, Fibrinogen über verschiedene C-terminale Repeats zu binden und Blut und Plasma verschiedener Säugetiere durch Umwandlung zu Fibrin zu verklumpen (BJERKETORP, 2004). Durch die Bindung des Prothrombins, des sogenannten „coagulase reacting factors“, entsteht das „Staphylothrombin“, ein proteolytisch wirkender Komplex, welcher eine Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinmolekül zur Folge hat und durch Polymerisation des Fibrinogens eine Koagulation des Plasmas bewirkt. Die Bildung von Fibrinklumpen dient dem Schutz der Staphylokokken vor den Abwehrmechanismen des Wirts, z. B. durch Phagozytose (BRÜCKLER et al., 1994).

Die Koagulasebildung ist ein wichtiges phänotypisches Identifizierungskriterium für *S. aureus* und hat auch Bedeutung für die Virulenz. Die meisten der aus dem Rindereuter isolierten *S. aureus*-Stämme koagulieren bovines Plasma (SUTRA und POUTREL, 1994).

BRÜCKLER et al. (1994) beschreiben die Koagulase als extrazelluläres Protein ohne Enzymcharakter mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 90000 Da und einem isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 4,5 und 5,85.

Die Koagulase kommt in acht verschiedenen Serovarietäten vor. Diese werden von verschiedenen Allelen des Koagulasegens kodiert (TAKESHIGE et al., 1983).

Das Gen *coa*, welches die Koagulase kodiert, wurde von GOH et al. (1992) sequenziert. Die Koagulase besteht am N-terminalen Ende aus einem die Prothrombin-bindende Region beinhaltenden und als „Chymotryptic“-43 kDa-Fragment bezeichneten Abschnitts. Das C-terminale Ende besitzt einen konstanten Anteil sowie eine variable Region, die für die Prothrombin-Bindung nicht benötigt zu werden scheint. Diese variable Region besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl sich wiederholender Einheiten (Repeats; KAIDA et al., 1989). Studien an *S. aureus*-Isolaten von Mensch und Tier haben gezeigt, dass, basierend auf der Anzahl an Repeats, diese Isolate in mehrere Subtypen klassifiziert werden können (GOH et al., 1992; FRÉNEY et al., 1994; VIMERCATI et al., 2006).

Die Bedeutung der Koagulase für die Virulenz von *S. aureus* wurde überwiegend durch die Injektion von gereinigter Koagulase in das Gesäuge von Mäusen geprüft. Dies führte zur Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und zur Hyperplasie von Alveolarepithelien (ANDERSON et al., 1982). Die Rolle der Koagulase bei der intramammären Infektion des Rindes ist bislang noch unklar.

### 2.3.2 Protein A

Protein A, eine erstmalig von JENSEN (1958) als Antigen A beschriebene Substanz, ist ein konstantes Merkmal von fast allen *S. aureus*-Isolaten und gilt als ein taxonomisches Merkmal dieser Bakterienart (MÜLLER et al., 1983). Protein A reagiert mit dem Fc-Stück von Immunglobulin(Ig)G (MÜLLER et al., 1983; GUSS et al., 1984) und bindet IgG-Moleküle somit umgekehrt, so dass die Opsonierung und Phagozytose unterbrochen wird.

Neuere Untersuchungen zeigen eine Interaktion zwischen Protein A und zellassozierten Proteinen von Endothelzellen und aktivierten Blutplättchen. Diese hochaffine Bindung kann entweder direkt oder über eine Fibrinogenbrücke erfolgen (PEERSCHKE et al., 2006).

Protein A ist an der Zellwand der meisten *S. aureus*-Stämme nachweisbar. Der Anteil positiver Isolate wird zwischen 58,6 und 100% angegeben (FORSGREN, 1970; BRÜCKLER et al., 1981; VARSHNEY et al., 1993; SLOBODNIKOVA et al., 1995). In der Milch gesunder Euterviertel ist die Konzentration von IgG, dem wichtigsten an der Opsonierung beteiligten Isotyp, sehr niedrig. Folglich spielt nach SUTRA und POUTREL (1994) Protein A wahrscheinlich für die Virulenz von *S. aureus* in den frühen Stadien der intramammären Infektion nur eine untergeordnete Rolle.

MÜLLER et al. (1983) untersuchten das Bindungsverhalten zwischen Protein A und IgG verschiedener Tierarten. Die Untersuchung anhand verschiedener humaner *S. aureus*-Isolate ergab, dass IgG von Mensch, Schwein, Pferd, Hund, Kaninchen und Meerschweinchen, nicht aber IgG von Vögeln und niederen Tierarten gebunden wurde.

Das chromosomal kodierte Protein besitzt eine einzelne Polypeptidkette, die aus 2 strukturell und funktionell verschiedenen Regionen besteht (GUSS et al., 1984). Nach UHLEN et al. (1984) findet sich am aminoterminalen Ende eine Signalsequenz, fünf IgG-bindende Einheiten (A, B, C, D und E) sowie die zellwandassoziierte X-Region. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die IgG-bindenden Domänen auch an andere Liganden binden, insbesondere an IgM der VH3-Subklasse, an den von Willebrand-Faktor, an den Komplement-Rezeptor gC1qR und an den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1 (HARTLEIB et al., 2000; NGUYEN et al., 2000; GOMEZ et al., 2004). Die X-Region setzt sich aus einer unterschiedlichen Zahl von Repeats und einem funktionell als Membrananker bezeichneten konstanten Anteil am C-terminalen Ende zusammen. Die Anzahl von Repeats in der X-Region scheint zwischen verschiedenen Stämmen von 3 bis 15 zu variieren (FRÉNAVY et al., 1994; FRÉNAVY et al., 1996).

## Second IgG-binding protein

Ein zweites IgG-bindendes Protein (**second IgG-binding protein, SBI**), welches aus 436 Aminosäuren besteht und ein Immunglobulin-Bindungsverhalten ähnlich dem von Protein A zeigt, wurde von ZHANG et al. (1998a) erstmals beschrieben. SBI bindet IgG und beta2-Glykoprotein und wird durch das Gen *sbi* kodiert, welches von ZHANG et al. (2000) und KARIN et al. (2003) bei *S. aureus*-Referenzstämmen nachgewiesen werden konnte.

Das Protein umfasst verschiedene spezifische Domänen: am N-terminalen Ende befinden sich 2 Domänen mit einer ähnlichen Sequenz wie bei den IgG-bindenden Domänen des Protein A. Ursprünglich wurde angenommen, dass nur eine dieser Domänen an IgG bindet, aber jüngste Untersuchungen lassen vermuten, dass beide am Fc-Stück mit hoher Affinität binden. Auf diese Protein A-ähnlichen Domänen folgt eine Domäne, die beta2-Glykoprotein-1 (Apolipoprotein H) bindet (ZHANG et al., 1999).

### 2.3.3.1 Clumping factor

Die Adhäsions-Mechanismen von *S. aureus* sind komplex und schließen zahlreiche Proteine ein, die fähig sind, spezifische Komponenten auf der Wirtszelloberfläche zu erkennen, welche ihrerseits adhäsive Matrixmoleküle enthalten und die Verankerung von Bakterien in normalem und entzündetem Gewebe ermöglichen.

Fast alle Koagulase-positiven Staphylokokken bilden den sogenannten Clumping factor (CF). Der CF reagiert direkt mit Fibrinogen ohne Vermittlung eines Plasmafaktors und führt zur Verklumpung von Staphylokokkenkolonien. Der Nachweis geschieht im Objektträger test, indem Staphylokokkenkolonien von festen Nährböden in unverdünntes Citratplasma vom Kaninchen eingerieben werden; im positiven Fall kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Verklumpung (BISPING und AMTSBERG, 1988; WENDT et al., 1994). Diese makroskopisch erkennbare Klumpenbildung beim Verreiben von *S. aureus*-Koloniematerial in Kaninchenplasma wird durch direkte Bindung der zellwandständigen Rezeptoren (Clumping factor) an Fibrinogen hervorgerufen (MÜLLER, 1996).

Dabei wird ein CF-A und ein CF-B unterschieden. Diese binden an verschiedenen Orten am Fibrinogen: CF-A bindet an der gamma-Untereinheit, während CF-B an die alpha-Kette des Fibrinogens bindet.

Von CF-A wird angenommen, dass es ein Faktor ist, der zur Kolonisierung von implantiertem Material oder beschädigten Endothelien führen kann. Das *cflA*-Gen wird *in vivo* exprimiert und wurde bei nahezu allen *S. aureus*-Isolaten des Menschen gefunden (DOMANSKI et al., 2005).

Die pathogene Bedeutung des CF während der Infektion wird damit begründet, daß durch die Bindung von Fibrinogen eine „Maskierung“ der Erreger stattfindet, was zu einer Beeinträchtigung der zellulären Abwehrmechanismen führt (MÜLLER, 1996). Laut MOREILLON et al. (1995) ist der CF an der Bakterienoberfläche lokalisiert und vermittelt direkt die Bindung an Fibrinogen oder Fibrin.

Über die Bedeutung des CF für die Virulenz von Feldisolaten aus bovinen Mastitiden liegen in der Literatur wenige Angaben vor. MATSUNAGA et al. (1993) konnten CF-positive *S. aureus*-Isolate vorwiegend aus chronischen Mastitiden und in geringerem Umfang auch aus akuten Mastitiden isolieren. Nach RÖDER (1985) gehen Mastitiden durch CF-negative *S. aureus*-Stämme mit niedrigeren Zellgehalten einher als Mastitiden durch CF-positive Stämme. LAEVENS et al. (1996) konnten einen CF-negativen *S. aureus*-Stamm in einer Herde über acht Monate verfolgen. Etwa ein Viertel der Herde war mit diesem Stamm infiziert. Die Viertelinfectionsrate lag im Verlauf des Beobachtungszeitraumes zwischen 7,5 und 17,7%. Mastitiden durch CF-positive *S. aureus*-Feldstämme wurden nicht beobachtet.

In der Literatur werden die Bezeichnungen „Koagulase“ (siehe [2.4.1.2](#)) und Clumping-factor, der Fibrinogen-bindenden Determinante an der Zelloberfläche von *S. aureus*, uneinheitlich verwendet. Sequenzanalysen der betreffenden Gene haben aber ergeben, dass die Koagulase und der CF unterschiedlich sind. Es gibt Mutanten von *S. aureus*, die keine Koagulase bilden, aber CF-Aktivität zeigen, während ebenso CF-negative Mutanten Koagulase exprimieren (TODAR, 2005).

### 2.3.3.2 Fibronectin-bindendes Protein

Fibronectin ist ein Glykoprotein, welches in einer löslichen Form im Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten und in einer unlöslichen Form im Gewebe vorkommt (MINHAS et al., 1995). Fibronectin-bindendes Protein A und B (FnbpA und

FnbPB) sind eng verwandte Proteine von *S. aureus*, die durch die Gene *fnbpA* und *fnbpB* kodiert werden. Etwa 680 Bp hinter dem Translationsstopcodon des *fnbpA*-Gens befindet sich nach JONSSON et al. (1991) ein zweites mit *fnbpB* bezeichnetes Gen, dessen Genprodukt ebenfalls fibronectinbindende Aktivität aufweist. Das offene Leseraster für *fnbpB* kodiert ein Protein von 940 Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich von FnbPA- und FnbPB zeigt eine 94 %ige Aminosäureidentität in den carboxyterminalen Bereichen, die für die Fibronectinbindung und die Verankerung in der Zellmembran von Bedeutung sind (JONSSON et al., 1991).

Die Internalisierung von *S. aureus* in Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten oder auch Drüsenzellen hängt unter anderem von der Fibronectin-vermittelten Bindung zwischen der Wirtszelle und FnbPA bzw. FnbPB an der Oberfläche der Staphylokokken ab (KATRI, 2004). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass *S. aureus* an humanen Endothelzellen haftet und mit Hilfe von Fibronectin in sie eindringt (DEGO et al., 2002). Eine weitere Absicherung dafür, dass FnbP für die Adhärenz und Invasion einen Beitrag leistet, wurde durch weitere *in vitro*-Studien erbracht, in denen demonstriert werden konnte, dass Adhärenz und Invasion in verschiedene Säugetierzellen reduziert werden konnte, wenn diese mit rekombinanten synthetischen Fragmenten der FnbP-Bindungsstelle von FnbPA von *S. aureus* vorbehandelt wurden (MENZIES et al., 2002). *FnbpA* oder *fnbpB*-defekte Mutanten zeigen keine signifikante Reduzierung ihrer Adhäsionsfähigkeit, wenn nur eines der beiden Gene fehlt, während Doppeldefektmutanten sich als unfähig zur Adhäsion erwiesen (GREENE et al., 1995).

Die meisten invasiven *S. aureus*-Stämme binden Fibronectin und die Zahl der gebundenen Fibronectin-Moleküle ist nach DZIEWANOWSKA et al. (1999) korreliert mit dem Umfang der Gewebsinvasivität. Verschiedene Studien haben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Rolle von bakteriellen Proteinen im Wirtsserum (inklusive des Fibronectins) bei der Vermittlung der Adhäsion von Staphylokokken erbracht (NAIDU et al., 1988; MINHAS et al., 1995). Lediglich Gene, die für Sialoproteinbindendes Protein des Knochens und FnbPB kodieren, waren signifikant häufiger vertreten bei hämatogener Osteomyelitis/Arthritis beziehungsweise Endocarditis valvularis, was den Verdacht nahe legt, dass sie bei hämatogenen Gewebsinfektionen eine Rolle spielen (TUNG et al., 2000; TRISTAN et al., 2003). Die Rolle von FnbP für die Virulenz von *S. aureus* bei der intramammären

Infektion ist noch nicht restlos geklärt (MIEDZOBRODZKI et al., 1989; SUTRA und POUTREL et al., 1994; DEGO et al., 2002).

### 2.3.3.3 Kollagen-bindendes Protein

Kollagen ist der Hauptbestandteil von Knorpel. Ein Kollagen-bindendes Protein (engl. Collagen = Cn, CnBP) wird in der Regel von Staphylokokken exprimiert (JOSEPH et al., 2004). Das Kollagen-bindende Protein CnBP ist das zweitwichtigste adhäsive Molekül von *S. aureus* und wird durch das Gen *cnb* codiert. *cnb* ist das einzige bekannte Gen, welches für ein Adhäsion codiert, das spezifisch an Kollagen bindet, und es ist das einzige Adhäsionsprotein-Gen, welches nicht bei nahezu allen *S. aureus*-Stämmen vorkommt. Es scheint allerdings von geringerer Bedeutung für die Adhäsion von *S. aureus* bei der bovinen Mastitis zu sein (PATTI et al., 1992; SMELTZER et al., 2000; BOOTH et al., 2001).

Einige Stämme von *S. aureus* binden Kollagen mit einem hohen Grad an Spezifität und Affinität. Die Fähigkeit von *S. aureus* an extrazellulärem Matrixprotein zu binden gilt als essentiell für die Besiedlung und Etablierung einer Infektion. Diese Interaktion ist möglicherweise ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Osteomyelitis und der infektiösen Arthritis. Der *S. aureus*-Stamm Cowan I bindet verschiedene Kollagene mit einer mäßigen Affinität (PATTI et al., 1992). In einer Tierversuchsstudie entwickelten alle Mäuse, die mit dem CnBP-positiven *S. aureus*-Stamm Phillips infiziert wurden, eine septische Arthritis, wohingegen nur 50% der Mäuse, die mit einer CnBP-defekten Mutante infiziert wurden, erkrankten (RYDING et al., 1997). Die Bindung von *S. aureus* an Fibronektin und Kollagen wird reduziert durch eine Vorbehandlung mit Trypsin, Pepsin und Proteinase K (DEGO et al., 1994).

Das *S. aureus*-Kollagen-Adhäsion kommt in mindestens 4 verschiedenen Formen vor, die sich in der Anzahl von B-Domänen (1, 2, 3 oder 4) - welche aus 187 Aminosäuren bestehen - unterscheiden (GILLASPY et al., 1997). Es werden nach den Angaben von PATTI et al. (1992) Genabschnitte unterschieden, die die Signal-Sequenz, den konstante Abschnitt mit einer Größe von 1700 Bp, die repetitiven Abschnitte mit einer Größe von 600 Bp je Repeat, sowie die Zellwanddomäne, Zellmembrandomäne und C-Domäne kodieren. Die repetitiven Abschnitte, bezeichnet als B-Domäne, können sich bis zu vier Mal wiederholen (SNODGRASS et al., 1999).

### 2.3.4 Elastin-bindendes Protein

Elastin ist ein Bindegewebsprotein, welches in der extrazellulären Matrix der meisten Gewebe von Wirbeltieren vorkommt. Die elastischen Fasern werden außerhalb der Zelle zusammengesetzt und umfassen Elastin und mikrofibrilläres Protein (PARKS, 1997). Es handelt sich um ein Faser-bildendes Protein, welches unlöslich und stark hydrophob ist (KATRI, 2004). Die wichtigste Aufgabe des Elastins ist es, Geweben und Organen die Eigenschaft der reversiblen Elastizität zu verleihen. Elastin und elastische Fasern sind deshalb in solchen Geweben von Säugetieren im Übermaß vorhanden, die elastisch sein müssen, um ihre strukturelle Integrität zu bewahren, und für deren Funktion eine reversible Ausdehnung und Deformierbarkeit erforderlich ist (SANDBERG et al., 1981). Daher ist die Expression von Elastin in der Lunge, der Haut und den Blutgefäßen am größten (PARK et al., 1996; JOSEPH et al., 2004).

Die Bindung von *S. aureus* an Elastin ist hochaffin, hoch spezifisch und reversibel (JOSEPH et al., 2004).

### 2.3.5 Mikrokapsel-Gene

Bei der Bakterienkapsel handelt es sich nach BJERKETORP (2004) um eine die Zellwand bedeckende Polysaccharid-Schicht.

KARAKAWA et al. (1988) berichteten, dass *S. aureus*-Kulturen vom Kapselserotyp 5 oder 8 antiphagozytäre Eigenschaften besaßen und der Phagozytose durch menschliche polymorphkernige Leukozyten besser widerstanden als unkapselte Kulturen. Dagegen konnten XU et al. (1992) keine wesentlichen Unterschiede in der Phagozytose mikrobekapselter und unkapselter *S. aureus*-Kulturen beobachten. Allerdings erschwert nach TODAR (2005) die Kapselbildung zum Beispiel auch die Kolonisierung von beschädigten Herzklappen durch Bakterien, möglicherweise durch die Maskierung von Adhäsinen.

Dass *S. aureus* eine Kapsel (CP) produziert, wurde erstmals von Gilbert 1931 beschrieben (RIORDAN et al., 2004). Durch Agglutination mit absorbierten

Kaninchen-Antiseren und Präzipitation konnten in der Doppel-Immundiffusion 11 CP-Serotypen unterschieden werden (POUTREL und SUTRA, 1993).

CP 5 und CP 8 scheinen die vorherrschenden Serotypen bei *S. aureus* isoliert vom Menschen, zu sein (POUTREL und SUTRA, 1993; HAN et al., 2000). Nach TOLLERSRUD et al. (2000) erwiesen sich die Ergebnisse über die Produktion einer Kapsel bei *S. aureus*-Stämmen von Wiederkäuern als unterschiedlich. Die Existenz einer Kapsel bei *S. aureus* aus intramammären Infektionen beim Rind ist nach SUTRA und POUTREL (1994) umstritten. SAU et al. (1997) isolierten hingegen bei *S. aureus*, isoliert aus bovinen intramammären Infektionen, 12 CP-Serotypen. Eine *in situ* Expression von CP 5 und CP 8 wurde sowohl bei Kühen mit einer experimentellen *S. aureus*-Mastitis nachgewiesen als auch in Milch von Kühen mit einer natürlichen *S. aureus*-Infektion.

In Infektionsversuchen im Mäusemodell erwies sich ein *S. aureus*-Stamm mit dem Kapselantigen CP 5 (Stamm Reynolds CP 5) im Gegensatz zu Kapselantigen CP 8 (Stamm Reynolds CP 8) als virulenter (TUCHSCHERR et al., 2005).

In der Milchdrüse war die Entzündungsreaktion dieser Stämme [Stamm Reynolds (CP 5)] intensiver (WATTS et al., 2005).

CP 5 kommt bei bovinen Stämmen häufiger vor als CP 8, nicht jedoch bei Isolaten von Mensch, Schaf und Ziege (DEGO et al., 2002). Nach FATTOM et al. (1993) kommen diese 2 Kapseltypen bei 80% der *S. aureus*-Isolate von Ziegen, Schafen und Rindern mit Mastitis vor.

Die Gene, die in die Biosynthese der Kapsel von CP 5 und CP 8 involviert sind (*cap5*, *cap8*), befinden sich als Allele auf dem Bakterienchromosom (SAU et al., 1997). Die Mehrzahl der Kapselgene sind wahrscheinlich an der Synthese von Aminosuktern, am Zucker-Transfer, der Regulation der Kettenverlängerung von Kapselmolekülen, der Polymerisation und dem Transport beteiligt (TOLLERSRUD et al., 2000). BJERKETORP (2004) beobachtete bei der Mehrzahl der *S. aureus*-Isolate aus klinischen Mastitiden die Bildung eines Oberflächenpolysaccharides, welches als Mikrokapsel bezeichnet wurde. Die Bedeutung dieser Mikrokapsel für die Virulenz der *S. aureus*-Kultur ist allerdings bislang nicht klar.

### 2.3.6 Hämolyse

*S. aureus* produziert verschiedene Exotoxine, die Gewebe zerstören und das Bakterium vor der Immunantwort des Wirtes schützen. Diese zytotoxischen Moleküle sind die 4 Hämolyse Alpha ( $\alpha$ ), Beta ( $\beta$ ), Gamma ( $\gamma$ ) und Delta ( $\delta$ ); DINGES et al., 2000).  $\alpha$ -Hämolyse (oder Alphatoxin) hat u.a. eine dermonekrotische und neurotoxische Wirkung auf Säugetierzellen und führt durch die Bildung von Poren in der Zielzellmembran zur Zellyse. Insbesondere rote Blutzellen sind davon betroffen (BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991). Das  $\beta$ -Hämolyse wird als Sphingomyelinase bezeichnet, da es sich bei diesem Toxin um eine Phospholipase C handelt. Es führt zu einer Membranschädigung durch Freisetzen von Phosphorylcholin aus dem Sphingomyelin der Erythrozytenmembran und wirkt somit als Membrangift (FRITSCHKE, 1970; THELESTAM, 1983; BOERLIN und NICOLET, 2002).  $\gamma$ -Hämolyse besteht aus zwei Komponenten und hat neben Erythrozytenlysender auch eine leukozytolytische Aktivität.  $\delta$ -Hämolyse wird eine Surfactant- und Kanal-bildende Wirkung auf Zellmembranen zugeschrieben (DINGES et al., 2000). Die Produktion eines oder mehrerer Hämolyse kann durch die Kultivierung auf Blutagar nachgewiesen werden (siehe [2.2.2](#)), wobei die Bildung der  $\beta$ -Hämolyse bei *S. aureus*-Isolaten vom Rind oft als diagnostisches Kriterium verwendet wird (DVG, 2000).

Verschiedene jüngere Studien mit experimenteller Inokulation von Kaninchen und Mäusen haben die Bedeutung insbesondere von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Toxin bei der intramammären Infektion bestätigt (SUTRA und POUTREL, 1994). Die Anwesenheit von  $\beta$ -Toxin scheint typisch zu sein für *S. aureus*-Stämme, die aus Milch von bovinen Mastitiden isoliert wurden (AARESTRUP et al., 1999; LARSEN et al., 2002).

#### 2.3.6.1 Alpha-Toxin

Das  $\alpha$ -Toxin ist das am intensivsten untersuchte Zytotoxin. Ein hoher Prozentsatz von *S. aureus*-Stämmen produziert dieses Toxin und es ist toxisch für eine große Anzahl von Säugetier-Zellen (DINGES et al., 2000). Es handelt sich um ein Poren-bildendes hämolytisches Toxin (NILSSON et al., 1999). Während ihres Wachstums im Eutergewebe produzieren 20 bis 50% der *S. aureus*-Stämme  $\alpha$ -Toxin (SUTRA und POUTREL, 1994; DEGO et al., 2002).

Einige Virulenzfaktoren haben mehr als eine Funktion. Beispielsweise besitzt das  $\alpha$ -Hämolysin zusätzlich zu seiner Fähigkeit die Invasion durch Lyse von Gewebezellen zu fördern, eine Aktivität gegen menschliche Monozyten und neutrophile Granulozyten und wird darum auch als „Immune Escape Factor“ bezeichnet (BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991).

Das  $\alpha$ -Toxin von *S. aureus* wird von dem *hla*-Gen kodiert und ist ein relativ kleines Protein (293-Aminosäuren-Polypeptid) mit einem Molekulargewicht des Monomers von 33 000 bis 34 000 kDa und einem Sedimentationskoeffizient von 3,3S (BHAKDI et al., 1991). Es bindet als Monomer an die Zielzellen (Epithelzellen), wo es starken Veränderungen der Konformation unterliegt und transmembranöse Poren bildet (VANDANA et al., 1997). Diese Poren führen zu einer Leckage der Zelle für niedrigmolekulare Moleküle des Zytosols, was zum Tod der betroffenen Zelle führt. Die Injektion von gereinigtem  $\alpha$ -Toxin in die Milchdrüse eines Kaninchens verursacht dort eine hämorrhagische Nekrose, deren Ausmaß von der Dosis abhängt (PEACOCK et al., 1999). Die sekretorischen Zellen der Milchdrüse sind besonders empfindlich gegenüber  $\alpha$ -Toxin, während die Epithelzellen der Zitze resistenter sind (DEGO et al., 2002).

### 2.3.6.2 Beta-Toxin

Das  $\beta$ -Toxin, welches von dem *hlb*-Gen kodiert wird, wird als Exotoxin in das Kulturmedium sezerniert. Es hat ein Molekulargewicht von 35 000 kDa. Das *hlb*-Gen kodiert ein aus 330-Aminosäuren bestehendes Polypeptid (PROJAN et al., 1989; DINGES et al., 2000).

NAIDU und NEWBOULD (1975) führten Infektionsversuche am Rindereuter durch. Sie infizierten Euter mit einem  $\beta$ -Toxin-bildenden Stamm und konnten dadurch eine klinische Mastitis auslösen. Diese war durch eine deutliche Gewebsreaktion, ein verändertes Sekret und ein gestörtes Allgemeinbefinden gekennzeichnet. Die Infusion von  $\beta$ -Toxin in ein Euterviertel bewirkte einen deutlichen Anstieg des Gehaltes an somatischen Zellen verbunden mit entzündlichen Veränderungen des Drüsengewebes und Flockenbildung in der Milch. Das  $\beta$ -Toxin wird von 75 bis 100% der *S. aureus*-Stämme aus bovinen intramammären Infektionen produziert (SUTRA und POUTREL, 1994) und verursacht im Rindereuter Gewebeschäden und eine verminderte sekretorische Aktivität des Alveolarepithels. Auch die Injektion von

gereinigtem  $\beta$ -Toxin verursacht eine Entzündung und Ödematisierung des Euters (SUTRA und POUTREL, 1994).

Bei einigen *S. aureus*-Stämmen, die aus Rindereutern mit subklinischer Mastitis isoliert wurden, konnte kein *hly*-Gen nachgewiesen werden. Möglicherweise sind diese Stämme nicht in der Lage, eine klinische Mastitis hervorzurufen, da das  $\beta$ -Toxin eine wichtige Rolle bei der Gewebe-Penetration, Vermehrung der Erreger und Induktion der Erkrankung spielt (DINGES et al., 2000).

Der genaue Produktionszeitpunkt der beiden Toxine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) während einer *in vivo* Infektion ist nicht bekannt. Der durch die Toxine verursachte Gewebsschaden ermöglicht den Bakterien bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion die Haftung am Milchdrüsenepithel (DEGO et al., 2002).

### 2.3.7 Enterotoxin

Superantigene (SAg) sind eine Gruppe von strukturell und biologisch verwandten Proteinen, die die Staphylokokken-Enterotoxine (SE), Enterotoxin-like Proteins (ELP) und das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST 1) umfassen, welche tiefgreifende, sowohl akute wie auch langanhaltende Effekte auf das Immunsystem des Wirtsorganismus haben. Akute Effekte sind z. B. Lebensmittelvergiftungen, hervorgerufen durch die orale Aufnahme von SEs. Langfristige Wirkungen von SAGs sind die Beeinflussung des Immunsystems durch Störung der Abwehrmechanismen des Wirts und damit ein Beitrag zu einer bakteriellen Persistenz (FUEYO et al., 2005; VANCRAEYNEST et al., 2006).

Die Enterotoxine von Staphylokokken sind extrazelluläre Proteine, die aus einzelnen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa bestehen (MEHROTRA et al., 2000; DEGO et al., 2002). Neben den fünf sogenannten klassischen Enterotoxinen SEA bis SEE konnten weitere Enterotoxine (bzw. Toxingene), die als SEG bis SEU bezeichnet wurden, beschrieben werden (KURODA et al., 2001; YARWOOD et al., 2002; BABA et al., 2002; LETERTRE et al., 2003; LOIR et al., 2003; OMOE et al., 2003; ORWIN et al., 2003; SMYTH et al., 2005; HATA et al., 2006). Sie spielen eine herausragende Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen durch *S. aureus*, da sie beim Menschen nach oraler Aufnahme gastrointestinale Symptome hervorrufen (MOREILLON et al., 1995). Die ersten Studien über Staphylokokkenenterotoxine begannen mit Stämmen von *S. aureus*, die

bei Lebensmittelvergiftungen (staphylococcal food poisoning, SFP) gefunden wurden.

Die Bildung der Enterotoxine SEA bis SEE durch *S. aureus*-Feldstämme, isoliert von Tieren mit Mastitis, wurde in mehreren Studien untersucht (BAUTISTA et al., 1988; MATSUNAGA et al., 1993; KENNY et al., 1993; ZSCHÖCK et al., 2000 und 2005).

Die vom Menschen stammenden *S. aureus*-Kulturen sind zu einem noch höheren Anteil Enterotoxinbildner (teilweise über 50% der aus klinischem Material isolierten Stämme; BISPING und AMTSBERG, 1998). Verschiedene Arbeiten haben allerdings bezüglich der Häufigkeit von Enterotoxingenen bei *S. aureus*-Stämmen aus Rindermastitiden unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Die Anzahl an SE-Gen-positiven Isolaten variierte zwischen 0 und 100% innerhalb der Herden (KUZMA et al., 2003). *S. aureus* aus Fällen von subklinischer Mastitis produzieren keines dieser Toxine. Es wurden jedoch auch *S. aureus*-Stämme aus Proben chronischer Rindermastitiden isoliert, die ein oder mehrere pyrogene Toxine (PT), vor allem die Enterotoxine C und D und das Toxic-Shock-Syndrome-Toxin (TSST) produzierten (YOKOMIZO et al., 1994; FERENS et al., 1998; ZSCHÖCK et al., 2005).

Die Thermostabilität der Enterotoxine und deren relativ hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau führt dazu, dass sie sowohl eine Hitzebehandlung im Lebensmittel als auch die Magenpassage überstehen (CASMAN, 1965; ORWIN et al., 2003). Fälle von Lebensmittelvergiftungen durch Milch und Milchprodukte werden regelmäßig berichtet. Tatsächlich ist Milch von Tieren mit Mastitis die Hauptquelle von Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken tierischen Ursprungs (ORDEN et al., 1992).

Für den Enterotoxinnachweis von *S. aureus* werden diese in geeigneten Nährböden (z.B. Brain-Heart-Infusion-Bouillon) angezüchtet. Der Überstand kann unmittelbar für den immunologischen Toxinnachweis benutzt werden (BISPING und AMTSBERG, 1998). Neben der mitogenen wurde auch eine antiproliferative Wirkung der SE beschrieben. Eine Immunsuppression durch SE ist unter anderem die Folge einer Hemmung der Plasmazelldifferenzierung und dadurch der Antikörperbildung. Eine wichtige Rolle wird dabei der Wirkung von T-Suppressor-Zellen und  $\gamma$ -Interferon zugeschrieben (NILSSON et al., 1999). Die konventionelle Methode zum Nachweis von Enterotoxinen und TSST-1 besteht in der Immundiffusion, Latex-Agglutination oder einem ELISA aus dem Überstand von Kulturmedien. Häufig erlauben diese Methoden nicht den Nachweis von sehr geringen Konzentrationen der Toxine bzw.

potentiell Toxin-produzierende Stämme werden nicht entdeckt (SCHMITZ et al., 1998). Vor einigen Jahren wurden spezifische Oligonukleotidprimer für die PCR beschrieben, um – hauptsächlich in wissenschaftlichen Studien – Enterotoxingene von *S. aureus* nachzuweisen (JOHNSON et al., 1991; BECKER et al., 1998; SERGEEV et al., 2004). Dennoch besteht nach wie vor Bedarf an schnellen und spezifischen Methoden zum Nachweis dieser Exotoxine von *S. aureus* für diagnostische und epidemiologische Zwecke, insbesondere auch für den simultanen Nachweis aller Exotoxine.

Die meisten Enterotoxin-Gene befinden sich auf mobilen Genelementen, wie Prophagen, Plasmiden oder Pathogenitätsinseln. Dies ermöglicht die horizontale Ausbreitung dieser Toxingene auch innerhalb von Staphylokokken-Populationen (HAWRYLUK et al., 2002).

Die SE-Bildung findet überwiegend in der postexponentiellen Wachstumsphase statt, wobei ihre Expression durch drei unterschiedliche Regulationssysteme kontrolliert wird. Jedes Toxin wird als Vorläufer-Toxin in der Bakterienzelle gebildet und zusätzlich mit einer Signalsequenz ausgestattet, welche beim Transport aus der Zelle dann abgespalten wird (DINGES et al., 2000). Die SE-Produktion ist optimal bei neutralem pH-Wert. Sie sinkt im sauren Bereich und wird bei einem pH unter 5 sogar gehemmt (LOIR et al., 2003). Alle *S. aureus*-Enterotoxine sind hygroskopisch, leicht löslich in Wasser und Salzlösungen und resistent gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Papain. Sie sind widerstandsfähig gegen radioaktive Bestrahlung (200 kGy) und Hitzeeinwirkung, d.h. sie werden durch 121,1 °C oder 250 °F für eine halbe Stunde nicht inaktiviert (MARADONA, 1998).

Die meisten der enterotoxischen *S. aureus*-Stämme, die bei Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen beim Menschen isoliert wurden, produzierten vor allem SEA (TSEN et al., 1995; GOULOUMES et al., 1996). SEA stellt nach Untersuchungen von BALABAN und RASOOLY (2000) mit 77% das im Rahmen von Lebensmittelvergiftungen in den USA am häufigsten nachgewiesene Staphylokokkenenterotoxin dar, gefolgt von SED (37%) und SEB (10%). Laut MONDAY und BOHACH (1999b) sowie UNTERMANN (1994) hat SEA eine Molekülmasse von 27100 Da und einen isoelektrischen Punkt (pI) bei 6,8-7,3. Das Gen für SEA liegt auf einem Bakteriophagen, besteht aus 771 Bp und kodiert ein Protein mit 257 Aminosäuren. Die Expression des Gens *sea* wird, im Gegensatz zu

der Expression der Gene *seb*, *sec* und *sed*, nicht von dem akzessorischen Genregulator *agr* beeinflusst (BALABAN et al., 2000).

SEB ist das am besten untersuchte Enterotoxin. Es hat ein Molekulargewicht von 28336 Da und einen pI von 8,6 (SVENSSON et al., 1997; MONDAY und BOHACH, 1999b). Das Gen *seb* war bei einigen klinischen *S. aureus*-Isolaten auf dem Chromosom lokalisiert (SHAFER et al., 1978), es wurde allerdings bei anderen *S. aureus*-Stämmen auch auf einem 750-kb-Plasmid gefunden (LOIR et al., 2003). Es besteht aus ca. 900 Bp und kodiert 267 Aminosäuren (SVENSSON et al., 1997; BALABAN et al., 2000).

In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde SEB - unter dem Kürzel PG - in den USA im Rahmen eines Programms für biologische Waffen intensiv untersucht. Das Toxin war insbesondere deswegen interessant, weil geringere Mengen erforderlich waren, um den gewünschten pharmakologischen Effekt zu erzielen, als bei synthetischen Chemikalien (DINGES et al., 2000). SEB verursacht eine Lebensmittelvergiftung bereits innerhalb von 1 bis 6 h nach der Aufnahme. Ein Laborunfall, welcher zur Intoxikation durch Inhalation von SEB bei 9 Personen führte, sowie verschiedene natürliche Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen durch die Aufnahme von SEB sind in der Literatur beschrieben (RUSNAK et al., 2004). Eine Störung der Barriere-Funktion pulmonaler Endothelzellen des Rindes bzw. des Menschen wird ebenfalls durch SEB verursacht (DINGES et al., 2000).

SEA und SEB binden aufgrund ihrer Eigenschaft als Superantigene sowohl an den T-Zell-Rezeptor als auch an das „major-histocompatibility-complex-class II-Molekül“ und sind deshalb in der Lage, die exzessive Produktion von Entzündungsmediatoren sowie die Akkumulation von Leukozyten zu induzieren. SEA und SEB zeigen nur eine strukturelle Homologie von ca. 31%. Auch ihre biologischen Effekte sind verschieden. So ist die Leukozyten-Antwort auf SEA deutlich stärker als auf SEB (SCHRAMM und THORLACIUS, 2003).

Bei SEC handelt es sich um eine Gruppe hochkonservierter Proteine, die immunologische Kreuzreaktionen aufweisen (BERGDOLL et al., 1965; SCHAD et al., 1997). Es sind verschiedene Varianten von SEC ( $SEC_1$ ,  $SEC_2$ ,  $SEC_3$ ,  $SEC_{\text{-bovine}}$ ,  $SEC_{\text{-ovine}}$  und  $SEC_{\text{-canine}}$ ) beschrieben, die sich in ihrem Molekulargewicht und im pI

unterscheiden (MARR et al., 1993; EDWARDS et al., 1997; MONDAY und BOHACH, 1999b; DINGES et al., 2000). Laut MONDAY und BOHACH (1999b) haben die SEC-Subtypen ein Molekulargewicht von 27500 Da, ihre pI liegen zwischen 7,0 und 8,6 (MARR et al., 1993).

Das SEC 3-kodierende Gen *sec* besteht aus 801 Bp und kodiert ein Protein, das aus 267 Aminosäuren aufgebaut ist. SEC2 und SEC3 unterscheiden sich in vier Aminosäuren, SEC3 und SEC1 in neun Aminosäuren (FERENS et al., 1998).

SEC wird gewöhnlich von invasiven *S. aureus*-Isolaten produziert, insbesondere von Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA), und kann schwere Erkrankungen verursachen. Viele der *S. aureus*-Isolate aus Milchproben von Rindern mit Mastitis produzieren SEC. Dieses Toxin hat eine große ökonomische Bedeutung für die Gesundheitsvorsorge und die Molkerei-Industrie (EBLING et al., 2001; HOLECKOVA et al., 2002). SEC wird auch von einigen Autoren als ein bedeutender Virulenzfaktor bei der Mastitis des Rindes angesehen (FERENS et al., 1998, KUROISHI et al., 2003). KOMINE et al. (2004) berichten, dass SEC Anzeichen einer Mastitis, wie die Erhöhung der Anzahl an Leukozyten im Euter, verursacht.

SED hat ein Molekulargewicht von 26360 Da und einen pI bei 7,4 (BALABAN und RASOOLY, 2000). Es besteht aus 228 Aminosäuren (SVENSSON et al., 1997). SED-produzierende *S. aureus* besitzen alle ein relativ großes *sed*-tragendes, Penicillinase-kodierendes Plasmid (MONDAY und BOHACH, 1999a). Durch die Sequenzierung dieses Plasmides piB485 konnte die Sequenz von *sed* ermittelt werden, wobei ein weiteres, erstmalig von ZHANG et al. (1998b) beschriebenes Enterotoxigen *sej* entdeckt wurde (JARRAUD et al., 2001).

In Fällen akuter Mastitis war SEC, bei chronischen Mastitiden jedoch SED häufiger nachweisbar (FITZGERALD et al., 2001).

Das Enterotoxin E hat ein Molekulargewicht von 26425 Da und einen pI bei 8,5. Sequenzanalysen zeigten eine nahe Verwandtschaft (81%) zu SED und SEA (COUCH et al., 1988; BUSSCHE VAN DEN et al., 1993; MONDAY und BOHACH, 1999a; BALABAN und RASOOLY, 2000).

SEG weist ein Molekulargewicht von 27043 Da, SEI von 24928 Da auf. Dabei ergeben Nukleotidsequenzanalysen für *seg* eine Größe von 777 Bp (JARRAUD et al., 1999). Das SEG-Toxin besteht aus 258 Aminosäuren. Das SEGV wurde als eine Variante von SEG mit 233 Aminosäuren beschrieben und weist eine 97,7 %ige Ähnlichkeit zu SEG auf (ABE et al., 2000). Das *sei*-Gen hat eine Größe von 726 Bp und kodiert 242 Aminosäuren (JARRAUD et al., 1999 und 2001).

SEI hat emetische Effekte und ist ein Superantigen, wobei diese emetische Wirkung deutlich geringer ist als die anderer SEs (LOIR et al., 2003).

Die entsprechenden Gene *seg* und *sei* befinden sich bei *S. aureus* auf einem 3,2 kd DNA-Fragment (JARRAUD et al., 2001).

SEH wurde von SU und WONG (1995) weitergehend charakterisiert. Wie auch andere SEs ist das Enterotoxin SEH Antigen-wirksam und hat emetische Wirkung. Das Molekulargewicht beträgt 28500 Da und der *pI* liegt bei 5,7. Durch Klonierung und Sequenzierung des kodierenden Gens *seh* und durch Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass eine Ähnlichkeit mit den Staphylokokken-Enterotoxinen SEA bis SEE besteht. SEH erwies sich als näher verwandt mit SEA, SED und SEE. Es zeigt mit SEE 38%, SEA 37%, SED 37%, SEB 33% und SEC 27% Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz (REN et al., 1994; SU und WONG, 1995). Über die ätiologische Bedeutung eines SEH-produzierenden Stammes bei einer Lebensmittelvergiftung durch Staphylokokken wurde bereits berichtet (SU und WONG, 1996). Die meisten *seh*-positiven Stämme sind auch phänotypisch SEH-positiv (LOIR et al., 2003). Das *seh*-Gen besteht aus 654 Bp und kodiert für ein Protein mit 218 Aminosäuren.

Für den Nachweis von SEH (SU und WONG, 1996) und für SEG und SEI (OMOE et al., 2002) wurde ein ELISA beschrieben.

Bei SEJ handelt es sich um ein aus 269 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 31210 Da mit Ähnlichkeiten zu SEA, SEE und SED. Dieses Toxin wird ebenso wie SED durch ein Plasmid kodiert, auf dem *sed* und *sej* durch eine 895 Bp große Region voneinander getrennt sind. Zwar werden beide Gene von *S. aureus* exprimiert, scheinen aber einer unterschiedlichen Regulation zu unterliegen. Durch Untersuchungen mittels PCR konnte bewiesen werden, dass alle *sed*-tragenden Plasmide auch *sej* tragen (ZHANG et al., 1998a).

Die Gen- und Proteinsequenz von SEK wurde erstmals von LINDSAY et al. (1998) im Rahmen einer Untersuchung der TSST-1 Pathogenitätsinsel veröffentlicht. Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch ORWIN et al. (2001). SEK hat ein Molekulargewicht von 26000 Da, einen pI zwischen 7,0 und 7,5 und zeigt Übereinstimmungen mit dem von ORWIN et al. (2001) untersuchten, aber noch nicht näher charakterisierten SEL und SEI auf. SEK hatte Eigenschaften wie die übrigen SE, erwies sich ebenso als pyrotoxisches Superantigen und konnte den letalen Effekt von Endotoxinen verstärken.

In der Gendatenbank werden die von JARRAUD et al. (2001) beschriebenen Gene *sek* und *sel* nunmehr als *seo* und *sen* geführt. Das Gen *sel* kodiert nach FITZGERALD et al. (2001) ein enterotoxinähnliches Toxin, welches mit *tst*, *sec* und verschiedenen anderen Genen eine Pathogenitätsinsel SaPI<sub>bov</sub> bildet. Dieses Gen wurde ebenso nach Angaben von KURODA et al. (2001) als Element der Pathogenitätsinsel SaPI<sub>n1</sub>/SaPI<sub>m1</sub> aufgeführt. Bei Sequenzanalysen von SEK und SEL konnte keine Zystinschleife nachgewiesen werden (ORWIN et al., 2001 und 2003). Untersuchungen mit rekombinantem SEL ergaben keine emetische Aktivität (ORWIN et al., 2003).

SEM wurde 2001 von JARRAUD et al. beschrieben. Im Gegensatz zu SEN und SEO ist seine Benennung in der Publikation und der Gendatenbank einheitlich. SEM zeigt, im Gegensatz zu SEN und SEO, Ähnlichkeiten mit der Basen- und Aminosäuresequenz zu SEI.

JARRAUD et al. stellten 2001 im Rahmen von Sequenzanalysen fest, dass *seg*, *sei*, *sen* (ehemals *sek*), *seo* (ehemals *sel*) und *sem* gemeinsam auf einem Operon liegen und bezeichnete dies als „enterotoxin gene cluster“ (*egc*). Innerhalb der neu beschriebenen Enterotoxine G bis O scheint, obwohl hierzu bislang nur sehr wenige Arbeiten vorliegen, insbesondere der *egc*-Genkomplex von besonderer Bedeutung zu sein. Die Gene *seg* und *sei* treten dabei überwiegend gemeinsam, in einigen Fällen aber auch alleine auf. Über das ausschließliche Auftreten von *sem*, *sen* und *seo* liegen bislang noch keine Ergebnisse vor. Der *egc*-Genkomplex bzw. die Gene *seg* und *sei* konnten bislang bei *S. aureus*-Isolaten vom Tier nachgewiesen werden (AKINEDEN et al., 2001).

SEP wurde 2001 von KURODA et al. beschrieben. Das Gen *sep* ist 782 Bp groß, es gibt jedoch keine Angaben über das Molekulargewicht des zugehörigen Proteins, über den *pI* oder biologische Eigenschaften. ORWIN et al. berichteten 2003 über SEQ, ein nicht emetisch wirksames Enterotoxin mit einem Molekulargewicht von 28200 kDa und einem *pI* von 7,5. Das zugehörige Gen ist 728 Bp groß. SER hat ein Molekulargewicht von über 27000 kDa und das Gen hat eine Größe von 779 Bp (OMOE et al., 2003). Von SEU gibt es in der Literatur Angaben zur Gengröße (785 Bp), genauso wie für SEP und SER wird seine Existenz jedoch nur aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen postuliert, das Protein wurde bisher nicht dargestellt (LETERTRE et al., 2003).

In den letzten Jahren wurde zusätzlich zu den bereits bekannten SEs (SEA, SEB, SEC, SED und SEE) von der Existenz neuer Typen von SEs einschließlich der „Enterotoxin-like Toxins“ (SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR und SEIU) berichtet. Diese neu beschriebenen SEs werden aufgrund der Sequenz-Ähnlichkeiten mit den klassischen SEs zur Familie der Staphylokokken-Enterotoxine gezählt. Es gibt allerdings nur wenige Berichte, die das Vorkommen aller neuer Typen (*seg* bis *selr*) bei Isolaten aus Mastitismilch von Rindern beschreiben (HATA et al., 2006).

### 2.3.8 Superantigen-like-Protein

Bei den Exotoxin-ähnlichen Proteinen der Staphylokokken (SETs) handelt es sich um eine Familie von Proteinen, die ebenfalls als bakterielle Superantigene identifiziert wurden. Nach LINA et al. (2004) werden diese SET auch als Superantigen like Protein (SSL) bezeichnet.

Die Erstbeschreibung dieser SETs bzw. SSL erfolgte durch WILLIAMS et al. (2000), wobei fünf Gene (*set* 1-5) nachgewiesen wurden. Die Gensequenzen der Gene für diese fünf SET waren nur teilweise ähnlich mit denen anderer Staphylokokken- bzw. mit Streptokokken-Exotoxinen sowie mit dem Toxic-Shock-Syndrom-Toxin (TSST-1; siehe 2.4.10). Die Analyse von SET durch Gel-Filtrations-Chromatographie ergab ein monomeres Protein von 23 bis 24 kDa (WILLIAMS et al., 2000). Nach BESTEBROER et al., 2007 handelt es sich um eine Familie von 11 Exotoxinen mit strukturellen Homologien zu Superantigenen, aber weitgehend unbekanntem

Funktionen. Die Sequenz-Homologien liegen in der Größenordnung von 25% mit anderen etablierten Superantigenen (KURODA et al., 2001). Dementsprechend zeigt die Sequenz der *set*-Gene auch eine gewisse Übereinstimmung zum *tst*-Gen.

Die Ko-Expression vieler *set*-Gene während einer Infektion des Menschen lässt eine wichtige Rolle innerhalb der Wirt-Pathogen-Beziehungen vermuten (FITZGERALD et al., 2003). AL-SHANGITI et al. (2004 und 2005) untersuchten die Interaktion von 2 SSLs (SSL7 und SSL9) mit Zellen des humanen Immunsystems. Sie stellten fest, dass beide Proteine selektiv an Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen binden, was zu ihrer Aufnahme in diese Zellen führte.

### 2.3.9 Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1

Einige *S. aureus*-Kulturen haben die Fähigkeit Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) zu bilden (DEGO et al., 2002).

Das Toxin gehört ebenfalls zu der größeren Familie von pyrogenen Exotoxinen, die von *S. aureus* (Enterotoxine) und Gruppe-A-Streptokokken (pyrogene Exotoxine) produziert werden (TAKEUCHI et al., 1996).

Das TSST-1 wurde erstmals von TODD et al. (1978) beschrieben. Es wurde ursprünglich Enterotoxin F oder pyrogenes Exotoxin C genannt und erst später umbenannt in Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (NOTERMANS et al., 1983; VALLE et al., 1991; MATSUNAGE et al., 1993). TODD et al. (1978) beschrieben das toxische Schock Syndrom (TSS) als eine schwere akute Erkrankung bei kleinen Kindern. Zwei Jahre später stellten SHANDS et al. (1980) fest, dass TSS geographisch weit verbreitet auftritt bei jungen gesunden Frauen, die Tampons benutzen.

TSS ist charakterisiert durch hohes Fieber, Erythem, Bluthochdruck oder Schock, unter Beteiligung zahlreicher Organe und Hautdesquamation (NOTERMANS et al., 1983; MUSSER et al., 1990; SHIMAOKA et al., 1996).

Das Toxin TSST-1 hat ein Molekulargewicht von 25,14 Da und einen pI von 5,65 (REN et al., 1994). Das Toxin verursacht teilweise gleichartige Symptome wie die Staphylokokken-Enterotoxine. Zwischen TSST-1 und den *S. aureus*-Enterotoxinen bzw. den pyrogenen Exotoxinen der Streptokokken besteht teilweise eine Homologie in der Aminosäuresequenz (JOHNSON et al., 1991).

TSST-1-positive *S. aureus*-Isolate werden weltweit nachgewiesen. Im Bereich der Veterinärmedizin liegen entsprechende Berichte über Nachweise aus Geflügelproben, Tupferproben von Dermatitis-bedingten Hautveränderungen an Ziegeneutern, Nasentupferproben und aus Milchproben Mastitis-kranker Rinder und Ziegen vor (VALLE et al., 1991; CARDOSO et al., 1999).

Nach Untersuchungen von LEE et al. (1992) ergaben Nukleotidsequenzanalysen von TSST-1 und TSST-ovine 14 nicht übereinstimmende Nukleotide und daraus folgend neun unterschiedliche Aminosäuren. Im Weiteren reagiert TSST-ovine weniger stark mit gegen TSST-1 gerichteten Antikörpern. LEE et al. (1992) konnten weiterhin aufzeigen, dass sowohl TSST-ovine als auch TSST-1 mitogen sind, aber nur TSST-1 pyrotoxisch ist. TSST-ovine schien somit nicht in der Lage zu sein, einen toxischen Schock zu induzieren.

Es wurde nachgewiesen, dass *S. aureus*-Stämme, die eine gangränöse Mastitis verursachen, TSST-1 und SEC produzieren (KENNY et al., 1993). Auch andere Studien mit Isolaten von *S. aureus* aus klinischen Rindermastitiden zeigten, dass TSST-1 und SEC von Stämmen aus perakuten Mastitiden vermehrt exprimiert werden. Diese Toxine haben möglicherweise Einfluß sowohl auf die Adhäsion und Invasion als auch auf eine verstärkte Euterpathogenität von *S. aureus* (DEGO et al., 2002). ZSCHÖCK et al. (1998) konnten den für TSST-1 bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen der Art des Mastitisgeschehens und dem Anteil an Toxinbildnern auch für die SE feststellen. Im Falle eines sporadischen Infektionsgeschehens waren bis zu 38% SE-Bildner zu finden, unter denen SEC-positive Isolate dominierten. Bei epizootischem Charakter des Mastitisgeschehens war, wie im Falle des TSST-1, keines der untersuchten *S. aureus*-Isolate SE-positiv.

Von TSST-1 ist bekannt, dass es die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Alpha-Interferon und Interleukin-1 durch humane mononukleäre Zellen induziert. Da nach SUTRA und POUTREL (1994) intramammäre Infektionen durch *S. aureus*-Stämme, die nicht TSST-1 produzieren, hervorgerufen werden können, muß die Bedeutung des Toxins für die Mastitis noch näher untersucht werden.

TSST-1-hat eine Wirkung auf Zellen des Immunsystems (KENNY et al., 1992; BECKER et al., 1998). Die Aktivierung einer großen Zahl von T-Lymphozyten durch TSST-1 ist in der Pathogenese des TSS und anderer Staphylokokken-Infektionen bedeutend (SHIMAOKA et al., 1996).

Die Identifizierung von TSST-1 produzierenden Stämmen ist nicht nur für die Untersuchung der Pathogenese einzelner *S. aureus*-Infektionen wichtig, sondern ebenso für die Reihenuntersuchung virulenter Stämme im klinischen Mikrobiologie-Labor. Dazu sind verschiedene immunologische Nachweisverfahren entwickelt worden: die Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) und ein ELISA mit TSST-1 Antikörpern (SHIMAOKA et al., 1996). Auch „Colony immunoblot assays“ sind für die Charakterisierung von *S. aureus*-Isolaten, die TSST-1 produzieren, verwendet worden. Diese Methoden setzen jedoch eine ausreichende Produktion des Toxins bei Abwesenheit anderer beeinflussender bakterieller Produkte voraus (NEILL et al., 1990).

### 2.3.10 Exfoliative Toxine

Nach DAJANI (1972) kommt das exfoliative bzw. epidermolytische Staphylokokkentoxin (ET) vorzugsweise bei *S. aureus*-Stämmen vor, die im Zusammenhang mit Hautinfektionen des Menschen („Impetigo contagiosa“ bei Erwachsenen oder „Toxische Nekrose“ bei Kindern) isoliert wurden. Einige Stämme von *S. aureus*, die eines oder beide der immunologisch unterschiedlichen exfoliativen Toxine (ETA oder ETB) produzieren, wurden mit Staphylokokken-Erkrankungen assoziiert, bei denen Impetigo auftrat; diese Erkrankung wird auch "staphylococcal scalded skin syndrome" (SSSS) genannt. Der Erkrankung liegt eine intradermale Spaltbildung mit nachfolgendem Ödem zwischen dem unteren Stratum spinosum und dem oberen Stratum granulosum zugrunde.

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).

Bisher wurden vier unterschiedliche exfoliative Toxine beschrieben: ETA, ETB, ETC und ETD (YAMAGUCHI et al., 2002):

Laut JOHNSON et al. (1991) haben ETA und ETB identische biologische Eigenschaften sowie Ähnlichkeiten in den Gensequenzen. Das Gen, welches für ETA kodiert, liegt chromosomal, während jenes für ETB an ein Plasmid gebunden ist. PIEMONT (1999) beschrieb im Rahmen einer Sequenzanalyse eine 40%ige Übereinstimmung zwischen *eta* und *etb*, konnte jedoch keine Ähnlichkeit zu Sequenzen anderer Bakterientoxin-Gene feststellen.

ETC wurde erstmals von SATO et al. (1994) von einer *S. aureus*-Kultur, isoliert von einem Pferd, beschrieben. Dieses Toxin hatte identische biologische Eigenschaften wie ETA und ETB, erwies sich aber als hitzempfindlich. Das *etc*-Gen hat zu den Genen *eta* und *etb* eine Sequenzähnlichkeit von 12% (YAMAGUCHI et al., 2002). ETD beschrieben erstmals YAMAGUCHI et al. (2002) als Element einer „*S. aureus*-Pathogenitätsinsel“. ETD zeigte gleiche Eigenschaften wie die Toxine ETA und ETB. Das *etd*-Gen wies mit den Genen *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).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bakterienkulturen

##### 3.1.1 Feldisolate

In die Untersuchung wurden insgesamt 325 *S. aureus*-Isolate aus 64 verschiedenen, randomisiert über Hessen verteilten Milcherzeugerbetrieben einbezogen. Alle im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten *S. aureus*-Isolate stammten aus der Mastitis-Routinediagnostik des Landesbetriebes Hessisches Landeslabor in Gießen, (LHL) die in Anlehnung an die Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und an die Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern (DVG, 2000) durchgeführt wurden. Die Bakterienkulturen lagen in der Primärkultur auf Rinderblut-Äskulinagar (siehe [3.2.1](#)) überwiegend in Reinkultur bei mäßigem bis starkem Keimgehalt vor. Zur Absicherung der Diagnose „*S. aureus*“ wurde jedes Staphylokokkenisolat zusätzlich mittels phänotypischem Plasmakoagulasenachweis (siehe [3.3.1.3](#)) geprüft.

Zu jedem *S. aureus*-Isolat wurde die Anzahl somatischer Zellen (Zellzahl) in der zugehörigen Viertelgemelksprobe (Ursprungsviertelgemelksprobe) als Ausdruck des Grades der durch das betreffende Isolat hervorgerufenen entzündlichen Reaktion vermerkt. Die Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen erfolgte nach dem fluoreszenzoptischen Prinzip mittels Fossomatik 5000.

In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung von 7 bis 9 *S. aureus*-Isolaten pro Betrieb (n = 34) gemäß den Angaben von SOMMERHÄUSER et al. (2001) mittels Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA (siehe [3.4.1](#)) und durch Nachweis von Koagulase- und Protein A-Gen-Polymorphismen (siehe [3.4.2](#)). Traten bei mindestens 6 *S. aureus*-Isolaten Homologien auf, wurde das betreffende Isolat als „epidemisch“ bewertet. Neben der Zellzahl der Ursprungsviertelgemelksprobe wurde zusätzlich die durchschnittliche Zellzahl aller genotypisch identischen *S. aureus*-positiven Viertelgemelksproben in dem betreffenden Betrieb (Durchschnittszellzahl) durch Bildung des arithmetischen Mittelwerts errechnet und vermerkt.

Einzelne Isolate der 34 Betriebe mit untereinander und von den „epidemisch“ auftretenden *S. aureus* abweichenden Makrorestriktionsmustern (Unterschiede von

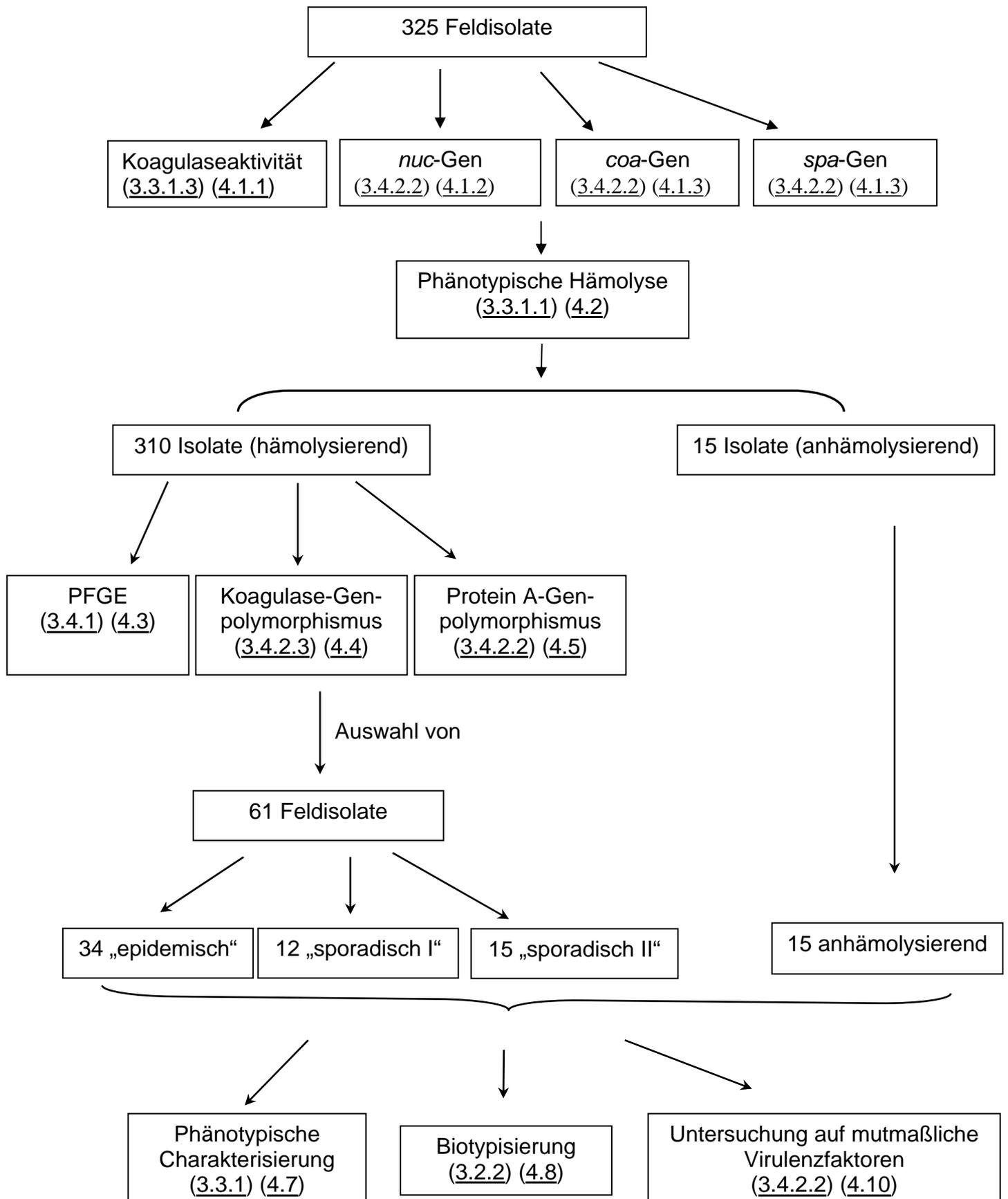
mehr als drei Banden) sowie abweichenden Koagulase- bzw. Protein A-Gen-Polymorphismen erhielten die Bezeichnung „sporadisch I“.

*S. aureus*-Isolate aus Betrieben, die eutergesund waren bzw. deren Eutergesundheitsproblem auf andere, unter Umständen umweltassoziierte Erreger zurückzuführen war, wurden als „sporadisch II“ bezeichnet.

Auf diese Weise erfolgte die Auswahl von 34 *S. aureus*-Kulturen, die als „epidemisch“ klassifiziert wurden und von 12 als „sporadisch I“ bzw. 15 als „sporadisch II“ klassifizierten Feldstämmen. Weitere 15 *S. aureus*-Isolate aus der Routinediagnostik, die – im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Stämmen – keine Hämolyse ausbildeten und aus unterschiedlichen Milcherzeugerbetrieben (n = 15) stammten, wurden ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen.

Somit wurden von den ursprünglichen 325 Isolaten insgesamt 76 genotypisch charakterisierte, für unterschiedlich befundene *S. aureus*-Kulturen in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Das Verfahren zur Vorauswahl der Feldisolate und die weiterführenden Untersuchungen sind in Abb. 1 dargestellt.

Abb. 1: Vorauswahl der 76 untersuchten *S. aureus*-Feldisolate und weiterführende Untersuchungen



### 3.1.2 Referenzstämme

Als Referenzstämme aus der Stammsammlung des LHL, Gießen dienten die *S. aureus*-Kulturen SEA (interne Nomenklatur: 619/93), SEB (243), SEC (1229/93), SED (1644/93), SEE (FRI 918), SEG/SEI (Ly 990055), SEH (Ly 990552), TSST1 (161/93), ETA/ETB (114/98), die *Streptococcus equi*-Kultur ATCC 33398, die *S. aureus*-Kultur ATCC 25923 und die *S. epidermidis*-Kultur ATCC 14990.

## 3.2 Anzuchtungsmedien und Konservierung der Kulturen

### 3.2.1 Anzuchtungsmedien

Die Erstanzüchtung erfolgte auf Rinderblut-Äskulin-Agar (siehe Anhang) mit folgender Zusammensetzung:

23,0 g/l	Spezial-Nährsubstrat
1,0 g/l	Stärke
5,0 g/l	Natriumchlorid
13,0 g/l	Agar-Agar
0,5 g/l	Äskulin
1000 ml	Aqua dest

Dem nach den Angaben des Herstellers gefertigten Medium wurde nach dem Autoklavieren (15 min bei 121 °C) und Abkühlen auf ca. 50 °C, 5% defibriertes aseptisch entnommenes Rinderblut (siehe Anhang) ohne Blasenbildung zugesetzt.

Die Anzüchtung der zur weiteren Untersuchung ausgewählten Subkulturen erfolgte auf Columbia-Schafblutagarplatten (siehe Anhang) mit folgender Zusammensetzung:

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

Dem nach den Angaben des Herstellers gefertigten Medium wurde nach dem Autoklavieren (15 min bei 121 °C) und Abkühlen auf ca. 50 °C, 5% defibriniertes aseptisch entnommenes Schafblut (siehe Anhang) ohne Blasenbildung zugesetzt.

Die Inkubation der beimpften Nährmedien wurde für 18-24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Die Anzüchtung der Bakterien in flüssigem Medium erfolgte - wenn nicht anders angegeben - in Staphylokokken-Anreicherungsbouillon (siehe Anhang) mit folgender Zusammensetzung :

8,0 g/l	Pepton aus Fleisch
2,0 g/l	Pepton aus Casein
1,0 g/l	Hefeextrakt
5,0 g/l	Fleischextrakt
10,0 g/l	Natriumpyruvat
12,0 g/l	Glycin
5,0 g /l	Lithiumchlorid
1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und autoklaviert (15 min bei 121 °C). Nach Erkalten der Bouillon und Zusatz von 100 ml/l Rinderserum (siehe Anhang) erfolgte zur Anzüchtung der Bakterien eine Inkubation der beimpften Kolben für 18-24 h bei 37 °C auf einem Rundschtüttler.

Die Bakterienkulturen wurden auf Columbia-Schafblutagarplatten angezüchtet, bei 4 °C aufbewahrt und im Abstand von ca. 6-8 Wochen subkultiviert.

### 3.2.2 Konservierung der *S. aureus*-Isolate

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die mittels oben genannter Verfahren identifizierten Isolate in 3 ml Rinderserum mit 6% Glukose suspendiert, in ein 5 ml-Eppendorf-Gefäß abgefüllt und bei -20 °C gelagert.

Die Wiederanzüchtung der Isolate erfolgte nach dem Auftauen bei Raumtemperatur durch Ausstreichen der Suspension auf Columbia-Schafblutagar und Bebrütung für 24 h bei 37 °C.

Die Isolate wurden durch eine fortlaufende Nummer, den Namen des Betriebes, die Isolat-Nummer, die Kuh-Nummer und die Zellzahl gekennzeichnet.

### **3.3 Identifizierung der ausgewählten *S. aureus*-Kulturen**

#### **3.3.1 Phänotypische Identifizierung**

##### **3.3.1.1 Hämolyseformen**

Zur Beurteilung der Hämolyse und Koloniemorphologie wurden die Bakterienkulturen auf Columbia-Schafblutagar (3.2.1) 24 h bei 37 °C angezüchtet. Eine  $\alpha$ -Hämolyse zeigte sich als eine breite Zone vollständiger Hämolyse, eine  $\beta$ -Hämolyse als eine breite Zone unvollständiger Hämolyse und eine  $\delta$ -Hämolyse als eine schmale Zone vollständiger Hämolyse.

Die unterschiedlichen Hämolyseformen wurden im Weiteren nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode untersucht. Dazu erfolgte eine strichförmige Beimpfung einer nach 3.2.1 hergestellten Columbia-Schafblutagarplatte mit einer  $\beta$ -hämolisierenden *S. aureus*-Referenzkultur. Senkrecht dazu wurde die zu untersuchende *S. aureus*-Kultur strichförmig, bis ca. 5 mm an die Referenzkultur heranreichend, ausgestrichen. Die Beurteilung der Hämolyse erfolgte nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C. Eine  $\alpha$ -Hämolyse stellte sich als eine im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins gehemmte Zone vollständiger Hämolyse dar. Eine  $\beta$ -Hämolyse zeigte sich als eine Zone unvollständiger Hämolyse um den Impfstrich. Eine  $\delta$ -Hämolyse stellte sich im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins als CAMP-ähnliche Verbreiterung der Hämolyse sowie um den Impfstrich als schmale, vollständige Hämolyse dar.

Wie bereits aufgeführt, wurden auch 15 nicht-hämolisierende *S. aureus*-Stämme in die Untersuchung miteinbezogen.

### 3.3.1.2 Wachstum auf Baird-Parker-Agar

Zur Gattungsidentifizierung der Staphylokokken wurde zunächst das Verhalten der Kulturen auf Staphylokokken-Selektivmedium (siehe Anhang) beurteilt (NISKANEN und AALTO, 1978). Dazu erfolgte eine Beimpfung des Agars mit den *S. aureus*-Kulturen und eine Bebrütung unter aeroben Bedingungen bei 37 °C für 24-48 h.

Das Selektivmedium hatte folgende Zusammensetzung:

40 g/l	Baird-Parker-Agar
1000 ml	Aqua dest.

Nach Autoklavieren bei 121 °C für 15 min und anschließendem Abkühlen auf 50 °C wurden dem Grundmedium 50 ml/l Eigelb-Tellurit-Emulsion (siehe Anhang) 20% zugesetzt. Staphylokokken wachsen auf diesem Agar aufgrund einer positiven Telluritreduktion innerhalb von 24-48 h bei 37 °C als kleine, schwarze, glänzende, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm. *S. aureus*-Kulturen waren weiterhin bei einer positiven Eigelbreaktion, d.h. bei Lipolyse und Proteolyse, von einem schmalen weißen Ring umgeben.

### 3.3.1.3 Nachweis der Koagulasereaktion

Der Nachweis der Koagulasereaktion erfolgte mit Hilfe des Röhrchentests nach der bei KLOOS und LAMBE (1991) beschriebenen Methode. Kaninchenplasma (siehe Anhang; 250 µl, gewonnen aus sterilem Zitratblut) wurde mit 3 ml Aqua dest. und 8 ml (0,15 mol/l) NaCl versetzt und anschließend in 0,3 ml Aliquots aufgeteilt. Je Aliquot wurden 3-5 Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen hinzugegeben. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte nach einer Bebrütung von 24 h bei 37 °C. Eine positive Reaktion lag vor, wenn ein vollständiges oder überwiegend zusammenhängendes Koagulum zu erkennen war.

Zur Überprüfung wurde für jeden Reaktionsansatz als Positivkontrolle *S. aureus* ATCC 25923 und als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990 mitgeführt.

### 3.3.1.4 Nachweis des Clumping-Factors

Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Factors erfolgte als Objektträgertest mit zitriertem Kaninchenplasma nach CADNESS-GRAVES et al. (1943). Dazu wurden zwei bis drei Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen mittels einer sterilen Öse in einem Tropfen NaCl-Lösung (0,4 mol/l) 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 positive Reaktion zeigte sich durch eine deutliche Verklumpung der Bakterien innerhalb von 1-2 min im Plasmotropfen. Eine Kulturaufschwemmung ohne Plasmazusatz diente als Kontrolle, um eine Selbstagglutination der Staphylokokken auszuschließen. Als Positivkontrolle diente *S. aureus* ATCC 25923, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990

### 3.3.1.5 Identifizierung mittels MASTASTAPH-Kit

Eine weitere Identifizierung der Kulturen erfolgte mit Hilfe des kommerziellen MASTASTAPH-Testkits (siehe Anhang).

Dieser Test diente zur Identifizierung der *S. aureus*-Kulturen durch den Nachweis des Clumping-Factors und/oder von Protein A. Dazu wurden zwei bis drei Kolonien der nach [3.2.1](#) angezüchteten Bakterien auf dem Testbereich der MASTASTAPH-Testkarte in einem Tropfen des MASTASTAPH-Latex-Reagenz suspendiert. Nach mehrmaligem langsamen Schwenken der Karte konnte das Ergebnis nach ca. 30 s abgelesen werden. Eine deutlich sichtbare Verklumpung der Latexpartikel innerhalb weniger Sekunden mit einem klaren Hintergrund galt als positives Ergebnis, eine milchige Suspension ohne erkennbare Agglutination der Latexpartikel wurde negativ gewertet. Als Positivkontrolle diente *S. aureus* ATCC 25923, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.3.1.6 Weitere Enzymnachweise

#### 3.3.1.6.1 DNase

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgte mit dem Fertignährmedium DNaseTestagar (siehe Anhang), der sich wie folgt zusammensetzte:

20,0 g/l	Tryptose
5,0 g/l	Natriumchlorid
2,0 g/l	Desoxyribonukleinsäure
15,0 g/l	Agar-Agar
1000 ml	Aqua dest.

Nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C wurde der DNase-Testagar mit 1 N HCl überflutet.

DNase-bildende Kolonien zeigten dabei einen klaren Hof um die Kolonien, während bei negativem Reaktionsausfall durch Präzipitation der nicht abgebauten DNA eine vollständige Trübung des Nährmediums auftrat.

#### 3.3.1.6.2 Hyaluronidase

Zur Überprüfung der Hyaluronidasebildung wurde der bei WINKLE (1979) beschriebene Dekapsulationstest verwendet. Eine nach [3.2.1](#) hergestellte Columbia-Schafblutagarplatte wurde S-förmig mit einer mucoid wachsenden *S. equi*-Kultur ([3.1.2](#)) als Indikatorkeim, sowie senkrecht dazu mit der zu untersuchenden Bakterienkultur beimpft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase zeigte sich in nicht-mucoid wachsenden Kolonien der ansonsten mucoid wachsenden *S. equi*-Kultur in der Nähe des Staphylokokken-Impfstrichs.

### 3.3.2 Biotypisierung

Zur Biotypisierung wurde das von DEVRIESE (1984) beschriebende Verfahren in modifizierter Form angewandt. Dies beinhaltete die Koagulation von bovinem Plasma, das Wachstum auf Kristallviolett-Agar und den Nachweis des  $\beta$ -Hämolytins (3.3.1.1).

#### 3.3.2.1 Nachweis der Koagulation von bovinem Plasma

Zur Gewinnung von bovinem Zitratplasma wurde einer klinisch gesunden Kuh unter antiseptischen Bedingungen mittels eines Venenverweilkatheters 600 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen und mit 30 ml einer 10 %igen (w/v) Zitratlösung (siehe Anhang) gemischt. Nach Zentrifugation des Zitratblutes für 10 min bei 3000 U/min und Entnahme des Überstandes erfolgte eine zweite Zentrifugation. Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde in verschließbaren, sterilen Kunststoffgefäßen portioniert (25 ml) und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach jedem Auftauen erfolgte zur Sterilitätsprüfung das Ausspateln von 0,1 ml Plasma auf einem Rinderblut-Äskulinagar (3.2.1) und eine Bebrütung des Ansatzes aerob bei 37 °C für 48 h. Bei Nachweis von Keimwachstum wurde die betroffene Plasmaportion verworfen.

Zum Nachweis der Plasmakoagulase wurde 1 Teil Zitratplasma mit 3 (0,15 mol/l) Teilen NaCl verdünnt. 0,5 ml dieses verdünnten Plasmas wurde in ein Koagulaseröhrchen mit einem Durchmesser von 9 mm pipettiert und mit drei bis vier Kolonien einer auf Rinderblut-Äskulinagar für 18-24 h bei 37 °C aerob bebrüteten *S. aureus*-Kultur beimpft. Dieser Ansatz wurde für 24 h bei 37 °C bebrütet.

#### 3.3.2.2 Wachstum auf Kristallviolett-Agar

Tryptose-Agar (siehe Anhang) mit einem Kristallviolett-Gehalt (siehe Anhang) von 8  $\mu$ g/ml wurde punktförmig mit einer Öse Bakterienmaterial einer auf Rinderblut-Äskulinagar frisch subkultivierten *S. aureus*-Kultur (3.2.1) beimpft und bei 37 °C bebrütet, so dass Makrokolonien mit einem Durchmesser von etwa 5 mm entstanden. Die Beurteilung erfolgte nach 24 und 48 h. Gelbe Kolonien mit violetterem

Rand wurden dem Kristallviolett-Typ A zugerechnet, blaue oder violette Kolonien dem Typ C und weiße oder bläulich-weiße Kolonien dem Typ E.

### **3.4 Auswahl der *S. aureus*-Kulturen**

#### **3.4.1 Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese**

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

##### **3.4.1.1 Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA**

Die Präparation und der anschließende Restriktionsverdau erfolgte nach einer modifizierten Methode von SOMMERHÄUSER (2001).

Die Bakterien wurden 24 h in 5 ml Todd-Hewitt-Bouillon (siehe Anhang) angezüchtet, nach anschließendem Abzentrifugieren für 10 min (9500 x g) zweimal in TE-Puffer (siehe Anhang) gewaschen, in TE-Puffer resuspendiert und zuletzt photometrisch bei 600 nm auf eine Dichte von 5% Transmission eingestellt. Agarose [Pulsed Field Certified (siehe Anhang); 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 (siehe Anhang), 20 mg/ml Lysozym (siehe Anhang) und 5 U/ml Lysostaphin (siehe Anhang) über Nacht bei 37 °C, eine Deproteinisierung durch Zugabe von 0,5 mg/ml Proteinase K (siehe Anhang) und Inkubation, erneut über Nacht, bei 56 °C.

Die Agaroseblöckchen wurden zweimal für 30 min in 200 µl TE-Puffer/Blöckchen bei Raumtemperatur gewaschen und zur Proteinase K-Inaktivierung mit 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; siehe Anhang) zweimal für 1 h bei 56 °C inkubiert. Abschließend wurden die Blöckchen erneut zweimal für 30 min bei Raumtemperatur in 200 µl TE-Puffer/Blöckchen gewaschen.

Die derart vorbereitete DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Sma*I (25 U pro Blöckchen; siehe Anhang) für 5 h bei 25 °C verdaut. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (1 Blöckchen) ca.	1 µg
Puffer J	20 µl
BSA	20 µl
<i>Sma</i> I	2 µl
Aqua dest	158 µl

### 3.4.1.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Das Auftrennen der nach 3.4.1.1 präparierten DNA mittels PFGE erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Dazu wurden 1,1 g Agarose in 55 ml Wasser und 55 ml 0,5 x TBE-Puffer (siehe Anhang) in der Mikrowelle geschmolzen und in die vorbereitete Gelkammer (13 x 14 x 0,55 mm Flachbettform; siehe Anhang) 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 wurden die Blöckchen in die Geltaschen eingeführt (je nach Kammgröße  $\frac{1}{2}$  oder 1 ganzer Block). Nach Einsetzen der Blöckchen in die Vertiefungen des Agarosegels und Verschießen der Vertiefungen mit flüssigem 1 %igem Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer fand die Elektrophorese anschließend in CHEF-DR II „Pulse Field Electrophoresis System“ (siehe Anhang) mit 2,5 l zuvor auf 14 °C gekühltem 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer unter den von SOMMERHÄUSER (2001) beschriebenen Konditionen statt:

Laufprogramm	<u>Lauf I</u>	<u>Lauf II</u>
Pulszeiten	0,1-11 s (linearer Gradient)	9-40 s (linearer Gradient)
Spannung	5 V	6 V
Temperatur	14 °C	14 °C
Dauer	8 h	17 h

Als DNA-Längenstandard dienten Low PFG Marker Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000kb; siehe Anhang).

### **3.4.1.3 Ethidiumbromidfärbung**

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA-Fragmente durch Färbung des Gels für 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 U/µl; siehe Anhang), 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.

Die Auswertung und photographische Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht mit Hilfe eines Gel-Videodokumentationssystems (siehe Anhang), wobei sich die DNA-Fragmente als helle Banden vor dunklem Hintergrund darstellten.

### **3.4.1.4 Auswertung der PFGE-Muster**

Die Analyse der PFGE-Muster erfolgte mittels Gel Compar-Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) um den Grad der genetischen Verwandtschaft zu ermitteln und visuell unter Berücksichtigung der Angaben von TENOVER et al. (1995). Die Restriktionsmuster, die keinerlei Unterschied im Bandenmuster zeigten, wurden als gleiche Muster beurteilt, solche mit zwei bis drei unterschiedlichen Fragmenten als Subtyp und Restriktionsmuster mit mehr als vier Fragmentabweichungen als unterschiedlicher Typ. Isolate, die gleiche Muster oder nicht mehr als drei unterschiedliche Fragmente zeigten wurden nach BOOTH et al. (2001) in eine gemeinsame Abstammungslinie gruppiert.

## **3.4.2 Molekularbiologische Identifizierung und weitergehende Untersuchung**

### **3.4.2.1 Präparation der bakteriellen DNA**

#### **3.4.2.1.1 Vereinfachte Präparation der bakteriellen DNA**

Die Aufbereitung der als „Template“ eingesetzten DNA erfolgte in modifizierter Form nach der von FRÉNEY et al. (1996) beschriebenen Methode. Dazu wurden 4-6 Kolonien der zu untersuchenden und nach [3.2.1](#) auf Festmedium angezüchteten Kulturen in Reaktionsgefäße (2 ml Eppendorf) überführt, mit 100 µl TE-Puffer

suspendiert und nach Zusatz von 5 µl Lysostaphin (1,8 U/µl) für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Deproteinisierung erfolgte die Zugabe von 5 µl Proteinase K und eine Inkubation für 2 h bei 56 °C. Nach einer Inkubation für 10 min bei 100 °C im Wasserbad zur Inaktivierung der Proteinase K, Abkühlen für 1 min auf Eis und Zentrifugation für 2-3 min bei 14000 x g, konnte der Überstand als „Template“ in der PCR eingesetzt werden.

#### **3.4.2.1.2 DNA-Präparation mit dem Qiagen Tissue Kit**

Zur Präparation der bakteriellen DNA wurde weiterhin das DNeasy Tissue Kit (siehe Anhang) verwendet. Dazu wurden 3 bis 4 Kolonien der zu untersuchenden Kulturen in 180 µl TE-Puffer und 10 µl Lysostaphin (1,8 U/µl) gegeben und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K und Durchmischung des Reaktionsgemisches fand eine weitere Inkubation für 2 h bei 56 °C statt. Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte anschließend die Zugabe von 200 µl Ethanol (99%). Nachfolgend wurde das Reaktionsgemisch durch den DNeasy Filtereinsatz mit Silicamembran mittels Zentrifugation für 30 s bei 14000 x g in ein 2 ml Reaktionsgefäß abfiltriert. Nach zweimaliger Waschung der Membran mit je 500 µl AW-Puffer und jeweils anschließender Zentrifugation bei 14000 x g für 30 s wurde der DNeasy Filtereinsatz mit Silicamembran in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Das Eluieren der an die Membran gebundenen DNA erfolgte mittels 200 µl AE-Puffer und anschließender Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Das DNA-haltige Eluat wurde bei 14000 x g abzentrifugiert und die so erhaltene DNA direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

#### **3.4.2.2 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)**

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl konventionelle Einzel-PCR als auch „Multiplex-PCR“ zum Nachweis bakterieller Gene durchgeführt.

Zur Durchführung einer Einzel-PCR erfolgte die Erstellung eines „Mastermix“ mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

---

13,2 ml	Aqua dest.
2,0 µl	Inkubationspuffer (10 fach)
0,8 µl	Magnesiumchlorid (25 mmol/l)
0,7 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
0,7 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
0,4 µl	dNTP (10 mmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/ µl)

Nach gründlicher Durchmischung des „Mastermixes“ wurden 18 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 2 µl der nach [3.4.2.1](#) präparierten DNA vermischt.

#### 3.4.2.2.1 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten Oligonukleotidprimer und Thermocycler-Temperaturprogramme einschließlich ihrer Erstbeschreibung sind in [Tab. 1](#) zusammengestellt. Im Thermocycler erfolgte für die Einzel-PCRs zunächst jeweils eine initiale Denaturierung der DNA für 4 min bei 94 °C mit anschließenden, sich unterschiedlich oft wiederholenden Zyklen zur Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisierung. Den Abschluss bildete ein 5 min Extensionszyklus bei 72 °C, wonach die Proben bis zum Auftragen in ein Gel bei +4 °C aufbewahrt wurden.

#### 3.4.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der Amplikons erfolgte mittels eines 2 %igen Agarosegels. Dazu wurden zunächst 0,7 g Agarose (Biozym LE, siehe Anhang) in 35 ml TBE 10 x-Puffer unter Erhitzen gelöst und in eine Flachbettform gegossen. Nach dem Abkühlen konnte nun 12 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Stop-Mix (siehe Anhang) vermischt und in das erstarrte Agarosegel pipettiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Horizontalgel für 1 h bei 120 V, wobei als Laufpuffer ebenfalls TBE-Puffer diente. Eine Bestimmung der Größe der PCR-Produkte ermöglichte ein ebenfalls in das Gel aufgetragener DNA-Längenstandard VI, Simplyload™ 100 Bp DNA Ladder (siehe Anhang).

### 3.4.2.2.3 Ethidiumbromidfärbung

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA-Fragmente durch Färbung des Gels nach 3.4.1.3

### 3.4.2.3 Koagulase-Gen-Polymorphismus

Zur Darstellung von Gen-Polymorphismen des *coa*-Gens erfolgte ein Restriktionsverdau des amplifizierten Koagulase-Genabschnitts mit dem Restriktionsenzym *AluI* (10 U/μl; siehe Anhang).

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

12,0 μl	PCR-Produkt
1,0 μl	Enzym ( <i>AluI</i> )

Der Restriktionsansatz wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im Agarosegel aufgetrennt (3.4.2.2.2).

### 3.4.2.4 Nachweis von Enterotoxigenen und weiteren Superantigenkodierenden Genen mittels „Multiplex-PCR“

Der gemeinsame Nachweis der Gene *sea*, *seb*, *sed*, *see* wurde nach MONDAY und BOHACH (1999a) mittels „Multiplex-PCR“ durchgeführt.

Die verwendeten Primersequenzen, die Amplifikatgrößen, die Thermocyclerprogramme sowie die jeweiligen Referenzen der PCR-Methoden sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Zur Durchführung dieser „Multiplex-PCR“ erfolgte die Erstellung eines „Mastermixes“ mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

---

9,6 µl	Aqua dest
2,0 µl	Inkubationspuffer (10 x)
0,8 µl	dNTP (10 mmol/l)
0,4 µl	<i>sea</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,4 µl	<i>sea</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,8 µl	<i>seb</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,8 µl	<i>seb</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>sed</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>sed</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>see</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>see</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Der gemeinsame Nachweis der Gene *sec* und *tst* wurde ebenso nach MONDAY und BOHACH (1999a) mittels „Multiplex-PCR“ durchgeführt. Zur Durchführung der „Multiplex-PCR“ erfolgte die Erstellung eines „Mastermixes“ mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

12,4 µl	Aqua dest
2,0 µl	Inkubationspuffer (10 x)
0,8 µl	dNTP (10 mmol/l)
0,8 µl	<i>sec</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,8 µl	<i>sec</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>tst</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
1,0 µl	<i>tst</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Nach gründlicher Durchmischung des „Mastermixes“ wurden 19 µl davon in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 1,0 ml der nach [3.4.2.1](#) präparierten DNA vermischt.

Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler (siehe Anhang) erfolgte nach [3.4.2.2.1](#) eine initiale Denaturierung der DNA. Danach kam das folgende

Temperaturprogramm zur Anwendung, welches für die „Multiplex-PCR“ *sea*, *seb*, *sed* und *see* sowie für *sec* und *tst* benutzt wurde:

30 Zyklen:	Denaturierungstemperatur	94 °C für 2 min
	Anlagerungstemperatur der Primer	55 °C für 2 min
	Verlängerungstemperatur der Primer	72 °C für 1 min
1 Zyklus:	Extensionszyklus	72 °C für 10 min

Der Nachweis der bzw. des Amplikons erfolgte nach der unter 3.4.2.2.2 beschriebenen Methode.

Der gemeinsame Nachweis der Gene *seg*, *seh*, *sei*, *sej* sowie der 16S rDNA erfolgte ebenfalls mittels „Multiplex-PCR“ nach MONDAY und BOHACH (1999a).

Das „Mastermix“ setzte sich je Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

9,2 µl	Aqua dest
2,0 µl	Inkubationspuffer (10 x)
0,8 µl	dNTP (10 mmol/l)
0,6 µl	<i>seg</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,6 µl	<i>seg</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,8 µl	<i>seh</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,8 µl	<i>seh</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,6 µl	<i>sei</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,6 µl	<i>sei</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,6 µl	<i>sej</i> Primer 1 (10 pmol/µl)
0,6 µl	<i>sej</i> Primer 2 (10 pmol/µl)
0,8 µl	16S rDNA Primer 1 (10 pmol/µl)
0,8 µl	16S rDNA Primer 2 (10 pmol/µl)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Nach gründlicher Durchmischung des „Mastermixes“ wurde weiter verfahren wie oben beschrieben.

Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler erfolgte nach 3.4.2.2.1 eine initiale Denaturierung der DNA. Danach kam das folgende Temperaturprogramm zur Anwendung:

15 Zyklen:	Denaturierungstemperatur	95 °C für 60 s
	Anlagerungstemperatur der Primer	68 °C für 45 s
	Verlängerungstemperatur der Primer	72 °C für 60 s
16 Zyklen:	Denaturierungstemperatur	95 °C für 60 s
	Anlagerungstemperatur der Primer	64 °C für 45 s
	Verlängerungstemperatur der Primer	72 °C für 60 s

Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt und die Ergebnisse dokumentiert (3.4.2.2.2).

**Tab. 1** Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer und Thermocyclerprogramme, der erwarteten Amplikongrößen sowie der Referenzliteratur

Zielgen	Primersequenz(5'-3')	Amplikongröße (Bp)	Programme	Referenz
16S rDNA	I:GTA GGT GGC AGG CGT TAT CC II:CGC ACA TCA GCG TCA G	228	30 Zyklen 95 °C-30 s, 55 °C-30 s 72 °C-30 s	Baron et al., 2004
23S rRNA	F:ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC R:AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1251	37 Zyklen 94 °C-40 s, 64 °C-60 s 72 °C-75 s	Straub et al., 1999
<i>nuc</i>	F:GCG ATT GAT GGT GAT ACG GT R:AGC CAA GCC TTC ACG AAC TAA AGC	280	37 Zyklen 94 °C-60 s, 55 °C-30 s 72 °C-30 s	Brakstad et al., 1992
<i>coa</i>	F:ATA GAG ATG CTG GTA CAG G R:GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	Variabel	30 Zyklen 94 °C-60 s, 58 °C-60 s 72 °C-60 s	Hookey et al., 1998
<i>spa</i> (Xr-region)	F:CAA GCA CCA AAA GAG GAA R:CAC CAG GTT TAA CGA CAT	Variabel	30 Zyklen 94 °C-60s, 60 °C-60 s 70 °C-60 s	Frenay et al., 1996
<i>spa</i> (IgG bindende -Region)	F:CAC CTG CTG CAA ATG CTG CG R:GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC	Variabel	30 Zyklen 94 °C-60 s, 58 °C-60 s 72 °C-60 s	Seki et al., 1998
<i>sbi</i>	F:CAC AGA GGA ACA ACG TAA CC R:GAT TTA GCT AAG TAG CCG	956	30 Zyklen 94 °C-60 s, 60 °C-60 s 72 °C-90 s	Moore et al., 2001
<i>clfA</i>	F:GGC TTC AGT GCT TGT AGG R:TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	Variabel	35 Zyklen 94 °C-60 s, 57 °C-60 s 72 °C-60 s	Stephan et al., 2000
<i>fnbA</i>	F:GCG GAG ATC AAA GAC AA R:CCA TCT ATA GCT GTG TGG	1279	30 Zyklen 94 °C-30 s, 50 °C-30 s 72 °C-60 s	Booth et al., 2001
<i>fnbB</i>	F:GGA GAA GGA ATT AAG GCG R:GCC GTC GCC TTG AGC GT	812	30 Zyklen 94 °C-30 s, 50 °C-30 s 72 °C-60 s	Booth et al., 2001
<i>cnaA</i>	F:ATATGAATTCGAGTATAAGGAAGGGTT R:TTTGGATCCCTTTTTCAGTATTAGTAACCA	1600	30 Zyklen 94 °C-30 s, 50 °C-30 s 72 °C-60 s	Switalski et al., 1993
<i>cnaB</i>	F:AGT GGT TAC TAA TAC TG R:CAG GAT AGT TGG TTTA	Variabel	30 Zyklen 94 °C-30 s, 50 °C-30 s 72 °C-60 s	Switalski et al., 1993
<i>ebpS</i>	F:TCA CAT CAA GAC CAT ACG GAA G R:CAA CAT TTT CCG GTG AAC CTGA	1332	20 Zyklen 94 °C-60s, 60 °C-60s 72 °C-90-s	Park et al., 1996
<i>cap5</i>	F:ATG ACG ATG AGG ATA GCG R:CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	880	20 Zyklen 94 °C-15 s, 57 °C-15 s 72 °C-30 s	Moore et al., 2001

<i>cap8</i>	F:ATG ACG ATG AGG ATA GCG R:CAC CTA ACA TAA GGC AAG	1147	20 Zyklen 94 °C-15 s, 52 °C-15 s 72 °C-30 s	Moore et al., 2001
<i>hla</i>	F:CTG GCC TTC AGC CTT TAA GG R:CTG TAG CGA AGT CTG GTG AAA	455	30 Zyklen 94 °C-1 min, 50 °C-1 min 72 °C-1 min	Ando, et al., 2004
<i>h1b</i>	F:GCC AAA GCC GAA TCT AAG R:CGC ATA TAC ATC CCA TGG C	833	20 Zyklen 94 °C-10 s, 62 °C-10 s 72 °C-30 s	Booth et al., 2001
<i>h1d</i>	F:AAGAAATTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG R:TTAGTGAAATTTGTTACACTTGTTCCG	111	30 Zyklen 94 °C-1 min, 50 °C-1 min 72 °C-1 min	Jarraud et al., 2002
<i>h1g</i>	F:GCC AAT CCG TTA TTA GAA AAT GC R:CCA TAG ACG TAG CCA CGG AT	937	30 Zyklen 94 °C-30 s, 55 °C-30 s 72 °C-1 min	Lina et al., 1999
<i>luk E/D</i>	F:TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG R:TGTATTCCGATAGCAAAAGCAGTGC	269	30 Zyklen 94 °C-1 min, 50 °C-1 min 72 °C-1 min	Jarraud et al., 2002
<i>sea</i>	F:AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA R:GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	218	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Tsen et al., 1992
<i>seb</i>	F:TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG R:GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	477	30 Zyklen 94°C-2 min, 55°C-2 min 72°C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>sec</i>	F:GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT R:AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	256	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>sed</i>	F:CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT R:TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	318	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>see</i>	F:TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC R:TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	168	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>seg</i>	F:AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C R:AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	641	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Jarraud et al., 1999
<i>seh</i>	F:CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG R:CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C	371	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Jarraud et al., 1999
<i>sei</i>	F:CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G R:AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C	576	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Jarraud et al., 1999
<i>sej</i>	F:CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG R:CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	141	30 Zyklen 94 °C-60 s, 62 °C-60 s 72 °C-60 s	Monday et al., 1999a
<i>sem</i>	1:TCTTAGGAAC TATTATGGTAGC 2:CCTGCATTAATCCAGAA	471	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Akineden, 2006
<i>sen</i>	1:GGAGTTACGATACATGATGG 2:ACTCTGCTCCCACCTGAAC	292	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Akineden, 2006

<i>seo</i>	1: TGATGATTATATAAATAATCGATTTACG 2: ATATGTACAGGCAGTATCC	249	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Akineden, 2006
<i>ssII</i> ( <i>serI</i> )	F: GGT TAA TTC ATA GCG CAG TATC R: CAA CGT TTC ATC GTT AAG CTG C	879	20 Zyklen 94 °C-30 s, 56 °C-30 s 72 °C-60 s	Salasia et al., 2004
<i>tst</i>	F: ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA R: TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	349	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>efa</i>	F: CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA R: TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT	120	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>efb</i>	F: ACG GCT ATA TAC ATT CAA TT R: TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA	201	30 Zyklen 94 °C-2 min, 55 °C-2 min 72 °C-1 min	Johnson et al., 1991
<i>blaZ</i>	1: ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC 2: TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	40 Zyklen 94 °C-30 s, 55 °C-30 s 72 °C-1 min	Martineau et al., 2002
<i>mecA</i>	1: AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 2: ACT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	533	40 Zyklen 94 °C-30 s, 55 °C-30 s 72 °C-1 min	Lee, 2003

### 3.5 Analyse der mRNA-Expression mittels Reverser Transkriptions-PCR

Die Expression ausgewählter mRNA in einem bestimmten *S. aureus*-Isolat wurde mittels Reverser Transkription (RT) der Gesamt-RNA in cDNA mit anschließender spezifischer Polymerasekettenreaktion für einige Staphylokokken Virulenzfaktorgene (sogenannte "two-step RT-PCR") nachgewiesen.

#### 3.5.1 Präparation der bakteriellen Gesamt-RNA

Die kulturelle Anzuchtung der Isolate erfolgte in BHI-Medium (siehe Anhang) für 24 h bei 37 °C. Je 1 ml des bebrüteten Nährmediums wurde in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die Reste des Mediums durch vorsichtiges Absaugen mit einer Pipette entfernt. Das entstandene Bakterienpellet wurde zur Zellwandlyse in 100 µl TE-Puffer mit dem Zusatz von 20 mg/ml Lysozym und 3 µl Lysostaphin (1,8 U/µl) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (RNeasy mini-Kit, siehe Anhang) und gründlicher Durchmischung wurde das Reaktionsgemisch 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 250 µl Ethanol (96-99%) versetzt und der Ansatz gründlich gemischt.

Die bakterielle Gesamt-RNA wurde nun mit Hilfe eines kommerziellen Testkits (RNeasy mini-Kit) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Das gesamte Lysat (ca. 700 µl) wurde auf eine RNeasy-Säule aufgetragen und 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Zum Waschen wurde 350 µl Puffer RW1 in die Säule pipettiert und diese 15 s bei 6.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 40 µl DNase-I-Mischung (2,5 Kunitz-Einheiten/µl) auf die RNeasy-Säule und eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Erneut wurden 350 µl Puffer RW1 in die RNeasy-Säule pipettiert und für 15 s bei 6.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde als Waschschrift 500 µl Puffer RPE in die RNeasy-Säule pipettiert und 15 s bei 6.000 x g zentrifugiert. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die RNeasy-Säule und Zentrifugation für 1 min bei 10000 x g. Danach erfolgte zur Inaktivierung der DNase eine Inkubation für 10 min bei 70 °C. Die RNA-haltigen Eluate wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

### 3.5.2 Durchführung der Reversen Transkriptions-PCR

Zum Ausschluss einer Kontamination der RNA-Präparationen mit chromosomaler DNA, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte, wurde zunächst eine PCR mit den Oligonukleotidprimern nuc-I und nuc-II unter Verwendung des in Tab. 1 angegebenen Temperaturprogramms durchgeführt. Bei negativem Ergebnis fand eine reverse Transkribierung statt.

Die reverse Transkribierung der RNA zu cDNA erfolgte unter Verwendung sogenannter Zufallsprimer (Random Hexamer Primer; siehe Anhang) und eines kommerziellen Systems (Omniscript™ RT Kit; siehe Anhang) entsprechend den Herstellerangaben.

Zunächst wurden je Transkribierungsansatz 1,0 µl des Extraktes der Gesamt-RNA, 3,0 µl RNase-freies Wasser und 1,0 µl Zufallsprimer zusammengemischt und 10 min bei 70 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert. Anschließend wurden (auf Eis) 15 µl eines RT-Reaktionsgemisches zugegeben, das sich wie in Tab. 2 angegeben zusammensetzte.

Tab. 2: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der RT-PCR

Substanz	Volumen je Testansatz
RNase-freies Wasser	9,0 µl
Reaktionspuffer (5 fach)	2,0 µl
dNTP Mix (je 5 mmol/l)	2,0 µl
RNasin Inhibitor (40 U/µl)	1,0 µl
RT Polymerase (4 U/µl)	1,0 µl

Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz zur Primeranlagerung zunächst für 5 min bei 25 °C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend bei 42 °C für 60 min.

Die so erhaltene cDNA diente nun als „template“ in den folgenden spezifischen PCR-Reaktionen zum Nachweis von SE-Genen bzw. wurde bis zur jeweiligen Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zum Nachweis eines spezifischen SE-Transkripts wurde die in 3.4.2.2 beschriebene PCR angewendet. Die Amplifizierung der cDNA erfolgte unter Verwendung von 2,5 µl des unter 3.5.1 erhaltenen cDNA-Ansatzes mit den in Tab. 1 aufgeführten Primern.

Die PCR-Bedingungen für diese Primerpaare (Anlagerungstemperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Anzahl der Zyklen usw.) entsprachen denjenigen im unter 3.4.2.2 beschriebenen Protokoll.

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte wie in 3.4.2.2.2 beschrieben.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, (DIXON, 1993) durchgeführt. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen Zellzahl, Protein A-Repeats und Koagulase-Repeats mit Hilfe von Korrelations- und Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und der Regressionsgeraden ( $y = m \cdot x + b$ ) bzw. bei semiquantitativen Variablen mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ). Da die statistische Verteilung der Zellzahl wie gewöhnlich eine rechtsschiefe Form aufwies, wurde hier eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt. Bei den quantitativen Merkmalen kam beim Gruppenvergleich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bzw. bei mehr als 2 Gruppen der Kruskal-Wallis-Test unter Verwendung des Programms BMDP3S zum Einsatz. Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden zweidimensionale Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem verallgemeinerten Fisher-Test bzw. dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Hier kam ein Eigenprogramm der AG Biomathematik und DV (Justus-Liebig-Universität Gießen) zum Einsatz.

Zusätzlich wurde eine multivariante Auswertung im Rahmen einer explorativen Datenanalyse vorgenommen, um die wichtigen Virulenzfaktorgene im Hinblick auf die Zielgrößen zu erkennen. Für die qualitativen Zielgrößen geschah dies mit einer multiplen schrittweisen Diskriminanzanalyse mit dem Programm BMD87M, während für die quantitativen Zielgrößen (Zellzahl und Repeats) eine multiple schrittweise lineare Regressionsanalyse (Programm BMDP2R) zum Einsatz kam. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau  $p = 0,05$  zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird – wenn möglich – der exakte p-Wert angegeben.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *S. aureus*-Identifizierung

In die vorliegende Untersuchung wurden 325 *S. aureus*-Feldisolate mit einbezogen. Diese Stämme wurden durch Überprüfung der Koagulase-Aktivität und durch den Nachweis des Thermonuclease-, des Koagulase- und des Protein A-Gens als *S. aureus* identifiziert.

#### 4.1.1 Koagulaseaktivität

Die Koagulaseaktivität wurde mittels Röhrchentest (3.3.1.3) untersucht. Alle 325 untersuchten Kulturen zeigten innerhalb von 24 h eine Koagulation des Kaninchenplasmas und somit eine positive Reaktion.

#### 4.1.2 Nachweis des Thermonuclease-Gens (*nuc*)

Im Weiteren erfolgte die Amplifizierung des Thermonuclease-Gens *nuc* mittels der in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenen PCR. Dies ergab bei allen 325 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit der zu erwartenden einheitlichen Größe von 280 Bp (Abb. 2).



**Abb. 2:** Typisches Amplikon des *nuc*-Gens; 1 – 4 = untersuchte *S. aureus*-Kulturen (Feldisolate); 5 = positive Kontrolle - *S. aureus* ATCC 25923; 6 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = Marker, Simplyload™ 100 Bp DNA Ladder

### 4.1.3 Nachweis des Koagulase-(*coa*) und des Protein A-Gens (*spa*)

Die Gene *coa* und *spa* waren bei allen 325 untersuchten Feldisolaten nachweisbar. Entsprechend der Anzahl der vorhandenen Repeats wurden Amplifikate im Größenbereich von 500, 560, 620, 700, 800, 900 und 970 Bp mit Repeatanzahlen von 2 bis 8 (*coa*) bzw. in der Größe von 100, 120, 150, 170, 200, 220, 240, 270, 290, 320 und 350 Bp mit Repeatanzahlen von 2 bis 12 (*spa*) nachgewiesen. Die durchgeführten PCR-Untersuchungen wurden zur Speziesidentifizierung und auch zur Stammtypisierung (4.5) genutzt. Die Resultate sind eingehend in Tab. 3 und 4 dargestellt.

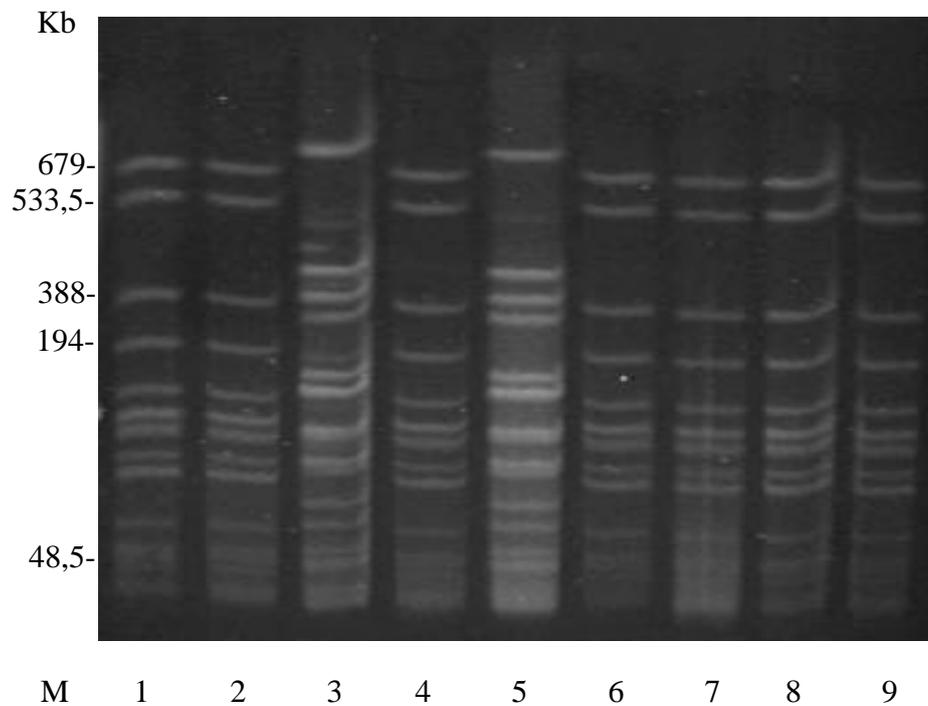
## 4.2 Phänotypische Hämolyse

Bei 310 der 325 *S. aureus*-Feldisolate war nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten eine Hämolyse feststellbar, 15 Stämme erwiesen sich als anhämolysierend. Die 310 hämolysierenden Isolate wurden für weiterführende Untersuchungen herangezogen (Kapitel 4.3 bis 4.5)

## 4.3 Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse

Nach Restriktionsanalyse der chromosomalen DNA der 310 *S. aureus*-Kulturen unter Verwendung der PFGE konnten nach der Fragmentauftrennung insgesamt 15 DNA-Restriktionsmuster (Muster A bis O) differenziert werden. Dabei waren in der Elektrophorese zwischen 9 und 15 Banden darstellbar. Die Restriktionsmuster wurden visuell beurteilt (3.4.1.4). Die Verteilung der verschiedenen Muster auf die einzelnen Betriebe ist in Tab. 5 dargestellt.

Abb. 3 und Abb. 4 zeigen beispielhaft die Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse von *S. aureus*-Feldstämmen zweier Betriebe.



**Abb. 3:** Makrorestriktionsanalyse von 9 *S. aureus*-Kulturen (1 bis 9) aus dem Betrieb Nr. 23. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, liessen sich die untersuchten Isolate den 2 Fragmentmustern A (1, 2, 4, 6 bis 9) und F (3 und 5) zuordnen; M = Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb)

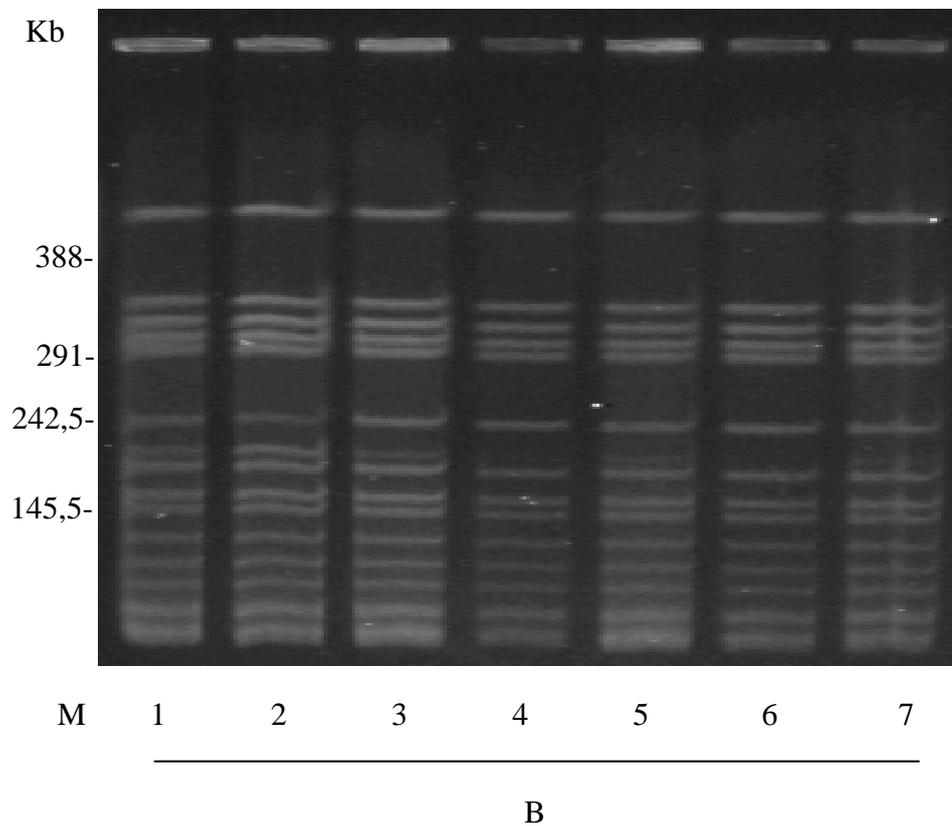


Abb. 4: Makrorestriktionsanalyse von sieben *S. aureus*-Kulturen (1 bis 7) aus dem Betrieb Nr. 29. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, konnten alle 7 Feldisolate dieses Betriebes einem Fragmentmuster (Muster B) zugeordnet werden; M = siehe Abb. 3

#### 4.4 Ergebnisse der Untersuchung des Koagulase-Gen-Polymorphismus

Nach Amplifizierung mit der unter 3.4.2.2.1 beschriebenen PCR wurde bei einem Teil der *S. aureus*-Stämme (Herkunft aus unterschiedlichen Betrieben) mit identischen PFGE-Muster und gleicher Größe des *coa*-Amplikons ein Restriktionsverdau mittels *AluI* (3.4.2.3.) durchgeführt. Diese Stämme sind in Tab. 3 gesondert gekennzeichnet. Waren unterschiedliche Amplikons nachweisbar, wurde kein Restriktionsverdau durchgeführt.

Der Nachweis unterschiedlicher Koagulase-Gen-Muster erfolgte somit anhand der Größe der Amplifikate bzw. der Genfragmente nach *AluI*-Behandlung. Insgesamt ließen sich mittels dieser Methode 16 Koagulase-Gen-Typen differenzieren. Die Größe der Amplikons betrug 500, 560, 620, 700, 800, 900 bzw. 970 Bp.

Im Einzelnen waren bei 9 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 500 Bp, entsprechend 2 Repeats, bei 9 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 560 Bp, entsprechend 3 Repeats, bei 89 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 620 Bp, entsprechend 4 Repeats, bei 31 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 700 Bp, entsprechend 5 Repeats, bei 5 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 800 Bp, entsprechend 6 Repeats, bei 29 Kulturen ein Amplikon in der Größe von 900 Bp, entsprechend 7 Repeats und bei 138 Kulturen jeweils ein Amplikon in der Größe von 970 Bp, entsprechend 8 Repeats, nachweisbar. Die Größe der Fragmente nach *AluI*-verdau sind in Tab. 3 dargestellt.

Von den insgesamt 16 ermittelten Koagulase-Gen-Typen kamen 10 in unterschiedlichen Betrieben gleichzeitig vor. Die übrigen Typen waren in jeweils nur einem Bestand nachzuweisen.

Der häufigste Typ 1 war bei 83 Isolaten (26,8%) aus 16 Beständen nachweisbar. Typ 5 wurde 39 Isolaten (12,6%) aus 12 Beständen zugeordnet.

Auf diese beiden Typen entfielen 39,4% der untersuchten Isolate, während die übrigen Koagulase-Gen-Typen nur bei jeweils wenigen Isolaten nachweisbar waren.

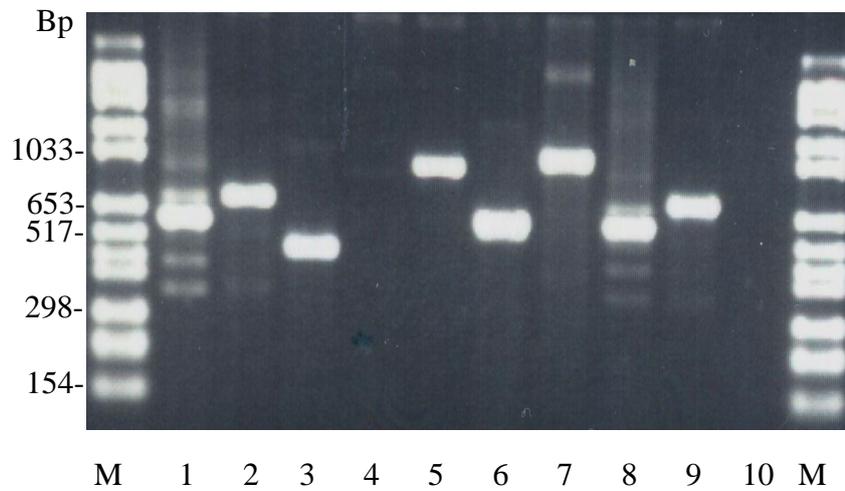
In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Koagulase-Gen-Polymorphismus-Untersuchung und in Abb. 5 typische Amplifikate des Koagulase-Gens dargestellt. Die Abb. 6 und Abb. 7 zeigen unterschiedliche Fragmente der Koagulase-Gen-Amplifikate nach *AluI*

Restriktionsverdau. Es handelt sich jeweils um identische Koagulase-Gen-Typen aus jeweils einem Milcherzeugerbetrieb.

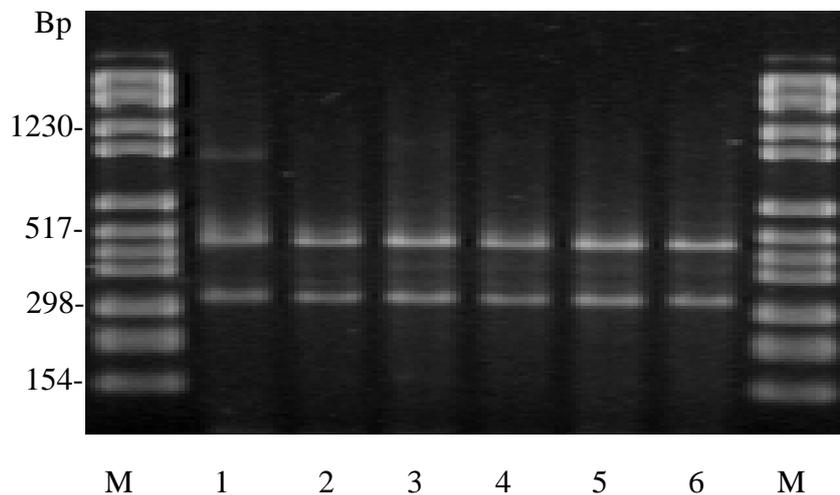
**Tab. 3:** Größe und Häufigkeit der Amplifikate bzw. der Restriktionsfragmente der Koagulase-Gen-PCR

Typ	Amplikons Bp	Repeats	Fragmentgröße	Betrieb Nr. (Anzahl der Isolate)	Anzahl der <i>S. aureus</i>
1	970	8	970	1(9), 8(9), 13(9), 14(8), 30(9), 33(8), 22(2), 37(1), 50(1), 27(1), 17(7), 26(8), 34(1), 24(8), 15(1), 3(1)	83 <sup>1</sup>
2	970	8	480-320-160	2(8), 18(8)	16 <sup>2</sup>
3	970	8	380-240	21(8), 19(9)	17 <sup>3</sup>
4	970	8	480-320	23(7), 28(8), 5(7)	22 <sup>4</sup>
5	620	3	620	3(8), 11(9), 14(1), 15(7), 23(2), 24(1), 31(7), 36(1), 41(1), 42(1), 51(1)	39 <sup>5</sup>
6	620	3	620-400-230	4(9)	9 <sup>6</sup>
7	620	3	480-400	6(7)	7 <sup>7</sup>
8	620	3	620-400	12(8), 27(8), 32(9)	25 <sup>8</sup>
9	620	3	620-320	16(9)	9 <sup>9</sup>
10	500	2	500	7(9)	9 <sup>10</sup>
11	560	3	560	34(8), 49(1)	9 <sup>11</sup>
12	700	4	700	2(1), 9(9), 10(8), 28(1), 39(1), 40(1), 46(1), 47(1), 20(1)	24 <sup>12</sup>
13	700	4	400-320-220	29(7)	7
14	800	6	800	38(1), 43(1), 45(1), 48(1), 52(1)	5 <sup>13</sup>
15	900	7	900	5(1), 6(2), 20(7), 25(9), 21(1), 35(1), 44(1),	22 <sup>14</sup>
16	900	7	500-220	22(7)	7 <sup>15</sup>
				Insgesamt	310

Ein *AluI*- Restriktionsverdau wurde bei: <sup>1</sup>31, <sup>2</sup>16, <sup>3</sup>17, <sup>4</sup>22, <sup>5</sup>21, <sup>6</sup>9, <sup>7</sup>7, <sup>8</sup>25, <sup>9</sup>9, <sup>10</sup>9, <sup>11</sup>9, <sup>12</sup>8, <sup>13</sup>5, <sup>14</sup>7 und <sup>15</sup>7 Stämmen durchgeführt



**Abb. 5:** Typische Amplikons des Koagulase-Gens *coa* von 10 *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 500 Bp (3), 620 Bp (1, 6 und 8), 700 Bp (2), 900 Bp (5), 970 Bp (7); 9 = positive Kontrolle-*S. aureus* ATCC 25923; 4 = negative Kontrolle-*S. epidermidis* ATCC 14990; 10 = Leerwert; M = Marker, DNA-Längenstandard IV



**Abb. 6:** Fragmente der Koagulase-Gen-Amplifikate von sechs Isolaten aus Betrieb Nr. 5 nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *AluI* (1 - 6); M = siehe [Abb. 5](#)

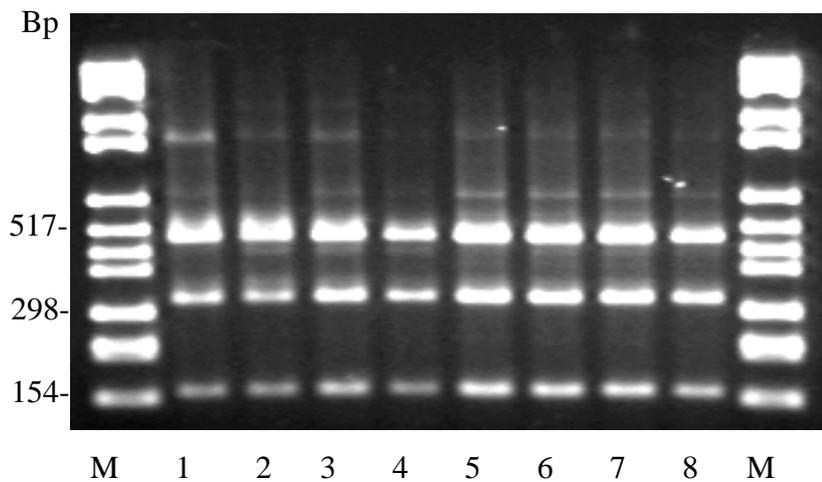


Abb. 7: Fragmente von acht Koagulase-Gen-Amplifikaten aus Betrieb Nr. 18 nach Restriktionsverdau mit *AluI* (1 - 8); M = siehe Abb. 5

#### 4.5 Ergebnisse der Untersuchung des Protein A-Gen-Polymorphismus

Bei allen 310 hämolysierenden *S. aureus*-Kulturen wurde zum Nachweis des Protein A-Gens eine PCR durchgeführt (3.4.2.2). Die Amplifizierung des die X-Region kodierenden Teils erfolgte mit den unter 3.4.2.2.1 beschriebenen Oligonukleotidprimern unter Verwendung des dort beschriebenen Thermocycler-Temperaturprogrammes.

Bei allen 310 untersuchten *S. aureus*-Isolaten war jeweils ein Amplifikat nachweisbar, deren Größe von 100 bis 350 Bp variierte. In Abb. 8 sind einige typische Amplikons dargestellt. Insgesamt ließen sich 11 Typen unterscheiden. Nach ANNEMÜLLER (1999) und SOMMERHÄUSER (2001) wurde die Anzahl der Repeats mathematisch bestimmt. Die 11 unterschiedlichen Protein A-Typen entsprachen 2 bis 12 Repeats. Am häufigsten nachweisbar war der Protein A-Typ 1 (n = 59). In 33 Betrieben fand sich lediglich ein Protein A-Gen-Typ. In 18 Betrieben waren 2 Typen nachweisbar. In nur einem Betrieb konnten 3 Gentypen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Protein A-Gen-Typisierung sind zusammenfassend in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Häufigkeit der ermittelten Protein A-Typen

Typ	Amplikons Bp	Repeats	Betrieb Nr. (Anzahl der Isolate)	Anzahl der <i>S. aureus</i>
1	100	2	3(4), 8(3), 10(8), 12(1), 13(2), 16(1), 17(7), 18(1), 20(1), 21(8), 27(8), 29(7), 32(2), 37(1), 40(1), 42(1), 46(1), 49(1), 50(1)	59
2	120	3	9(1), 13(7), 15(8), 20(5), 22 (1), 24(8), 28(8), 34(1), 35(1), 36(1), 43(1), 44(1), 47(1), 48(1), 52(1)	46
3	150	4	22 (8), 26 (8), 31(7), 45(1)	24
4	170	5	1(1), 3(5), 5(8), 21(1), 24(1), 30(9), 11(9), 41(1)	35
5	200	6	2(1), 7(1), 16(8), 14(9), 20(2), 27(1)	22
6	220	7	32(7)	7
7	240	8	2(8), 1(8), 18(7), 19(9), 23(9),	41
8	270	9	7(8), 8(6), , 28(1), 38(1)	16
9	290	10	4(9), 6(9), 9(8), 12(7), 25(9), 34(8),	50
10	320	11	39(1), 51(1)	2
11	350	12	33(8)	8
			Insgesamt	310

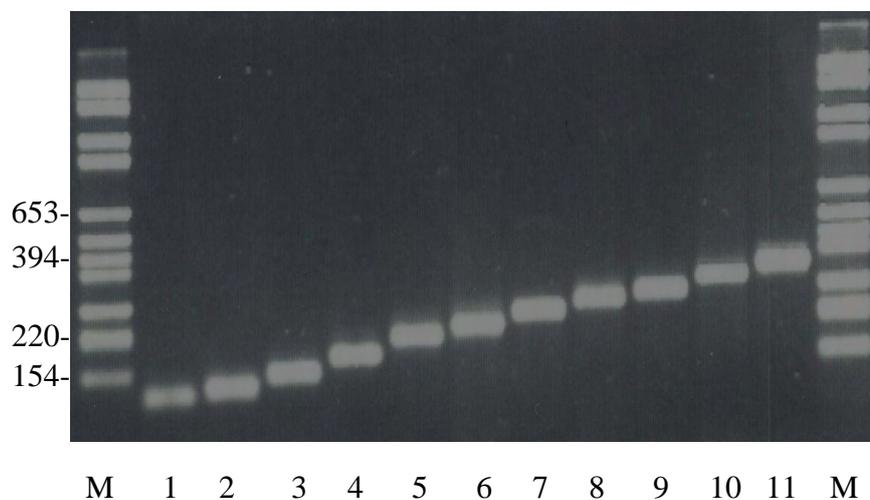


Abb. 8: Typische Amplikons des die X-Region kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa* von 11 *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 100 Bp (1), 120 Bp (2), 150 Bp (3), 170 Bp (4), 200 Bp (5), 220 Bp (6), 240 Bp (7), 270 Bp (8), 290 Bp (9), 320 Bp (10), 350 Bp (11); M = siehe [Abb. 5](#)

#### 4.6 Zusammenfassung der Genotypisierung

Bei der Kombination aller 3 angewandten molekularen Typisierungsverfahren (Makrorestriktionanalyse, Koagulase-Gen- und Protein A-Gen-Polymorphismus) waren insgesamt 61 *S. aureus*-Typen unterscheidbar. Die Typenbezeichnung erfolgte durch fortlaufende Nummerierung (1 - 61). In Tab. 6 sind alle unterscheidbaren *S. aureus*-Typen und ihre genotypischen Eigenschaften aufgeführt. Trat das betroffene *S. aureus*-Isolat bei 7 bis 9 untersuchten Kulturen pro Betrieb mindestens 6 Mal auf, wurde das betreffende Feldisolat als „epidemisch“ gewertet. Vereinzelt auftretende Genotypen innerhalb eines epidemischen Infektionsgeschehens wurden als „sporadisch I“ bezeichnet.

Einzelisolate aus Beständen ohne *S. aureus*-bedingte Eutergesundheitsstörungen bzw. eutergesunder Betriebe wurden als „sporadisch II“ klassifiziert. Alle weitergehenden phänotypischen und genotypischen Untersuchungen, sowie die Untersuchungen auf Gene mutmaßlicher Virulenzfaktoren wurden ausschließlich auf der Basis dieser 61 genotypisch unterschiedlichen Isolate sowie der 15 anhämolysierenden Stämme (n = 76) durchgeführt.

In den 34 *S. aureus*-Problembetrieben mit Verdacht auf ein epidemisches Infektionsgeschehen („epidemische“ *S. aureus*) sowie bei einzelnen sporadisch auftretenden *S. aureus* dieser Betriebe („sporadisch I“) waren insgesamt sieben Makrorestriktionsmuster (Muster A bis G) unterscheidbar. Die Makrorestriktionsanalyse der aus 15 verschiedenen Betrieben stammenden „sporadisch II“ *S. aureus*-Isolate ergaben 8 davon unterschiedliche Muster (Muster H bis O).

Bei den als „epidemisch“ klassifizierten Isolaten verteilten sich die Muster wie folgt:  
Muster A: 5 Isolate (14,7%); Muster B: 3 Isolate (8,8%); Muster C: 7 Isolate (20,6%); Muster D: 4 Isolate (11,8%); Muster E: 5 Isolate (14,7%); Muster F: 4 Isolate (11,8%) und Muster G: 6 Isolate (17,6%).

Für die „sporadisch I“-Isolate fand sich folgende Verteilung:

Muster B: 1 Isolat (8,3%); Muster C: 3 Isolate (25%); Muster D: 3 Isolate (25%);  
Muster F: 2 Isolate (16,7%) und Muster G: 3 Isolate (25%).

In den 15 Herden mit Nachweis von *S. aureus*-Stämmen der Gruppe „sporadisch II“ war folgende Verteilung nachweisbar:

Muster B: 1 Isolat (6,7%); Muster D: 1 Isolat (6,7%); Muster F: 2 Isolate (13,3%);  
Muster H: 2 Isolate (13,3%); Muster I: 1 Isolat (6,7%); Muster J: 2 Isolate (13,3%);  
Muster K: 1 Isolat (6,7%); Muster L: 1 Isolat (6,7%); Muster M: 2 Isolate (13,3%);  
Muster N: 1 Isolat (6,7%) und Muster O: 1 Isolat (6,7%).

Eine zusammenfassende Darstellung der Betriebe, der ermittelten Makrorestriktionsmuster sowie der Anzahl identischer Isolate/Herde wird in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Beziehung zwischen Genotyp und Herkunft der *S. aureus*-Isolate

PFGE-Genotyp	„epidemische“ Betriebe		„sporadische“ Betriebe	Isolate	
	„epidemische“	„sporadisch I“	„sporadisch II“	n	%
A	5	-	-	40	12,9
B	3	1	1	27	8,7
C	7	3	-	61	19,7
D	4	3	1	45	14,5
E	5	-	-	42	13,6
F	4	2	2	32	10,3
G	6	3	-	51	16,6
H	-	-	2	2	0,6
I	-	-	1	1	0,3
J	-	-	2	2	0,6
K	-	-	1	1	0,3
L	-	-	1	1	0,3
M	-	-	2	3	1,0
N	-	-	1	1	0,3
O	-	-	1	1	0,3

Tab. 6: Zusammenfassende Darstellung der 61 *S. aureus*-Typen

Typ	PFGE Typ	Koagulase-Typ	Protein A-Typ	Typ	PFGE Typ	Koagulase-Typ	Protein A-Typ
1	A	1	7	32	E	11	9
2	A	3	7	33	F	12	10
3	A	2	7	34	F	12	7
4	A	15	9	35	F	5	7
5	A	4	7	36	F	15	2
6	B	8	1	37	F	16	3
7	B	12	1	38	F	5	3
8	B	13	1	39	F	1	1
9	B	9	1	40	F	3	1
10	B	1	1	41	F	5	1
11	C	5	4	42	G	5	4
12	C	1	4	43	G	1	8
13	C	15	4	44	G	10	8
14	C	1	3	45	G	2	7
15	C	5	5	46	G	15	5
16	C	4	2	47	G	1	11
17	C	12	2	48	G	1	2
18	C	1	2	49	G	15	4
19	C	5	2	50	G	15	9
20	D	14	8	51	H	5	2
21	D	9	5	52	H	15	2
22	D	1	5	53	I	12	1
23	D	4	4	54	J	12	2
24	D	8	6	55	J	14	2
25	D	1	2	56	K	14	2
26	D	1	4	57	L	11	1
27	D	1	1	58	M	14	2
28	E	12	9	59	M	14	1
29	E	7	9	60	N	5	1
30	E	6	9	61	O	15	2
31	E	8	9				

## 4.7 Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung

Die 76 ausgewählten *S. aureus*-Isolate (61 hämolysierende, 15 anhämolysierende) wurden zunächst phänotypisch eingehender charakterisiert.

### 4.7.1 Hämolysiformen

Die Beurteilung der Hämolysiform der 76 *S. aureus*-Kulturen erfolgte nach Anzüchtung auf Columbia-Schafblutagar (3.3.1.1).

Hierbei zeigten von den 34 „epidemischen“-Stämmen 9 (26,5%) eine  $\beta$ -, 11 (32,3%) eine  $\alpha$ -, 4 (11,8%) eine  $\alpha\beta$ - und 10 (29,4%) eine  $\delta$ -Hämolysiform. Von den 12 „sporadisch I“- Stämmen waren 4 (33,3 %)  $\beta$ -, 1 (8,3%)  $\alpha$ - und 7 Stämme (58,4%)  $\alpha\beta$ -hämolysitisch. Bei den 15 „sporadisch II“-Stämmen war bei 7 (46,7 %) eine  $\beta$ -, bei 2 (13,3%) eine  $\alpha$ -, bei 5 (33,3%) eine  $\alpha\beta$ - und nur bei einem Stamm (6,7%) eine  $\delta$ -Hämolysiform nachweisbar. Bei den anhämolysierenden Isolaten konnte auf Columbia-Schafblutagar keine Hämolysiform nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Bestimmung der Hämolysiform sind in Tab. 7 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 7: Hämolysiformen der 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen

Gruppe	Anzahl	Hämolysiform			
		$\alpha$	$\beta$	$\alpha\beta$	$\delta$
epidemisch	34	11	9	4	10
sporadisch I	12	1	4	7	0
sporadisch II	15	2	7	5	1
anhämolysitisch	15	-	-	-	-

### 4.7.2 Wachstum auf Baird-Parker-Agar

Alle 76 *S. aureus*-Kulturen wurden im Weiteren auf ihr Wachstum auf dem in 3.3.1.2 beschriebenen Staphylokokken-Selektivmedium (Baird-Parker-Agar) geprüft. Alle 76 untersuchten *S. aureus*-Isolate wuchsen in kleinen, schwarzen und glänzenden Kolonien mit klaren Lysishöfen, was auf das Lipolysevermögen der Kulturen hinweist.

Der Durchmesser der Kolonien betrug ca. 1 bis 5 mm. Nach 24 h war der Lysishof bei 65 Kulturen erkennbar, bei 11 Kulturen trat der Lysishof erst nach 48 h auf.

#### 4.7.3 Clumping-Factors

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Clumping-Factors (3.3.1.4). Alle 76 untersuchten Kulturen zeigten unter Verwendung von Kaninchenplasma eine positive Clumping-Factor-Reaktion.

#### 4.7.4 Untersuchung mittels MASTASTAPH-Testkit

Die Untersuchung erfolgte wie bei 3.3.1.5 beschrieben. Alle 76 Kulturen reagierten im MASTASTAPH-Test positiv.

#### 4.7.5 DNase

Mit dem unter 3.3.1.6.1 beschriebenen DNase-Testagar war der Enzymnachweis bei allen 76 untersuchten Kulturen positiv.

#### 4.7.6 Hyaluronidase

Der Hyaluronidase-Nachweis (3.3.1.6.2) war ebenso bei allen 76 Kulturen positiv.

Alle 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen zeigten nach der phänotypischen Prüfung typische Eigenschaften von *S. aureus*. Die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der ausgewählten *S. aureus*-Isolate (n = 76)

Eigenschaft	Isolate mit positiver Reaktion
Clumping-Factors	76
MASTASTAPH-Testkit	76
DNase-Nachweis	76
Hyaluronidase	76

#### 4.8 Biotypisierung

Die Biotypisierung (3.3.2) der 76 *S. aureus*-Isolate erfolgte durch den Nachweis der Fähigkeit zur Koagulation von bovinem Plasma (3.3.2.1), dem Wachstumsverhalten auf einem Kristallviolett-haltigen Agar (3.3.2.2) und dem Nachweis des  $\beta$ -Hämolysins (3.3.1.1).

Dabei wiesen 39 (51,3%) der 76 *S. aureus*-Isolate eine Koagulation von bovinem Plasma auf. 67 Isolate (88,2%) ließen sich dem Kristallviolett-Typ A und 9 Isolate (11,8%) dem Typ E zuordnen. Kristallviolett-Typ C war nicht nachweisbar. Nach DEVRIESE (1984) liegt das Ökovar *bovis* vor, wenn Rinderplasma nach 4 h koaguliert wird, der Kristallviolett-Typ A vorliegt und das  $\beta$ -Hämolysin gebildet wird. Lediglich 19 der 76 untersuchten Stämme konnten dem Biotyp *bovis* zugeordnet werden. Die weitaus größte Anzahl der Isolate (n = 57) wurde den nicht wirtspezifischen Biotypen 2 - 7 („sonstige“; Tab. 9) zugeordnet.

Tab. 9: Merkmale der ermittelten sieben Biotypen

Biotyp	Koagulation von bovinem Plasma	Kristallviolett-Typ	$\beta$ -Hämolysin	Anzahl		Ökovar
				n	%	
1	+	A	+	19	25	<i>bovis</i>
2	+	A	-	18	23,7	sonstige
3	-	A	+	16	21,1	sonstige
4	-	A	-	14	18,4	sonstige
5	+	E	-	2	2,6	sonstige
6	-	E	+	1	1,3	sonstige
7	-	E	-	6	7,9	sonstige

#### 4.9 Nachweis *S. aureus*-spezifischer Gene bzw. Genabschnitte mittels PCR

Eine weitergehende Identifizierung und Charakterisierung der 76 untersuchten Kulturen erfolgte durch PCR-vermittelten Nachweis speziesspezifischer Genabschnitte (3.4.2.2).

##### 4.9.1 Nachweis des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens

Die Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens mit den unter Tab. 1 beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab für alle 76 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1250 Bp (Abb. 9).

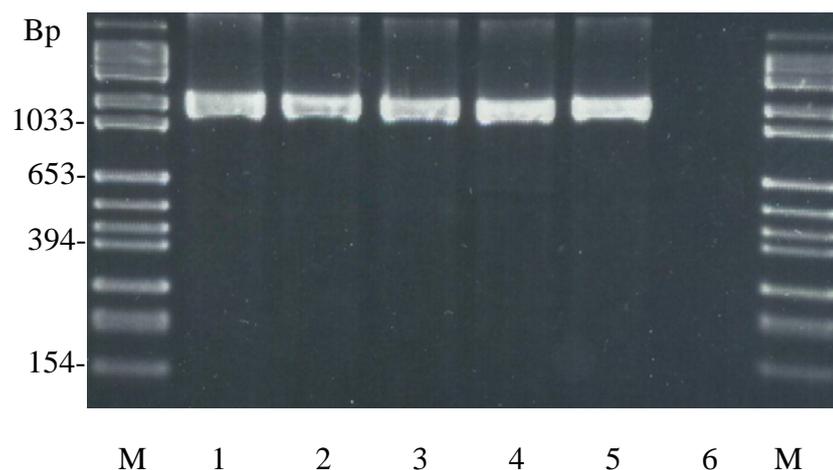


Abb. 9: Typisches Amplikon des *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens; 1 - 4 = untersuchte *S. aureus*-Kulturen (Feldisolate); 5 = positive Kontrolle - *S. aureus* ATCC 25923; 6 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 5

#### 4.9.2 Nachweis des Clumping-Factor-Gens

Alle 76 Kulturen zeigten mit der unter 3.4.2.2 beschriebenen konventionellen PCR *S. aureus*-spezifische *clf*-Gen-Amplifikate.

Bei 32 (94%) der „epidemischen“ Stämme zeigten sich Amplifikate mit einer Größe von ca. 1000 Bp. Lediglich bei 2 (5,9%) der untersuchten „epidemischen“ Stämme ergab sich ein Amplifikat von ca. 900 Bp. Bei den „sporadisch I“- „sporadisch II“- und anhämolysierenden Stämmen hatten alle Amplifikate (100%) eine Größe von ca. 1000 Bp (Abb. 10).

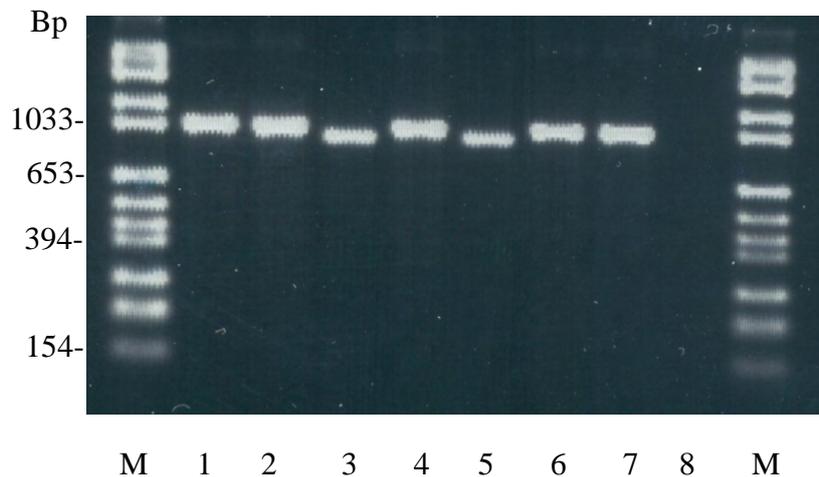


Abb. 10: Amplikons des Clumping-Faktor-Gens mit Größen von ca. 1000 Bp (1, 2, 4, 6) und von ca. 900 Bp (3 und 5); 1 - 7 = untersuchte *S. aureus*-Kulturen (Feldisolate); 7 = positive Kontrolle - *S. aureus* ATCC 25923; 8 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 5

#### 4.10 Nachweis von mutmaßlichen Virulenzfaktorgenen

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Untersuchung der 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen hinsichtlich des Vorkommens von mutmaßlichen Virulenzfaktorgenen zusammengestellt. Zur übersichtlichen Darstellung sind die Ergebnisse getrennt nach den unterschiedlichen Virulenzfaktorgruppen in Tabellenform aufgeführt.

##### 4.10.1 IgG-bindende-Region kodierender Teil des Protein A-Gens *spa*

Bei der Amplifizierung des die IgG-bindende-Region kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa* wiesen bei der „epidemischen“ Gruppe 30 (88,3%) der untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 920 Bp auf, 3 Kulturen (8,8%) Amplifikate in der Größe von 560 Bp und 1 Kultur (2,9%) ein Amplikon in der Größe von 380 Bp auf. Bei „sporadisch I“ waren 11 Amplifikate (91,7%) 920 Bp und ein Amplikon (8,3%) 380 Bp groß. Bei „sporadisch II“ waren 13 Amplifikate (86,7%) mit einer Größe von 920 Bp und zwei Amplifikate (13,3%) mit einer Größe von 380 Bp nachweisbar. Innerhalb der anhämolysierenden *S. aureus* wurden bei 13 Kulturen (86,7%) Amplifikate mit einer Größe von 920 Bp und bei zwei Kulturen Amplifikate in der Größe von 560 (13,3%) Bp gefunden (Abb. 11).

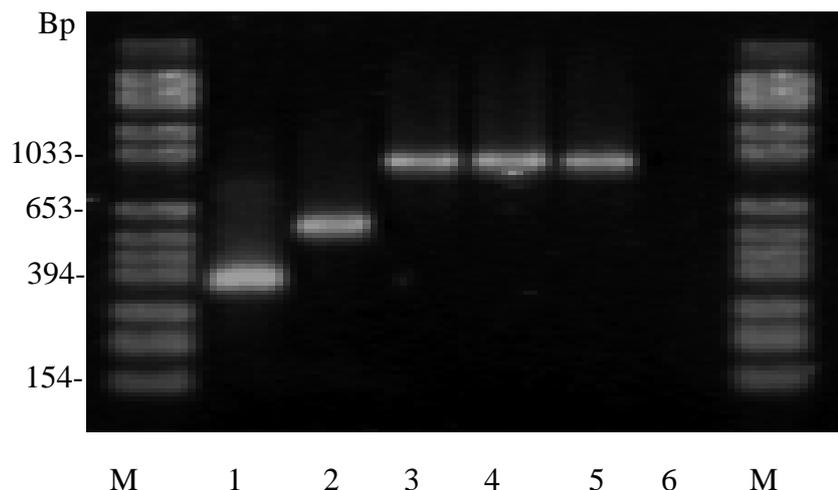
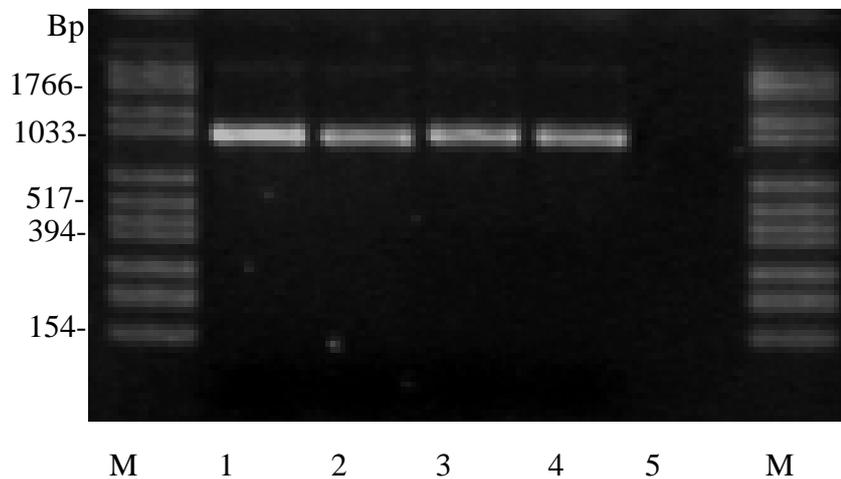


Abb. 11: Typische Amplikons des die IgG-bindende Region kodierenden Teils des Protein A-Gens *spa* von fünf *S. aureus*-Isolaten (Feldisolate) (1 = 380 Bp, 2 = 560 Bp, 3 - 5 = 920 Bp); 6 = Leerwert; M = siehe Abb. 5

#### 4.10.2 Second IgG-binding Protein

Das *sbi*-Gen wurde wie unter [3.4.2.2.](#) beschrieben mittels PCR nachgewiesen. In [Abb. 12](#) sind typische Amplikons des *sbi*-Gens von 4 untersuchten *S. aureus*-Kulturen dargestellt. Das Amplikon hat eine Größe von ca. 950 Bp.

Von 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnte bei 21 (27,6%) Stämmen das *sbi*-Gen nachgewiesen werden.



[Abb. 12](#): Typisches Amplikon des *sbi*-Gens von vier *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 950 Bp (1 - 4); 5 = *sbi*-negative Kultur; M = siehe [Abb. 5](#)

#### 4.10.3 Anheftungsfaktoren-kodierende Gene

Zum Nachweis von *S. aureus*-spezifischen Genen die Anheftungsfaktoren kodieren, wurde jeweils ein Einzel-PCR-System angewendet. Die Ergebnisse sind in [Tab. 10](#) zusammengestellt.

#### 4.10.3.1 Fibronektin-bindendes Protein A und B

Zum Nachweis der *fnb*-Gene A und B wurde die bei 3.4.2.2 beschriebene PCR-Technik angewendet. Im Falle des Nachweises entsprechender Gene ergaben sich die in Abb. 13 und Abb. 14 dargestellten Amplifikate mit einer Größe von ca. 1280 Bp (*fnbA*) bzw. von ca. 810 Bp (*fnbB*). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. 10 und Tab. 11 zusammenfassend dargestellt. Die statistische Auswertung der Einzelergebnisse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem *fnbB*-Gennachweis, der phänotypischen Ausbildung einer  $\delta$ -Hämolyse und dem bovinen Biotyp. Alle übrigen Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

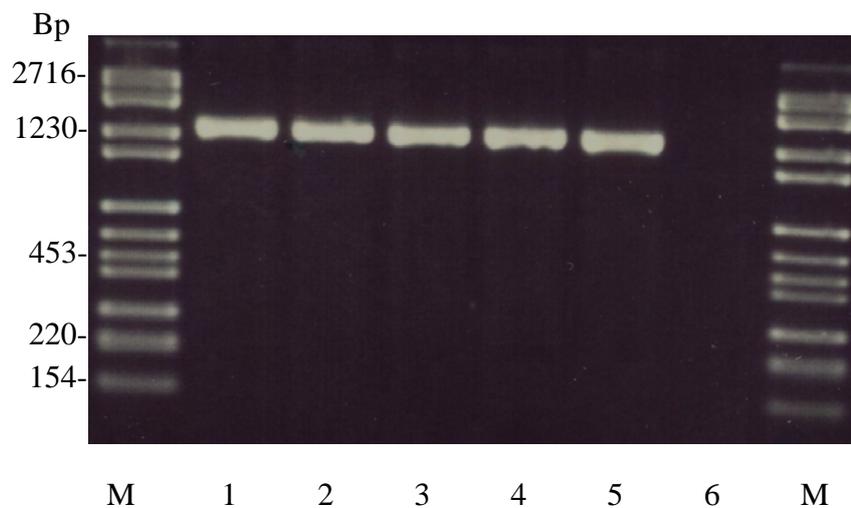


Abb. 13: Amplikons des FnBp-kodierenden Gens *fnbA* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 1280 Bp (1 - 4); 5 = positive Kontrolle - *S. aureus* ATCC 25923; 6 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 5

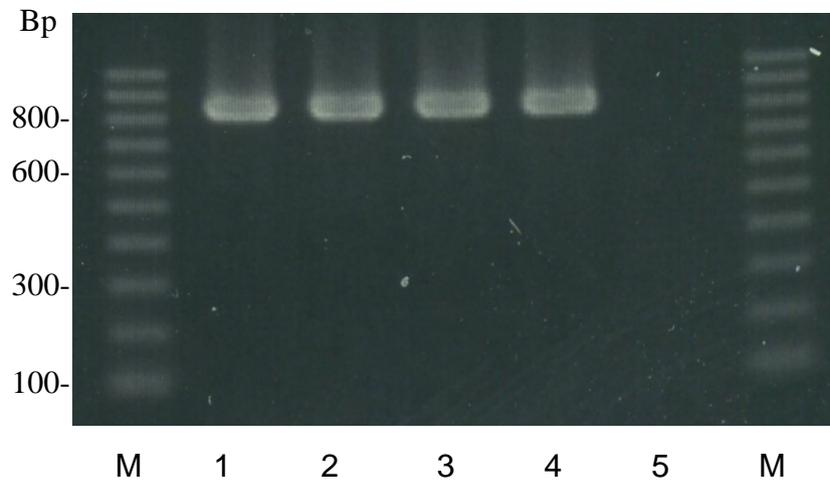
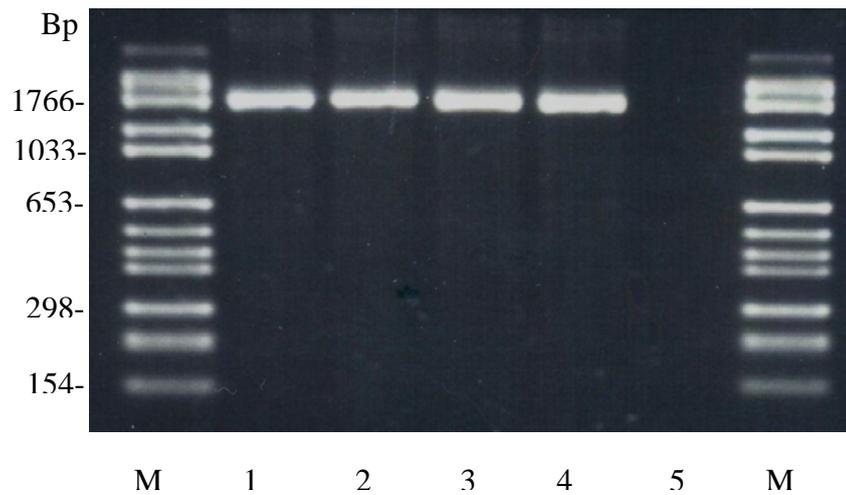


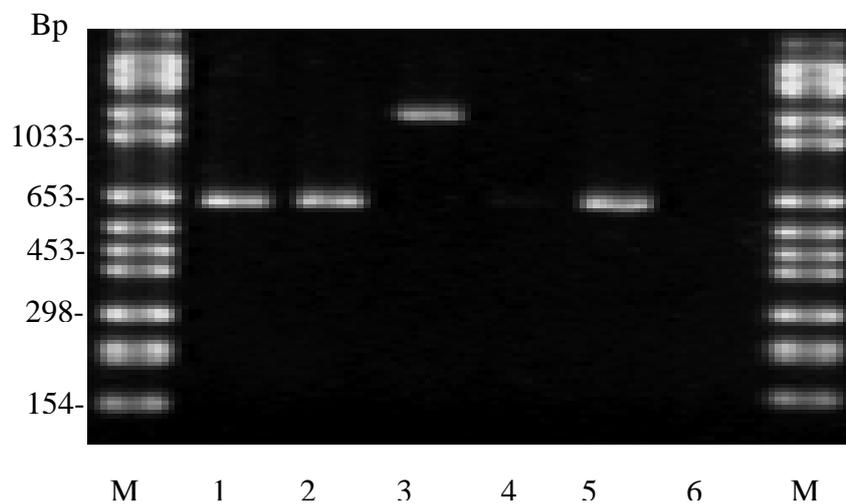
Abb. 14: Amplikons des FnBp-kodierenden Gens *fnbB* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 810 Bp (1 - 4); 5 = *fnbB*-negative Kultur; M = siehe Abb. 2

#### 4.10.3.2 Kollagen-bindendes Protein

Mittels der bei 3.4.2.2 beschriebenen PCR-Technik wurden die 76 *S. aureus*-Kulturen im Weiteren auf die *cna*-Genabschnitte A und B untersucht. In Abb. 15 ist ein typisches Amplikon des *cnaA*-Genabschnitte mit einer Größe von 1600 Bp dargestellt. Ein typisches Amplifikat des *cnaB*-Genabschnitte ist in Abb. 16 zu sehen. Auf Grund von Genpolymorphismen sind Amplifikatgrößen von 640 Bp und 1200 Bp als spezifisch zu werten. Eine zusammenfassende Darstellung des *cna*-Gen-Nachweises der 76 Feldisolate ist in Tab. 10 dargestellt. Tab. 11 zeigt die Zusammenhänge zwischen dem positiven *cna*-Nachweis, der durchschnittlichen Zellzahl und der durchschnittlichen Anzahl der *coa/spa*-Gen-Repeats.



**Abb. 15:** Typische Amplikons des Abschnittes A des CNA-kodierenden Gens *cnaA* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 1600 Bp (1 - 4); 5 = *cna*-negative *S. aureus*-Kultur; M = siehe [Abb. 5](#)



**Abb. 16:** Typische Amplikons des Abschnittes B des CNA-kodierenden Gens *cnaB* einiger *S. aureus*-Kulturen mit Größen von ca. 640 Bp (1, 2 und 5) und 1200 Bp (3); 4 und 6 = *cna*-negative *S. aureus*-Kulturen; M = siehe [Abb. 5](#)

Tab. 10: Statistische Korrelation von epidemiologischem Verhalten, Hämolyseverhalten und Biotyp der 76 *S. aureus*-Isolate mit dem Nachweis verschiedener Anheftungsfaktor-Gene.

		Anheftungsfaktor-Gene							
		<i>fnbA</i>		<i>fnbB</i>		<i>cnaA</i>		<i>cnaB</i>	
<b>S. aureus-Gruppe</b>	untersucht	+	-	+	-	+	-	+	-
Gesamt	76	76	0	38	38	12	64	12	64
<b>Epidemiologisches Verhalten (n = 61)</b>									
Epidemisch	34	34	0	15	19	3	31	3	31
Sporadisch	27	27	0	13	14	7	20	7	20
I	12	12	0	7	5	4	8	4	8
II	15	15	0	6	9	3	12	3	12
<b>Hämolyseverhalten (phänotypisch) (n = 76)</b>									
Anhämolisierend	15	15	0	10	5	2	13	2	13
Hämolyse	61	61	0	28	33	10	51	10	51
α	14	14	0	5	9	2	12	2	12
β	20	20	0	6	14	4	16	4	16
αβ	16	16	0	6	10	4	12	4	12
δ	11	11	0	11*	0	0	11	0	11
<b>Biotypisierung (n = 76)</b>									
Boviner Biotyp	19	19	0	8*	11	6	13	6	13
Nicht-boviner Biotyp	57	57	0	30	27	6	51	6	51

\* statistisch signifikant

Tab. 11: Statistische Korrelation zwischen durchschnittlicher Zellzahl (Betrieb, Viertel), durchschnittlicher Anzahl an Repeats (*coa*, *spa*) und dem Nachweis verschiedener Anheftungsfaktor-Gene

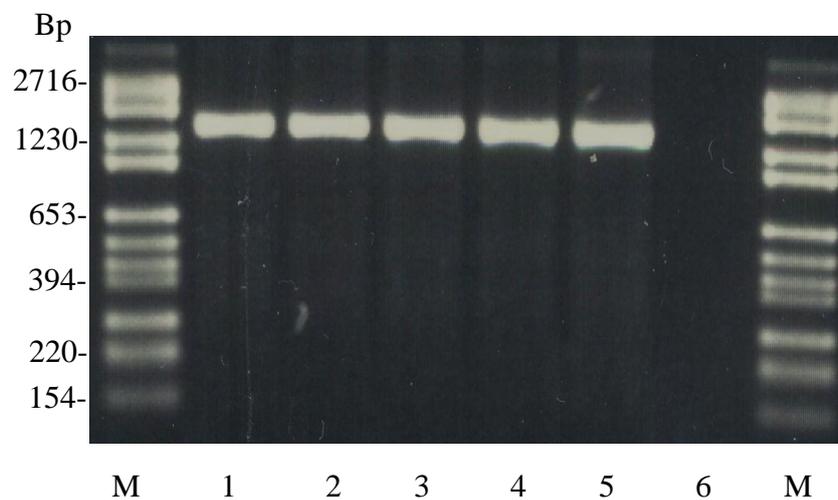
Durchschnitt	Anheftungsfaktor-Gene					
	<i>fnbB</i>		<i>cnaA</i>		<i>cnaB</i>	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
<b>ZZ Betrieb Ø</b>	1249	1334	1243	1334	1243	1334
<b>ZZ Viertel Ø</b>	959	1177	1169	1022	1169	1022
<b><i>coa</i>-Repeats Ø</b>	6	4	5	4	5	4
<b><i>spa</i>-Repeats Ø</b>	5	4	6	4	6	4

#### 4.11 Elastin-bindendes Protein

Die Untersuchung der 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen auf Anwesenheit des *ebpS*-Gens wurde wie unter [3.4.2.2](#) beschrieben ebenso mittels PCR durchgeführt.

In [Abb. 17](#) sind typische Amplifikate bei positivem Gennachweis dargestellt.

Alle 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen wiesen ein Amplikon in der Größe von ca. 1330 Bp auf.



[Abb. 17](#): Typische Amplikons des Gens *ebpS* einiger *S. aureus*-Kulturen aus der „epidemischen“ Gruppe mit einer Größe von ca. 1330 Bp (1 - 4); 5 = positive Kontrolle - *S. aureus* ATCC 25923; 6 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe [Abb. 5](#)

#### 4.12 Ergebnisse der Untersuchung auf Mikro kapsel-Gene

Entsprechend den Angaben unter [3.4.2.2.1](#) wurden die 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen ferner auf die Anwesenheit der Mikro kapselgene *cap5* und *cap8* untersucht. In [Abb. 18](#) und in [Abb. 19](#) sind Ergebnisse typischer PCR-Läufe mit Nachweisen des *cap5*- bzw. *cap8*-Gens dargestellt. Das spezifische Amplikon hat eine Größe von ca. 880 Bp bei *cap5* bzw. von ca. 1140 Bp bei *cap8*.

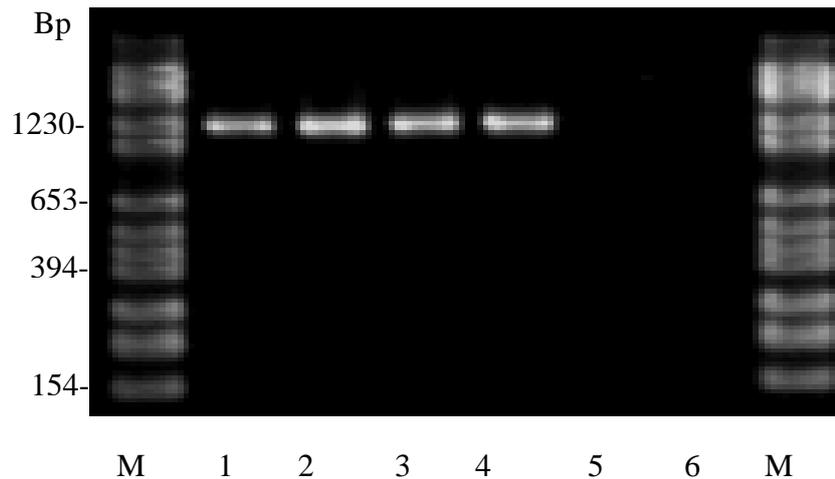
[Tab. 12](#) zeigt zusammenfassend die Resultate der beiden PCR-Untersuchungen. Alle untersuchten Kulturen wiesen entweder das *cap5*- oder das *cap8*-Gen auf. Das *cap5*-Gen wurde insgesamt 23 mal nachgewiesen, das *cap8*-Gen war mit 53 Nachweisen am häufigsten vorhanden.

In der Erregergruppe „sporadisch II“ trat das *cap5*-Gen nicht und demzufolge das *cap8*-Gen zu 100% auf. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mikro kapsel-Gennachweis und epidemiologischem Verhalten ließ sich nicht nachweisen.

Bei den anhämolysierenden Feldisolaten trat das *cap5*-Gen signifikant häufiger auf. Hämolysierende Feldisolate waren signifikant häufig *cap8*-Gen positiv. Vergleichbare signifikante Beziehungen ergaben sich für den bovinen Biotyp der häufig *cap8*-Gen positiv war, bzw. für den nicht-bovine Biotyp der häufig *cap5*-Gen positiv war. ([Tab. 12](#))



[Abb. 18](#): Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 5-kodierenden Gens *cap5* einiger *S. aureus*-Kulturen (n = 4) aus der anhämolysierenden *S. aureus*-Gruppe mit einer Größe von 880 Bp (1 - 4); 5 = *cap5*-negative Kultur; M = siehe [Abb. 5](#)



**Abb. 19:** Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 8-kodierenden Gens *cap8* einiger *S. aureus*-Kulturen aus der „sporadisch II“-Gruppe mit einer Größe von ca. 1140 Bp (1 - 4); 5 = *cap8*-negative Kultur; 6 = fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe **Abb. 5**

**Tab. 12:** Statistische Korrelation zwischen epidemiologischem Verhalten, Hämolyseverhalten, Biotypisierung und dem Nachweis der Kapselgene *cap5* und *cap8*.

		Mikrokapsel-Gene			
		<i>cap5</i>		<i>cap8</i>	
<b><i>S. aureus</i>-Gruppe</b>	untersucht	positiv	negativ	positiv	negativ
Gesamt	76	23	53	53	23
<b>Epidemiologisches Verhalten (n = 61)</b>					
Epidemisch	34	8	26	26	8
Sporadisch	27	2	25	25	2
I	12	2	10	10	2
II	15	0	15	15	0
<b>Hämolyseverhalten (n = 76)</b>					
Anhämolisierend	15	13*	2	2	15
Hämolyse	61	10	51	51*	10
α	14	5	9	9	5
β	20	1	19	19	1
αβ	16	2	14	14	2
δ	11	2	9	9	2
<b>Biotypisierung (n = 76)</b>					
Boviner Biotyp	19	0	19	19*	0
Nicht-boviner Biotyp	57	23*	34	34	23

\*= statistisch signifikant

In Tab. 13 sind die durchschnittlichen Zellzahlen (Betriebs- und Viertelzellzahl) sowie die durchschnittliche Anzahl der *coa*- bzw. *spa*-Repeats zusammengestellt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang war zwischen dem Auftreten der Kapselgene und der Anzahl an *spa*-Repeats nachweisbar.

Tab. 13: Statistische Korrelation zwischen durchschnittlicher Zellzahl (Betrieb, Viertel), durchschnittlicher Anzahl an Repeats (*coa*, *spa*) und dem Kapselgen-Nachweis *cap5* und *cap8*

Durchschnitt	Mikrokapsel-Gene			
	<i>cap 5</i>		<i>cap 8</i>	
	positiv	negativ	positiv	negativ
<b>ZZ Betrieb Ø</b>	1762	1236	1236	1762
<b>ZZ Viertel Ø</b>	1036	1049	1049	1036
<b><i>coa</i>-Repeats Ø</b>	4	4	4	4
<b><i>spa</i>-Repeats Ø</b>	8*	3	3*	8

\*= statistisch signifikant

#### 4.13 Hämolysin-Gene

Die Untersuchung auf unterschiedliche Hämolysin-Gene wurde ebenfalls mittels der in 3.4.2.2 beschriebenen konventionellen PCR-Technik durchgeführt.

Entsprechend der phänotypischen Resultate zeigte jedes der 61 untersuchten *S. aureus*-Isolate mindestens ein Hämolysin-Gen. Bei den 15 phänotypisch anhämolysierenden *S. aureus* wurde jedoch auch mindestens ein Hämolysin-Gen gefunden. In den Abb. 20 bis Abb. 23 sind Hämolysin-Gen-typische Amplifikate dargestellt. Die Größe der betreffenden Amplikons betrug für *hla* ca. 530 Bp, für *hlb* ca. 830 Bp, für *hld* ca. 110 Bp und für *hlg* ca. 930 Bp. Die Resultate für den Nachweis von *hla*, *hlb*, *hld* und *hlg* sind zusammenfassend in Tab. 14 dargestellt. Statistisch signifikante Zusammenhänge bestanden sowohl zwischen dem phänotypischen Merkmal Biotyp (boviner Biotyp) und dem Hämolysegen *hlb*, als auch zwischen den als „sporadisch“ klassifizierten *S. aureus* und dem Hämolysegen *hlg*.

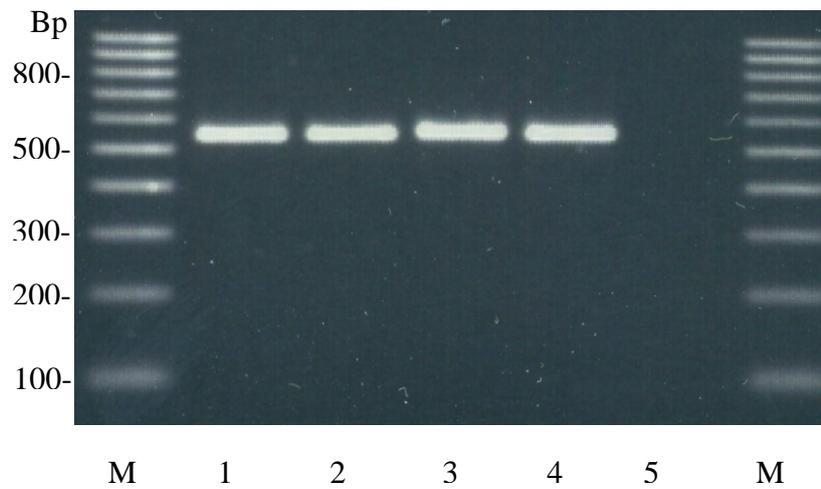


Abb. 20: Typische Amplikons des Gens *hla* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 530 Bp (1 - 4); 5 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

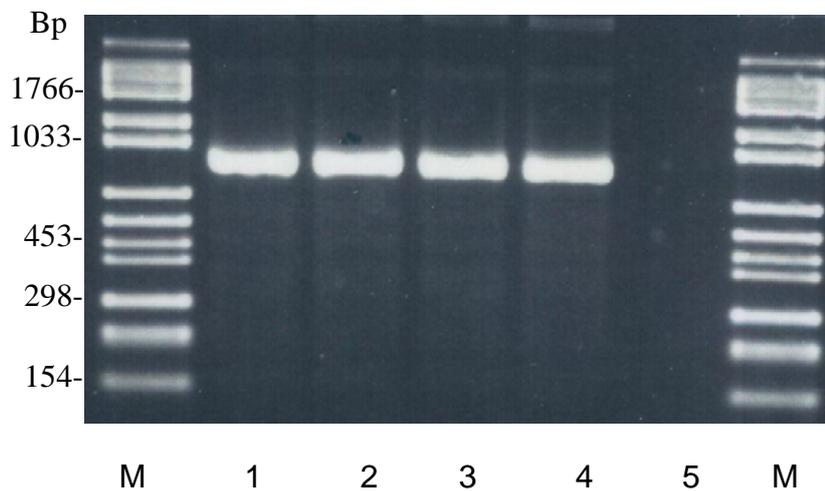


Abb. 21: Typische Amplikons des Gens *hnb* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 830 Bp (1 - 4); 5 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 5

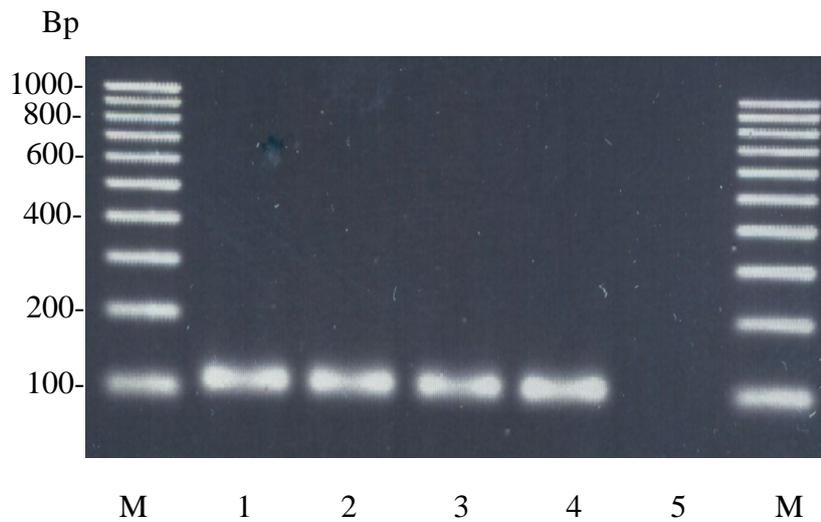


Abb. 22: Typische Amplikons des Gens *hld* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 110 Bp (1 - 4); 5 = fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

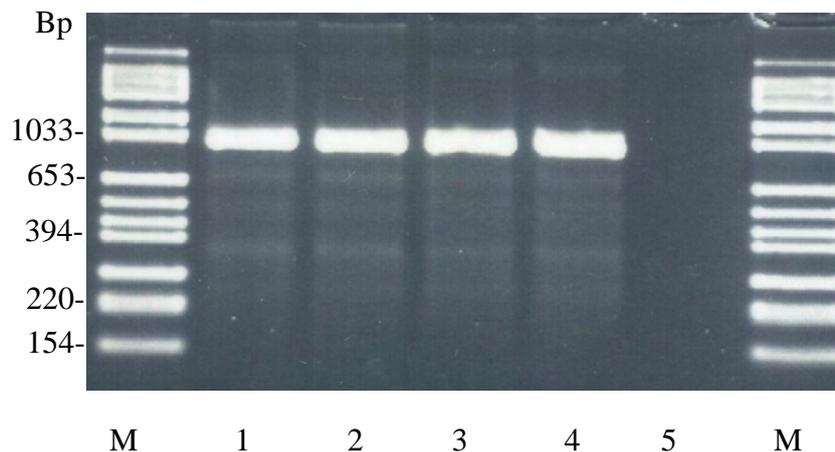


Abb. 23: Amplifikate des Gens *hlg* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 930 Bp (1 - 4); 5 = negative *S. aureus*-Kultur; M = siehe Abb. 5

Tab. 14: Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Hämolysin-Gene, dem epidemiologischen Verhalten, der Hämolyse und dem Biotyp

		Hämolysin-Gene							
		<i>hla</i>		<i>hlb</i>		<i>hld</i>		<i>hlg</i>	
<b>S. aureus-Gruppe</b>	untersucht	+	-	+	-	+	-	+	-
Gesamt	76	72	4	60	16	76	0	70	6
<b>Epidemiologisches Verhalten (n = 61)</b>									
Epidemisch	34	32	2	25	9	34	0	29	5
Sporadisch	27	27	0	20	7	27	0	27*	0
I	12	12	0	8	4	12	0	12	0
II	15	15	0	12	3	15	0	15	0
<b>Hämolyseverhalten (n = 76)</b>									
Anhämolysierend	15	13	2	15	0	15	0	14	0
Hämolyse	61	59	2	45	16	61	0	56	0
α	14	12	2	8	6	14	0	13	0
β	20	20	0	16	4	20	0	18	0
αβ	16	16	0	14	2	16	0	16	0
δ	11	11	0	7	4	11	0	9	0
<b>Biotypisierung (n = 76)</b>									
Boviner Biotyp	19	19	0	19*	0	19	0	14	5
Nicht-boviner Biotyp	57	53	4	41	16	57	0	56	1

\*= statistisch signifikant

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Hämolysin-Gene und der durchschnittlichen Betriebs- bzw. Viertelzellzahl sowie der durchschnittlichen Repeatzahl des *coa/spa*-Gens ist in Tab. 15 dargestellt. Statistisch signifikante Zusammenhänge ergaben sich zwischen dem *hla*-Gen und der Anzahl der *coa/spa*-Repeats, sowie dem Auftreten des *hlg*-Gens und der Anzahl an *spa*-Repeats.

Tab. 15: Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Hämolysin-Gene und der durchschnittlichen Zellzahl (Betrieb/Viertel) bzw. der durchschnittlichen Anzahl von Repeats (*coa/spa*)

Durchschnitt	Hämolysin-Gene					
	<i>hla</i>		<i>hlb</i>		<i>hlg</i>	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg
<b>ZZ Betrieb Ø</b>	1271	2019	1280	1508	1280	1305
<b>ZZ Viertel Ø</b>	1052	1468	1010	1677	1066	1002
<b><i>coa</i> Repeats Ø</b>	5*	3	4	7	4	6
<b><i>spa</i> Repeats Ø</b>	4.5*	6.5	5	3	5*	3

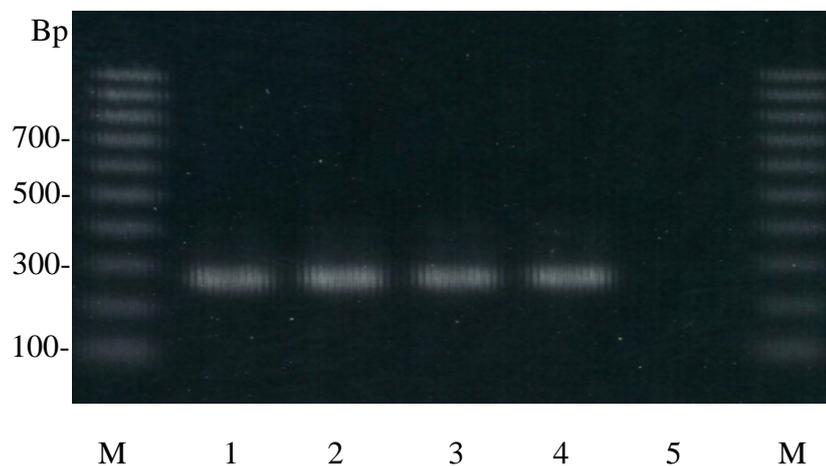
\*= statistisch signifikant

#### 4.14 Leukotoxin (*luk E/D*)

Die Untersuchung der 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen auf Anwesenheit des *luk E/D*-Gens wurde wie unter [3.4.2.2](#) beschrieben durchgeführt.

In [Abb. 24](#) sind typische Amplifikate bei positivem Gennachweis dargestellt.

Alle 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen wiesen in der konventionellen PCR ein Amplikon in der Größe von ca. 260 Bp auf.



[Abb. 24](#): Ergebnisse der Amplifizierung des *luk E/D* Gens von vier *S. aureus*-Isolaten mit einer Größe von ca. 260 Bp (1 - 4); 5 = fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe [Abb. 2](#)

#### 4.15 Ergebnisse des Nachweises von Enterotoxin-Genen

Der Nachweis der Gene für die Enterotoxine erfolgte wie unter 3.4.2.2 beschrieben mittels Einzel-PCR bzw. „Multiplex-PCR“.

##### 4.15.1 Nachweis der Enterotoxin-Gene *sea*, *seb*, *sed* und *see*

Abb. 25 zeigt das Ergebnis eines PCR-Laufes der „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene *sea*, *seb*, *sed* und *see* unter Verwendung von Referenzkulturen. Die Amplifikate für die einzelnen Enterotoxingene *sea* (ca. 210 Bp), *seb* (ca. 470 Bp), *sed* (ca. 310 Bp) und *see* (ca. 160 Bp) lassen sich eindeutig voneinander unterscheiden. Mit der angewandten PCR-Technik konnten bei den 76 untersuchten Feldstämmen lediglich in 3 Fällen (3,9%) das *sed*-Gen nachgewiesen werden (Abb. 26), eine Kultur (1,3%) war *see*-Gen positiv (Abb. 27). Die Gene für *sea* und *seb* konnten bei keiner der untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der „Multiplex-PCR“ ist in Tab. 16 wiedergegeben.

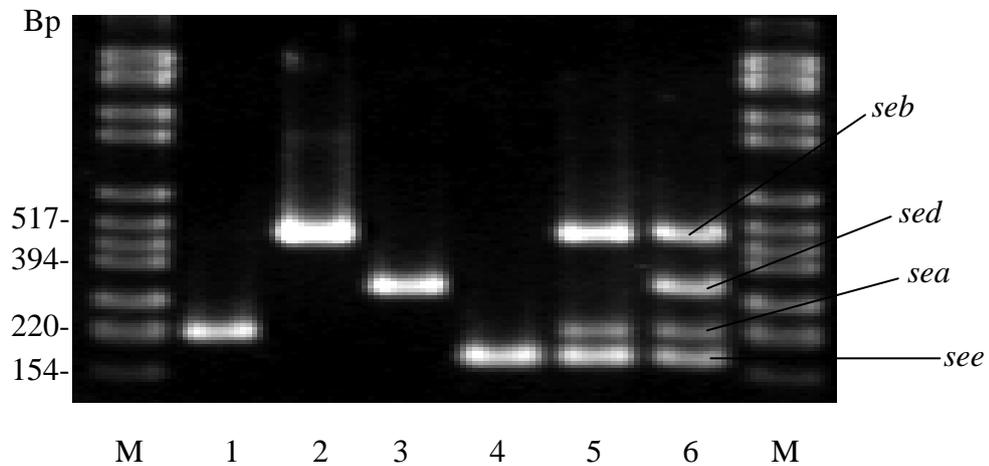


Abb. 25: „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene *sea*, *seb*, *sed* und *see*;

- 1 = Amplikon (ca. 210 Bp) des *sea*-Gens (SEA-Referenzstamm 619/93)
- 2 = Amplikon (ca. 470 Bp) des *seb*-Gens (SEB-Referenzstamm 243)
- 3 = Amplikon (ca. 310 Bp) des *sed*-Gens (SED-Referenzstamm 1644/93)
- 4 = Amplikon (ca. 160 Bp) des *see*-Gens (SEE-Referenzstamm FRI 918)
- 5 = Amplikons des DNA-Gemisches von SEA-, SEB- und SEE-Referenzstämmen
- 6 = Amplikon des DNA-Gemisches von SEA, SEB, SED und SEE-Referenzstämmen

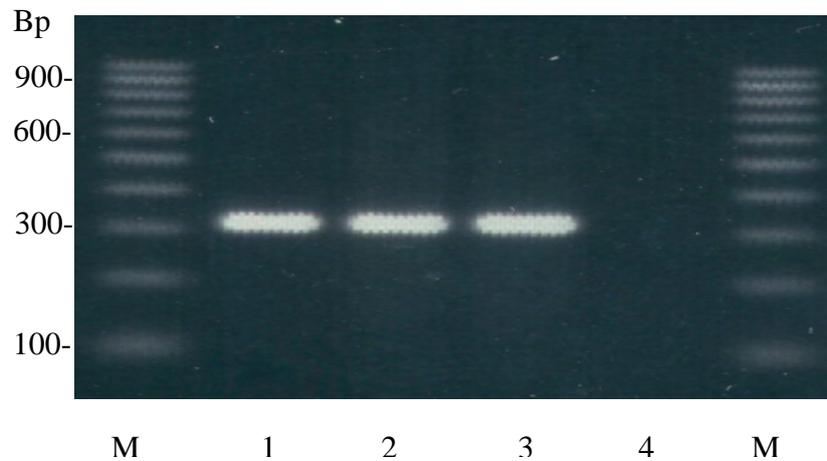


Abb. 26: Typische Amplikons des Enterotoxin D-kodierenden Gens *sed* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 310 Bp; 1 und 2 = „epidemische“ *S. aureus*-Feldisolate; 3 = *sed*-positiver Referenzstamm *S. aureus* 1644/93; 4 = *sed*-negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

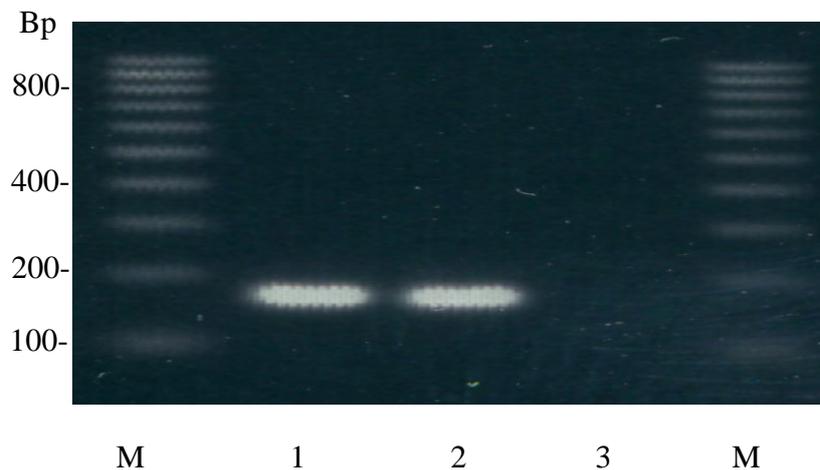


Abb. 27: Typische Amplikons des Enterotoxin E-kodierenden Gens *see* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 160 Bp; 1 = *see*-positive „sporadisch I“ *S. aureus*-Kultur; 2 = *see*-positiver Referenzstamm *S. aureus* FRI 918; 3 = *see*-negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

#### 4.15.2 Nachweis der Enterotoxingene *sec* und *tst*

Der Nachweis *sec*- bzw. *tst*-Gen-positiver *S. aureus*-Kulturen erfolgte mit der unter 3.4.2.2 beschriebenen Methodik ebenfalls mittels „Multiplex-PCR“-Technik. Abb. 28 zeigt typische Amplifikate bei positivem Gennachweis. Diese haben eine Größe von ca. 250 Bp (*sec*) bzw. von ca. 340 Bp (*tst*). Das Ergebnis dieser „Multiplex-PCR“-Untersuchung der ausgewählten 76 Feldisolate ist in Tab. 16 zusammengestellt. Das *sec*-Gen ließ sich insgesamt bei 14 Kulturen nachweisen, das *tst*-Gen wurde insgesamt 13 mal gefunden. Die Verteilung der Gen-Nachweise auf die entsprechenden Erreger-Gruppen sind in Tab. 16 zusammengestellt. Statistisch signifikante Zusammenhänge fanden sich zwischen dem Nachweis von *sec*, *tst* und dem Auftreten einer Hämolyse, insbesondere der  $\beta$ -Hämolyse.

In Abb. 29 und 30 sind die Einzel-PCR-Ergebnisse für den Nachweis von *sec* und *tst* dargestellt, die zur Kontrolle durchgeführt wurden.

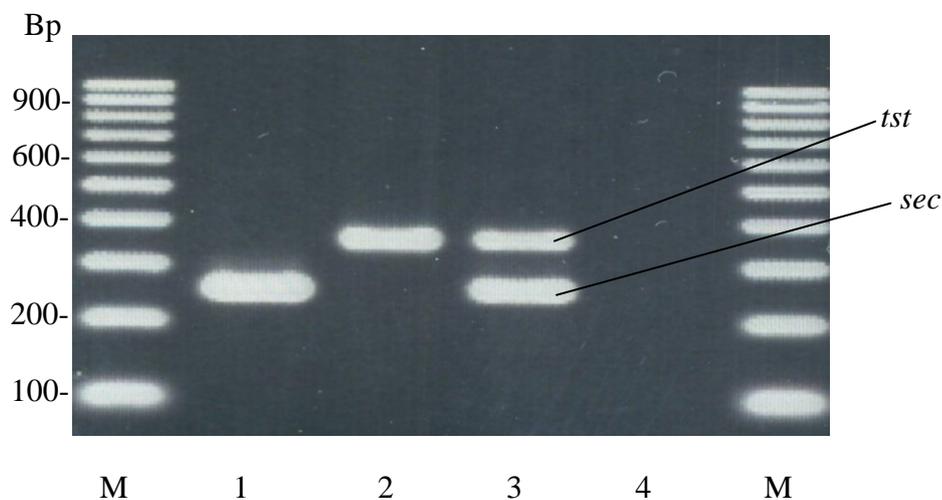


Abb. 28: „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene *sec* und *tst*; 1 = *sec*-positiver Referenzstamm *S. aureus* 1229/93; 2 = *tst*-positiver Referenzstamm 161/93; 3 = *sec*- und *tst*-positives „epidemisches“ *S. aureus*-Feldisolat; 4 = negative-Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

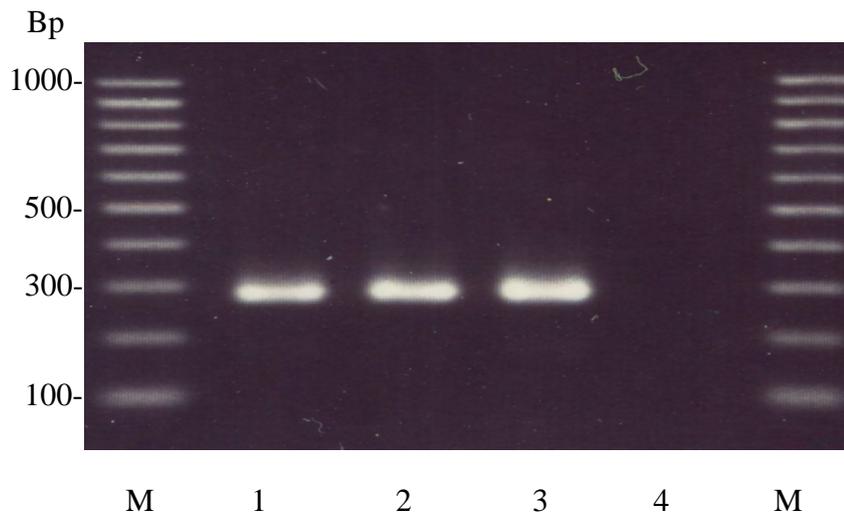


Abb. 29: Typische Amplikons des *sec*-Gens von zwei „epidemischen“ *S. aureus*-Feldisolaten mit einer Größe von ca. 250 Bp (1 und 2); 3 = *sec*-positiver Referenzstamm *S. aureus* 1229/93; 4 = fehlende Reaktion des negativen Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

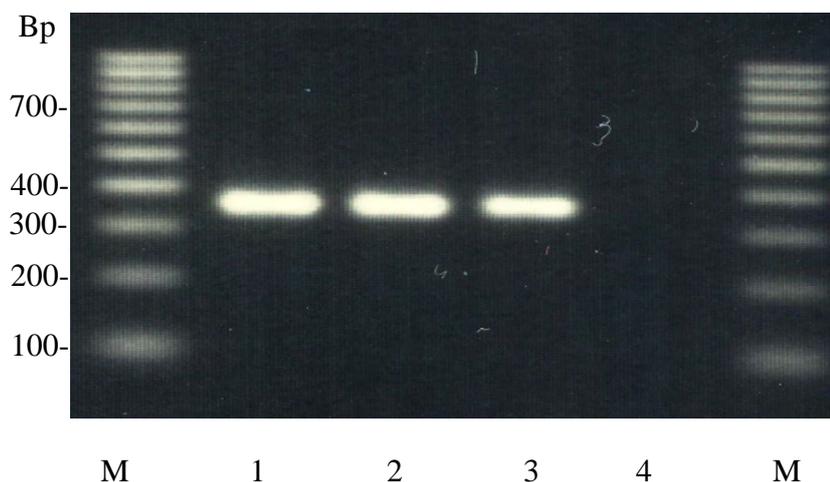


Abb. 30: Typische Amplikons des *tst*-Gens von zwei „sporadischen“ *S. aureus*-Feldisolaten mit einer Größe von ca. 340 Bp (1 und 2); 3 = Amplikon des *tst*-Gen-positiven Referenzstammes 161/93; 4 = *tst*-negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

#### 4.15.3 Nachweis der Enterotoxine *seg*, *seh*, *sei*, *sej* und des 16S rDNA-Gens

Der Nachweis der Enterotoxin-Gene *seg*, *seh*, *sei* und *sej* wurde gemeinsam mit dem 16S rDNA-Gen-Nachweis wie unter 3.4.2.2 beschrieben mittels „Multiplex-PCR“ durchgeführt. Dabei diente der 16S rDNA-Nachweis als interne Kontrolle für das Vorhandensein von DNA.

Abb. 31 zeigt das Ergebnis eines PCR-Laufes unter Verwendung der entsprechenden Referenzkulturen. Alle eingesetzten Kontrollstämme zeigten das *S. aureus*-spezifische Amplifikat des 16S rDNA-Gens in der Größe von ca. 220 Bp.

Der *seg*-positive Referenzstamm zeigte zusätzlich ein *seg*-spezifisches Amplikon in der Größe von ca. 640 Bp, der *seh*-positive Referenzstamm ein Amplikon in der Größe von ca. 370 Bp. Der *sei*- bzw. der *sej*-positive Kontrollstamm ergab Amplifikate in der Größe von ca. 570 Bp bzw. von ca. 140 Bp. Konnten in der „Multiplex-PCR“ die Enterotoxin-Gene nachgewiesen werden, wurde zur Überprüfung des Ergebnisses zusätzlich eine Einzel-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse solcher Einzel-PCR sind in den Abb. 32 bis Abb. 35 dargestellt.

Am häufigsten wurde die Genkombination *seg* und *sei* nachgewiesen. Diese wurde bei insgesamt 24 Kulturen (31,6%) gefunden. Das *sej*-Gen fand sich 3 mal (3,9%) und immer im Kombination mit *sed*-Gen, das *seh*-Gen 5 mal (6,6%). Die Verteilung der Gen-Nachweise auf die entsprechenden epidemiologischen Gruppen ist in Tab. 16 zusammengestellt.

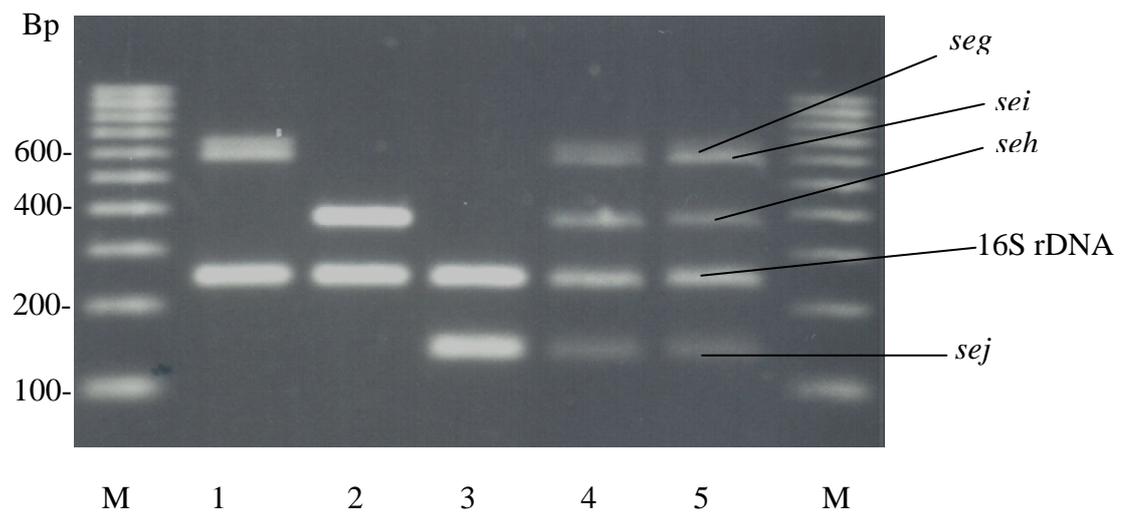


Abb. 31: „Multiplex-PCR“ zum Nachweis der Gene *seg*, *seh*, *sei*, *sej* und des 16S rDNA-Gens von *S. aureus*; 1 = *seg*- und *sei*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly-990055; 2 = *seh*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly-990552; 3 = „epidemisches“ *S. aureus*-Isolat mit Enterotoxigenen *sej*; 4 und 5 = Amplikons des Gemisches der DNA *seg*- *seh*-, *sei*- und *sej*-positiver Referenzstämme; M = siehe Abb. 2

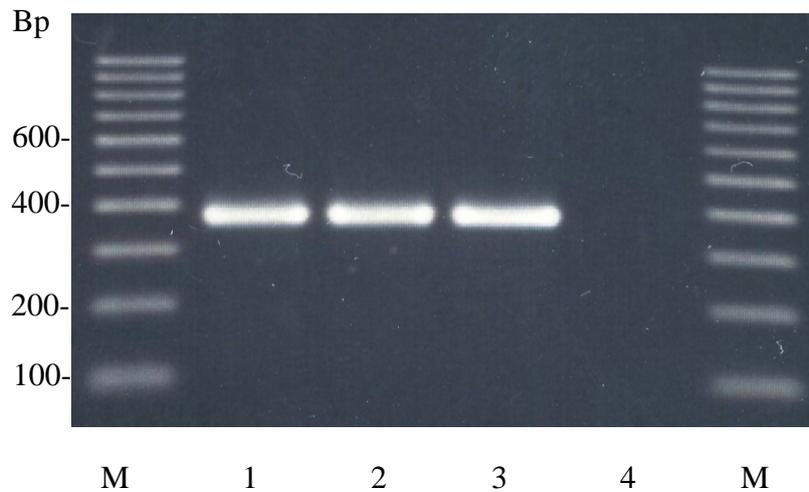


Abb. 32: Typische Amplikons des Enterotoxin H-kodierenden Gens *seh* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 370 Bp; 1 und 2 = *S. aureus*-Feldisolate; 3 = *seh*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly990552; 4 = *seh*-negatives *S. aureus*-Feldisolat „sporadisch II“; M = siehe Abb. 2

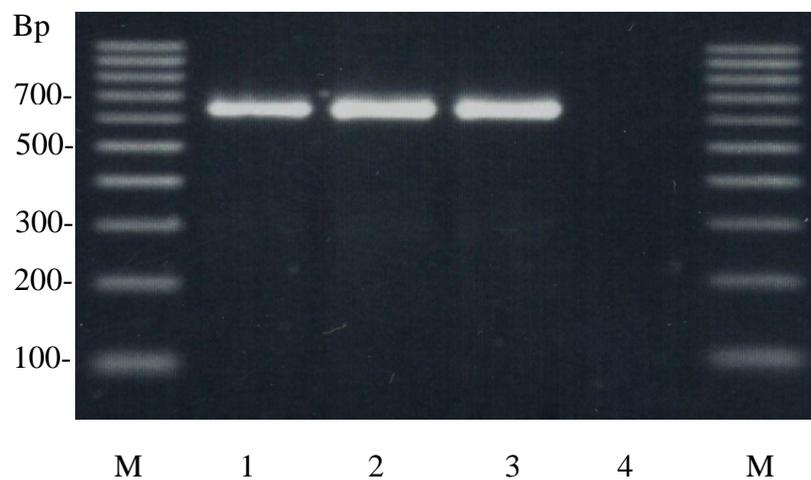


Abb. 33: Typische Amplikons des Enterotoxin G-kodierenden Gens *seg* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von ca. 640 Bp; 1 und 2 = *seg*-positive „epidemische“ *S. aureus*-Feldisolate; 3 = Referenzstamm *S. aureus* Ly990055; 4 = negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

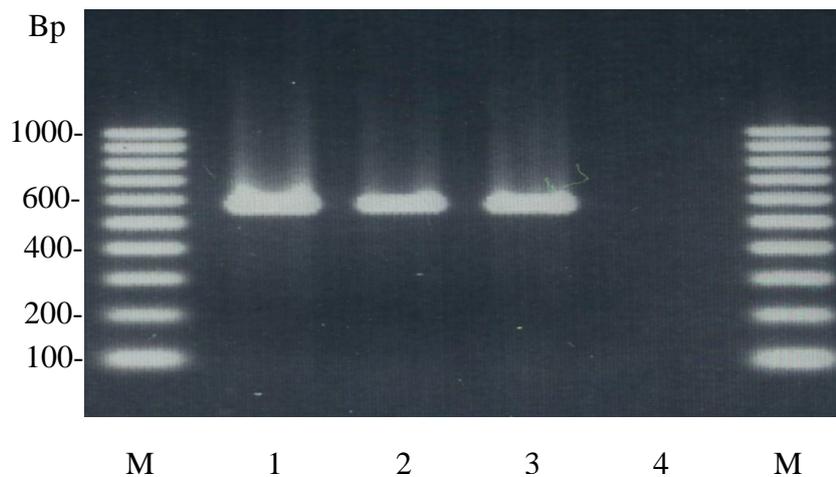


Abb. 34: Typische Amplikons des Gens *sei* von zwei „epidemischen“ *S. aureus*-Feldisolaten mit einer Größe von ca. 570 Bp (1 und 2); 3 = *sei*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly990055; 4 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

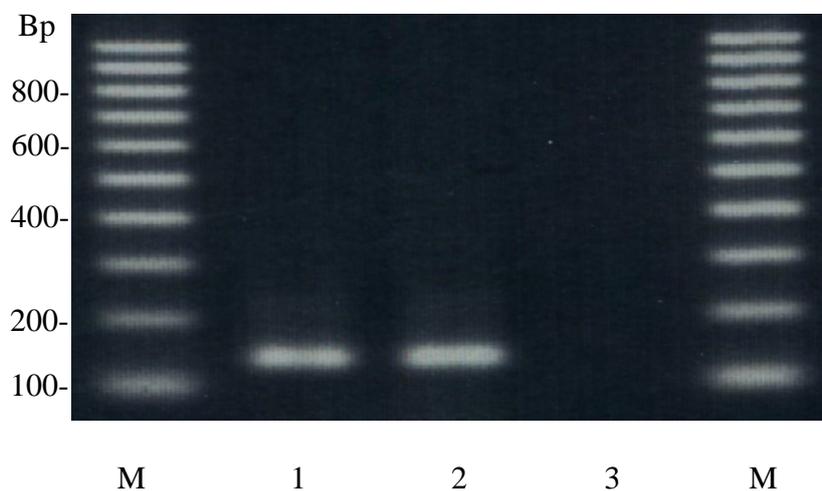


Abb. 35: Typische Amplikons des Gens *sej* von zwei „epidemischen“ *S. aureus*-Feldisolaten mit einer Größe von ca. 140 Bp (1 und 2); 3 = *sej*-negatives Feldisolat; M = siehe Abb. 2

#### 4.15.4 Nachweis der Enterotoxingene *sem*, *sen*, *seo* und des Superantigen-like-Protein kodierenden Gens *ss7*

Die Enterotoxingene *sem*, *sen* und *seo* sowie das Superantigen-like-Protein kodierende Gen *ss7* wurden wie bei [3.4.2.2](#) beschrieben mittels Einzel-PCR nachgewiesen.

Typische Amplikons sind jeweils in [Abb. 36](#) bis [Abb. 39](#) dargestellt. Das *sem*-Gen ergab im Falle eines positiven Nachweises ein Amplifikat in der Größe von ca. 470 Bp ([Abb. 36](#)), das *sen*-Gen ein 290 Bp großes Amplikon ([Abb. 37](#)) und das *seo*-Gen ein 240 Bp großes Amplikon ([Abb. 38](#)).

Die Ergebnisse der Untersuchung der 76 ausgewählten *S. aureus*-Kulturen hinsichtlich der genannten Gene sind in [Tab. 16](#) zusammengestellt. Die Gene *sem*, *sen* und *seo* traten immer in Kombination auf, insgesamt waren 24 (31,6%) Isolate positiv. Das *ss7*-Gen war bei insgesamt 62 (81,6%) der untersuchten Feldstämme nachweisbar.

Die statistische Auswertung ergab einem signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* und der phänotypischen Ausbildung einer  $\beta$ -Hämolyse. Außerdem wurden diese Toxine signifikant häufiger als bei „sporadisch“ klassifizierten Stämmen nachgewiesen.

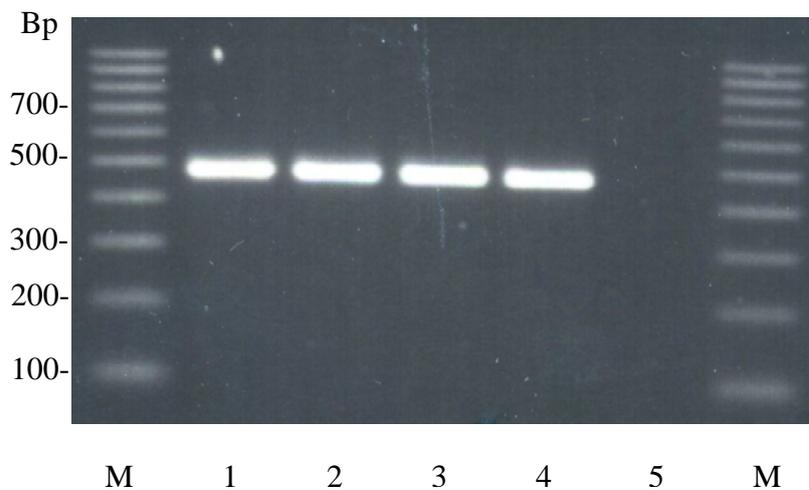


Abb. 36: Typische Amplikons des Enterotoxin M-Gens *sem* von drei *S. aureus*-Feldisolaten (1 bis 3); 4 = Referenzstamm *S. aureus* Ly990055, 5 = negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

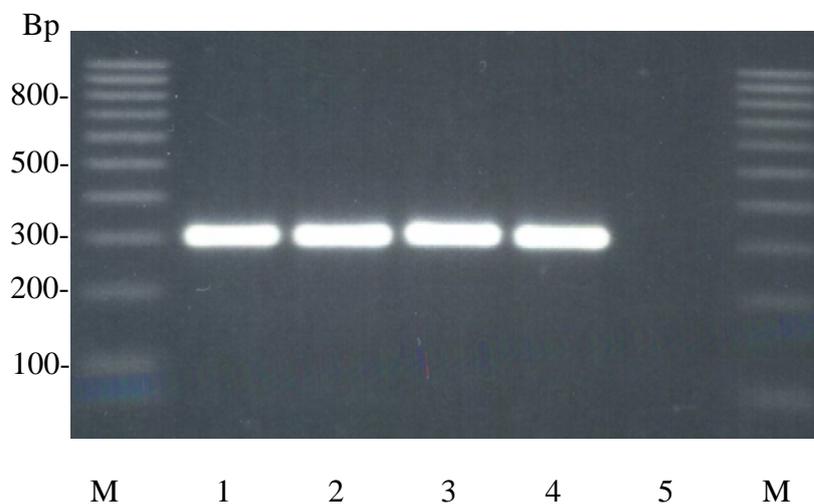


Abb. 37: Typische Amplikons des Enterotoxin N-Gens *sen* von drei *S. aureus*-Feldisolaten (1 bis 3); 4 = Referenzstamm *S. aureus* Ly990055; 5 = negative Kontrolle - *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

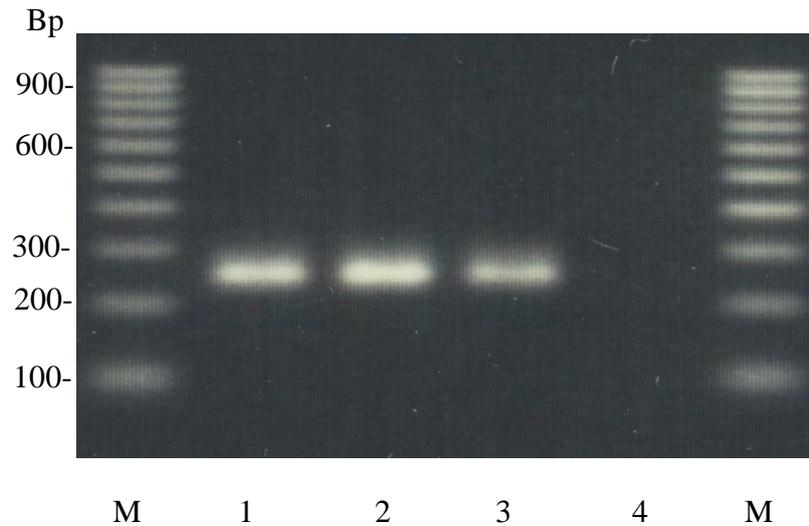


Abb. 38: Typische Amplikons des Enterotoxin O-Gens *seo* von zwei *S. aureus*-Feldisolaten (1 und 2); 3 = Referenzstamm *S. aureus* Ly990055; 4 = *seo* negatives *S. aureus*-Feldisolat; M = siehe Abb. 2

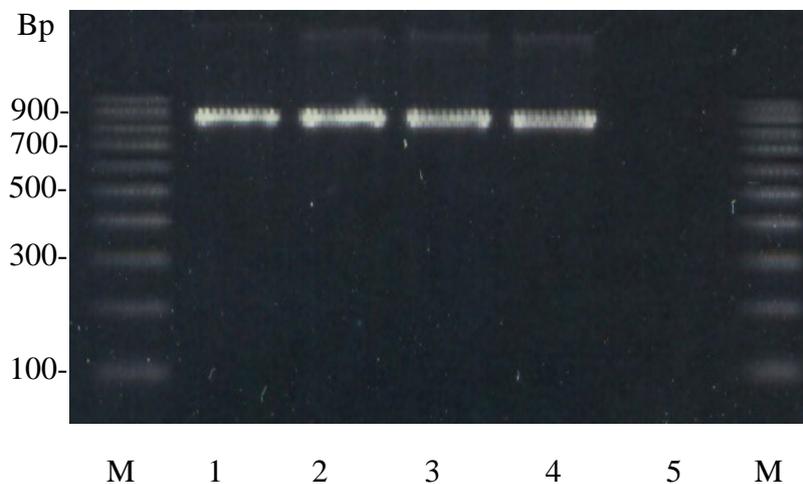


Abb. 39: Typische Amplikons des Superantigen-like-Protein kodierenden Gens *ss7* einiger *S. aureus*-Feldisolate (1 bis 4); 5 = *ss7*-negatives Feldisolat; M = siehe Abb. 2

**Tab. 16:** Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Enterotoxin- und weiterer Toxin-Gene, dem epidemiologischen Verhalten, dem Hämolyseverhalten und dem Biotyp

		Enterotoxin-Gene												Toxin-Gene												
		<i>sec</i>		<i>sed</i>		<i>see</i>		<i>seg</i>		<i>seh</i>		<i>sei</i>		<i>sej</i>		<i>sem</i>		<i>sen</i>		<i>seo</i>		<i>tst</i>		<i>ss/7</i>		
<b>S. aureus-Gruppe</b>	untersucht	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Gesamt	76	14	62	3	73	1	75	24	52	5	71	24	52	3	73	24	52	24	52	42	52	13	63	62	14	
<b>Epidemiologisches Verhalten (n = 61)</b>																										
Epidemisch	34	7	27	2	32	0	34	7	27	2	32	7	27	2	32	7	27	7	27	7	27	7	27	7	27	8
Sporadisch	27	7	20	1	26	1	26	12*	15	1	26	12*	15	1	26	12*	15	12*	15	12*	15	6	21	22	5	
I	12	2	10	1	11	1	11	5	7	1	11	5	7	1	11	5	7	5	7	5	7	2	10	9	3	
II	15	5	10	0	15	0	15	7	8	0	15	7	8	0	15	7	8	7	8	7	8	4	11	13	2	
<b>Hämolyseverhalten (n = 76)</b>																										
Anhämolyzierend	15	0	15	0	15	0	15	5	10	2	13	5	10	0	15	5	10	5	10	5	10	0	15	14	1	
Hämolyse	61	14*	47	3	58	1	60	19	42	3	58	19	42	3	58	19	42	19	42	19	42	13*	48	48	13	
α	14	1	13	2	12	0	14	2	12	2	12	2	12	2	12	2	12	2	12	2	12	1	13	11	3	
β	20	9*	11	0	20	1	19	10*	10	0	20	10*	10	0	20	10*	10	10*	10	10*	10	8*	12	17	3	
αβ	16	3	13	1	15	0	16	7	9	1	15	7	9	1	15	7	9	7	9	7	9	3	13	12	4	
δ	11	1	10	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11	1	10	8	3	
<b>Biotypisierung (n = 76)</b>																										
Boviner Biotyp	19	3	16	0	19	0	19	9	10	1	18	9	10	0	19	9	10	9	10	9	10	3	16	14	5	
Nicht boviner Biotyp	57	11	46	3	54	1	56	15	42	4	53	15	42	3	54	15	42	15	42	15	42	11	46	48	9	

\*= statistisch signifikant

---

Die Zusammenhänge des Auftretens der nachgewiesenen Enterotoxin- und der weiteren Toxin-Gene, der durchschnittlichen Zellzahl auf Betriebs- bzw. Viertelebene sowie die durchschnittliche Anzahl der *coa/spa*-Gen-Repeats sind in Tab. 17a und b dargestellt. Statistisch signifikante Zusammenhänge ergaben sich zwischen dem Nachweis von *sec* und der Zellzahl auf Betriebsebene sowie zwischen dem Nachweis von *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* und der Zellzahl auf Viertelebene. Ebenfalls statistisch signifikant war der Nachweis von *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* und die Anzahl der *coa*-Gen-Repeats bzw. *spa*-Gen-Repeats.

Tab. 17a und b: Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Enterotoxin- und weiterer Toxin-Gene und der durchschnittlichen Zellzahl (Betrieb/Viertel) bzw. der durchschnittlichen Anzahl von Repeats (*coa/spa*)

Tab. 17a:

Durchschnitt	Enterotoxin-Gene											
	sec		sed		see		seg		seh		sei	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
<b>ZZ Betrieb Ø</b>	1231*	1582	1762	1277	1123	1277	1334	1241	769	1384	1334	1241
<b>ZZ Viertel Ø</b>	850	1102	793	1097	323	1094	1903*	955	1094	1036	1903*	955
<b>coa Repeats Ø</b>	5.5	4	7	4	3	4	3.5*	6	4	4	3.5*	6
<b>spa Repeats Ø</b>	3	5	3	5	2	5	3*	6.5	5	4	3*	6.5

Tab. 17b:

Durchschnitt	Enterotoxin-Gene												Toxin-Gene			
	sej		sem		sen		seo		fst		ss/7					
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg				
<b>ZZ Betrieb Ø</b>	1762	1277	1334	1241	1334	1241	1334	1241	1236	1547	1251	1648				
<b>ZZ Viertel Ø</b>	793	1097	1903*	955	1903*	955	1903*	955	822	1097	1052	1066				
<b>coa Repeats Ø</b>	7	4	3.5*	6	3.5*	6	3.5*	6	4	4	4	4				
<b>spa Repeats Ø</b>	3	5	3*	6.5	3*	6.5	3*	6.5	3	5	4	8				

\* = statistisch signifikant

#### 4.16 Nachweis der Gene der Exfoliativen Toxine

Die Untersuchung der Gene die die exfoliativen Toxine A und B (*eta* und *etb*) kodieren wurde nach 3.4.2.2 mittels Einzel-PCR durchgeführt.

Abb. 40 zeigt die Gen-typischen Amplifikate in den Größen von ca. 120 Bp (*eta*) bzw. 200 Bp (*etb*) bei Untersuchung der Referenzstämme. Alle 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen waren *eta*- bzw. *etb*-negativ.

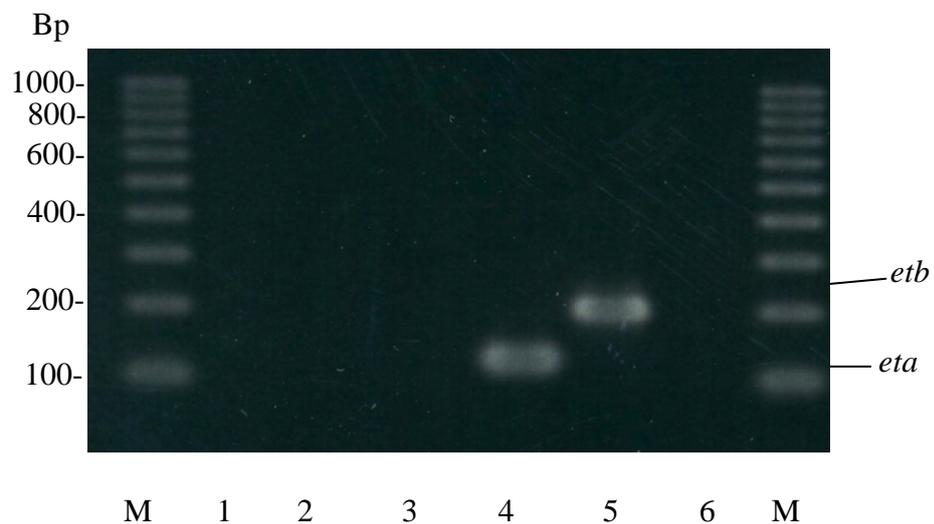


Abb. 40: Amplikons der Exfoliativen Toxin-Gene *eta* und *etb* von *S. aureus* 114/98 (4 und 5) mit einer Größe von 120 bzw. ca. 200 Bp; 1 bis 3 = fehlende Amplifikate „epidemischer“ *S. aureus*-Isolate; 6 = negativer Kontrollstamm *S. epidermidis* ATCC 14990; M = siehe Abb. 2

#### 4.17 Ergebnisse der explorativen statistischen Auswertung

Zur explorativen statistischen Auswertung wurden die erhaltenen PCR-Resultate der 76 ausgewählten *S. aureus*-Feldisolate den phänotypischen Merkmalen epidemiologisches Verhalten, Hämolyseverhalten, Biotyp und Zellzahl, sowie zwei genotypischen Parametern (Koagulasegen, Protein A-Gen-Repeats) gegenübergestellt. Ziel dieser Auswertung war, statistisch signifikante Zusammenhänge zu erkennen. Die dabei angewandten statistischen Methoden sind in Kapitel 3.6 eingehend beschrieben.

Bezüglich des epidemiologischen Verhaltens („epidemisch“, „sporadisch I“ und „sporadisch II“) ergaben sich unter Verwendung des Fischer-Tests gegenüber den Enterotoxigenen *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* sowie dem Hämolysegen *hlg* signifikante Zusammenhänge. Unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests wurden beim epidemiologischen Verhalten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Enterotoxigene ( $p = 0,034$ ), der Anheftungsfaktorgene ( $p = 0,0041$ ) und der Anzahl der *spa*-Gen-Repeats ( $p = 0,0088$ ) nachgewiesen.

Bezüglich der Zellzahl auf Betriebsebene ergaben sich signifikante Zusammenhänge zu dem Enterotoxigen *sec* ( $p = 0,0459$ ) unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Bei der Betrachtung der Summe der Virulenzfaktorgruppen und der Zellzahl auf Betriebsebene ergaben sich unter Verwendung des Speerman-Tests bzw. des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests keine signifikanten Zusammenhänge.

Die Auswertung der Viertelgemelkszellzahl erbrachte Zusammenhänge bei den Enterotoxigenen *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* ( $p = 0,0479$ ). Bei den übrigen Virulenzfaktorgenen und der Viertelgemelkszellzahl waren unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisbar. Die Zusammenhangsbetrachtung der Virulenzfaktor-Gen-Gruppen ergab bei der Viertelgemelkszellzahl lediglich bei der Anzahl der *spa*-Gen-Repeats ( $p = 0,0473$ ) ein statistisch signifikantes Ergebnis. Bei der schrittweisen Diskriminanzanalyse bzw. Regression waren keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachzuweisen.

Weiterhin erfolgten Prüfungen auf statistische Signifikanz zwischen der phänotypischen Hämolyseeigenschaft und den unterschiedlichen untersuchten Virulenzfaktorgenen. Auch hierbei ergaben sich im exakten Fischer-Test statistisch signifikante Zusammenhänge bei einigen Enterotoxingenen. Statistisch hoch signifikant war ebenso das Auftreten des Anheftungsfaktorgens *fnbB* ( $p = 0,0007$ ) sowie der Mikrokapselgene *cap5* bzw. *cap8* ( $p < 0,0001$ ). Bei den Summen der einzelnen Virulenzfaktorgengruppen waren die Enterotoxingene ( $p = 0,039$ ), Anheftungsfaktorgene ( $p = 0,023$ ) und die Anzahl der *coa*-Gen-Repeats ( $p = 0,0051$ ) signifikant, die Mikrokapselgene ( $p < 0,0001$ ), die Anzahl der *spa*-Gen-Repeats ( $p = 0,0002$ ) sowie die Summe aller Virulenzfaktoren ( $p = 0,0003$ ) hoch signifikant. Statistisch signifikante Zusammenhänge bei der schrittweisen Diskriminanzanalyse und Regression waren bei den Genkombinationen *sbi*, *h1b* und *sec* nachzuweisen.

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Virulenzfaktorgenen und dem phänotypischen Merkmal „Biotyp“ ließen sich mit dem Hämolysegen *h1b* ( $p = 0,0049$ ) herstellen. Bei Betrachtung der Virulenzfaktorgensummen waren statistisch signifikante Zusammenhänge zu den Mikrokapselgenen ( $p = 0,031$ ) und den *coa*-Gen-Repeats ( $p = 0,0016$ ) nachweisbar.

Die Zusammenhangsanalyse zwischen dem genotypischen Merkmal *coa*-Repeat-Anzahl ergab eine statistisch signifikante Korrelation mit den Enterotoxintypen *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* ( $p = 0,0397$ ) und dem Hämolysegen *h1a* ( $p = 0,021$ ).

Bei den *spa*-Gen-Repeats gab es einen statistisch hoch signifikanten Zusammenhang zu den Mikrokapselgenen ( $p = 0,0009$ ). Statistisch signifikant waren die Korrelationen zu den Enterotoxingenen *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* ( $p = 0,0316$ ). Mittels der schrittweisen Diskriminanzanalyse ließen sich der Genkombination *h1b*, *h1g*, *sbi*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* statistisch signifikante Vorhersagewerte zuordnen.

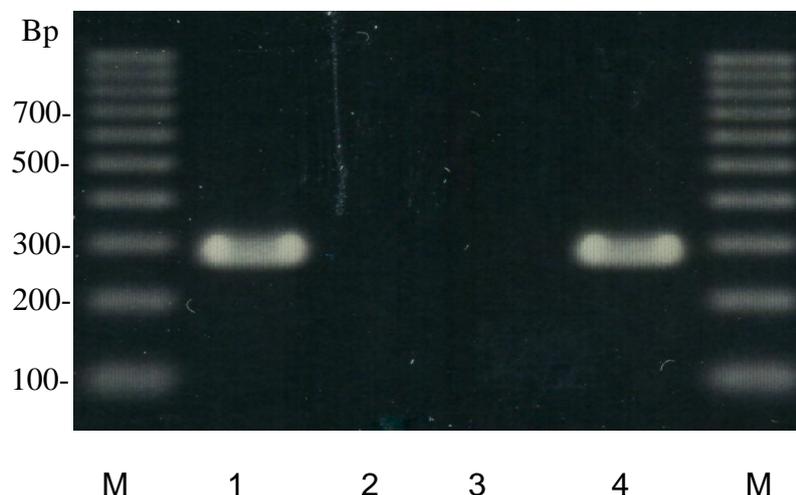
#### 4.18 Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR

Zur Überprüfung der phänotypischen Genexpression wurde bei einer begrenzten Anzahl von *S. aureus*-Kulturen und ausgewählten Virulenzfaktorgenen (überwiegend Enterotoxingene) die mRNA-Expression mittels RT-PCR geprüft.

Die insgesamt 29 untersuchten Feldisolate wurden mittels der unter [3.5](#) beschriebenen Untersuchungstechnik bearbeitet und auf die Expression der Gene *sec*, *tst*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* sowie das Fibronectin-bindende Protein A-Gen *fnbA* und Leukotoxin E/D-Gen *luk E/D* untersucht.

Die Etablierung der RT-PCR erfolgte zunächst unter Verwendung der entsprechenden Referenzstämme ([3.1.2](#)).

Nach Durchführung der Reversen Transkription und der Amplifizierung mittels der in [Tab. 1](#) beschriebenen Enterotoxigen-spezifischen Primer in der PCR ([3.4.2.2](#)) konnten bei den Referenzstämmen stets die erwarteten DNA-Amplifikate für die oben angegebenen Gene nachgewiesen werden. In den [Abb. 41](#) bis [Abb. 45](#) sind jeweils typische Ergebnisse nach RT-PCR dargestellt.



[Abb. 41](#): Typisches Ergebnis der PCR mit den Oligonucleotidprimern *nucA-1* und *nucA-2* zur Kontrolle der DNA-Kontamination nach der RNA-Extraktion ohne RT-Schritt; 2 und 3 = RNA ohne RT-Schritt des TSST-1 Referenzstammer 161/93; 1 und 4 = DNA des Kontrollstammes [280 Bp Amplikon des *nucA*-Gens]; M = siehe [Abb. 2](#)

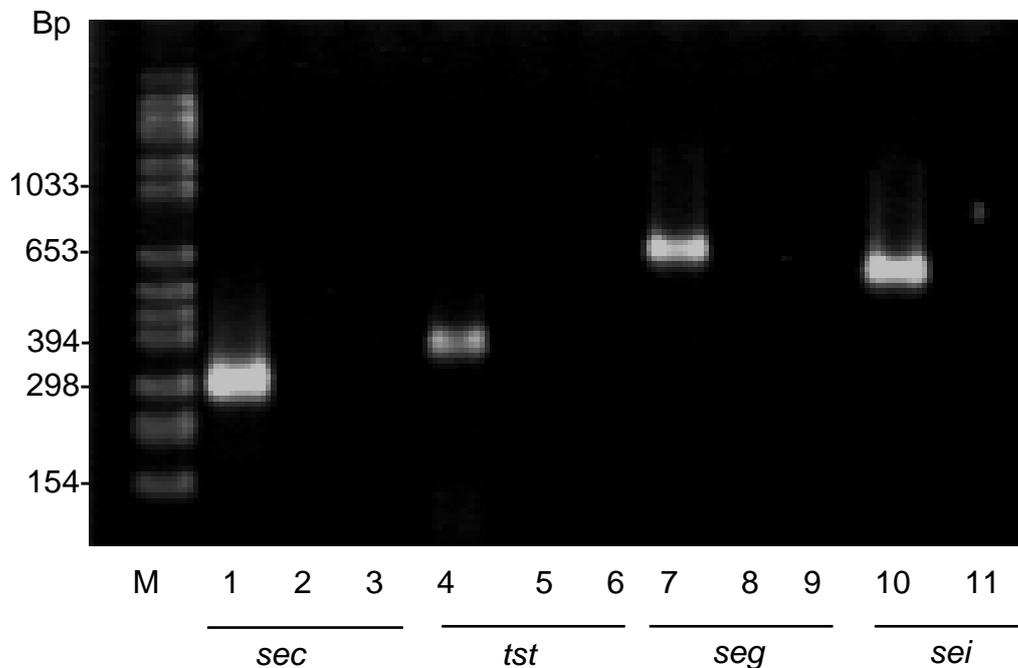


Abb. 42: Typische Amplikons der transkribierten *sec*-, *tst*-, *seg*- und *sei*-Gene von *S. aureus*-Referenzstämmen mittels RT-PCR; 1 = *sec*-cDNA des *S. aureus*-Referenzstammes 1229/93, (*sec*-positiv); 2 = RNA des Referenzstammes 1229/93 ohne RT-Schritt; 3 = Leerwert; 4 = *tst*-cDNA des *S. aureus*-Referenzstammes 161/93, (*tst*-positiv); 5 = RNA des Referenzstammes 161/93 ohne RT-Schritt; 6 = Leerwert; 7 = *seg*-cDNA des *S. aureus*-Referenzstammes LY990055, (*seg*- und *sei*-positiv); 8 = RNA des Referenzstammes LY990055 ohne RT-Schritt; 9 = Leerwert; 10 = *sei*-cDNA des *S. aureus*-Referenzstammes LY990055, (*seg*- und *sei*-positiv); 11 = RNA des Referenzstammes LY990055 ohne RT-Schritt; M = siehe Abb. 5

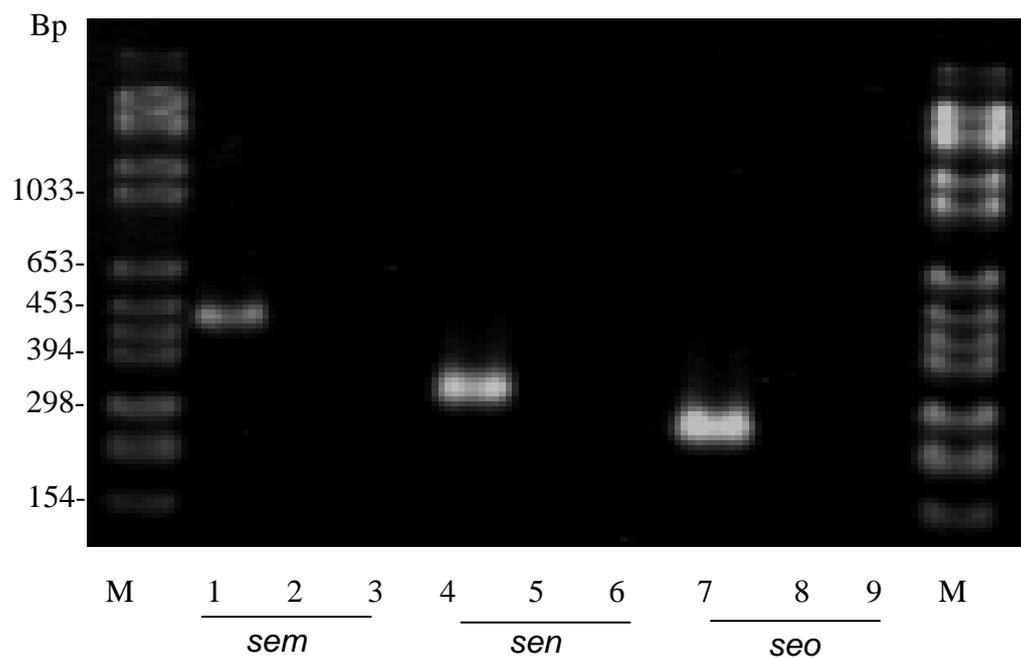


Abb. 43: Typische Amplikons der transkribierten *sem*-, *sen*- und *seo*-Gene eines *S. aureus*-Referenzstammes mittels RT-PCR; 1, 4 und 7 = *sem*-, *sen*- und *seo*-cDNA des *S. aureus*-Referenzstammes LY990055, (*seg*- und *sei*-positiv); 2, 5 und 8 = RNA des Referenzstammes LY990055 ohne RT-Schritt; 3, 6 und 9 = Leerwert; M = siehe Abb. 5

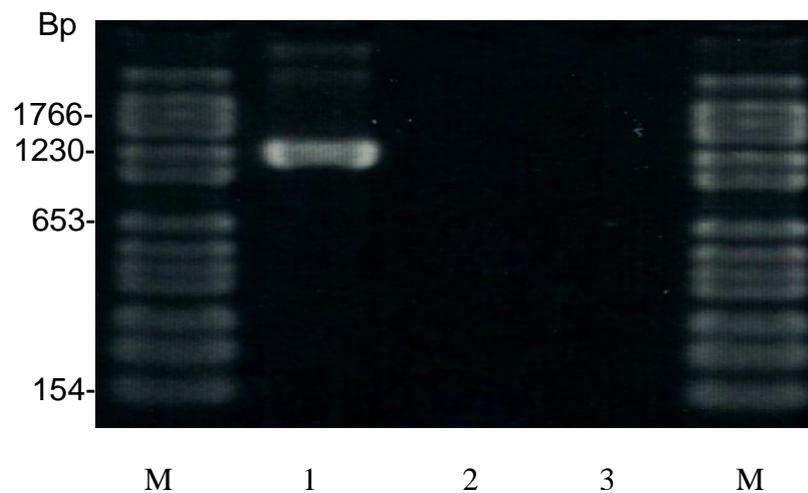


Abb. 44: Typisches Amplikon des transkribierten *fnbA*-Gens des *S. aureus*-Referenzstammes ATCC 25923 mittels RT-PCR; 1 = cDNA der *S. aureus*-Kultur; 2 = RNA ohne RT-Schritt; 3 = Leerwert; M = siehe Abb. 5

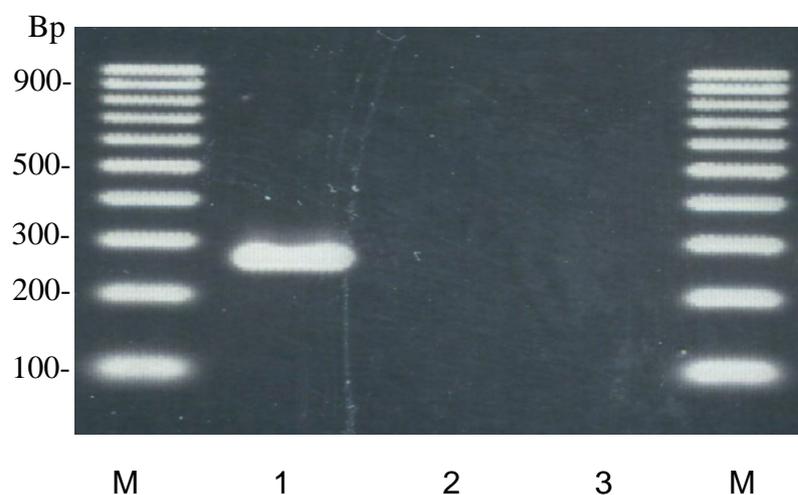


Abb. 45: Typisches Amplikon des transkribierten Leukotoxin E/D-Gens des *S. aureus*-Referenzstammes ATCC 25923 mittels RT-PCR; 1 = cDNA der *S. aureus*-Kultur; 2 = RNA des selben Stammes ohne RT-Schritt; 3 = Leerwert; M = siehe Abb. 2

Der Ergebnisvergleich der RT-PCR mit der konventionellen PCR zum Nachweis der hier untersuchten Gene ergab eine vollständige Ergebnisübereinstimmung beider Verfahren. Bei allen 7 untersuchten *sec*- bzw. *tst*-Gen-positiven Kulturen konnte das Transkript in der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Identische Ergebnisse wurden bei der Untersuchung weiterer Enterotoxin-Gene (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo*) bei insgesamt 10 Feldisolaten erhalten

Der Nachweis der Transkription der Gene *fnbA* bzw. *luk E/D* ergab bei 12 untersuchten Feldstämmen ebenfalls ein positives Ergebnis. Die Resultate der Analyse der mRNA-Expression mittels RT-PCR sind zusammenfassend in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Vergleich von PCR- und RT-PCR-Ergebnissen zum Nachweis der Gene *sec*, *tst*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *fnbA*, und *luk E/D*

Virulenzgen	Anzahl untersuchter		PCR-Ergebnis	
	Isolate		konventionell	RT-PCR
<i>sec</i>	7		+	+
<i>tst</i>	7		+	+
<i>seg</i>	10		+	+
<i>sei</i>	10		+	+
<i>sem</i>	10		+	+
<i>sen</i>	10		+	+
<i>seo</i>	10		+	+
<i>fnbA</i>	12		+	+
<i>luk E/D</i>	12		+	+

#### 4.19 Ergebnisse des genotypischen Nachweises von Resistenzdeterminanten

Zur Überprüfung der Expression der Resistenzgene *blaZ* (Penicillin-Resistenz) und *mecA* (Oxacillin-Resistenz) wurde bei 76 *S. aureus*-Feldstämmen die in (3.4.2.2) beschriebene PCR durchgeführt.

##### 4.19.1 Penicillin-G-Resistenzgen

In Abb. 46 ist das Ergebnis einer PCR zum Nachweis des *blaZ*-Gens dargestellt. Bei positivem Nachweis ließ sich ein ca. 170 Bp großes Amplikon detektieren. Die Ergebnisse der Untersuchung ausgewählter Feldisolate sind in Tab. 19 zusammengestellt. Bei 45 der 76 untersuchten Isolate verlief der *blaZ* Nachweis positiv.

##### 4.19.2 Methicillin-(Oxacillin-) Resistenzgen

Abb. 47 zeigt das typische Amplikon des *mecA*-Gens des *S. aureus*-Referenzstammes 1150/29. Das spezifische Amplifikat zeigt eine Größe von ca. 530 Bp. Alle ausgewählten Feldstämme erwiesen sich als *mecA*-Gen-negativ.

Tab. 19: Nachweis der Resistenzgene *mecA* und *blaZ* bei den verschiedenen epidemiologischen Gruppen

Gruppe	<i>mecA</i> - Nachweis	<i>blaZ</i> - Nachweis	
epidemisch (34)	-	21	61,8%
sporadisch I (12)	-	7	58,3%
sporadisch II (15)	-	9	60,0%
anhämolisierend (15)	-	8	53,3%

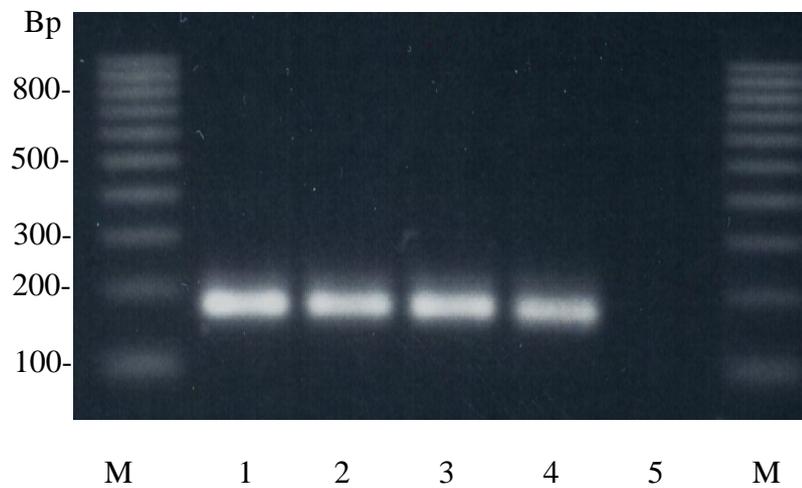


Abb. 46: Typische Amplikons des *blaZ*-Gens mit einer Größe von ca. 170 Bp (1 bis 3); 4 = *S. aureus*-Referenzstamm ATCC 25923; 5 = *blaZ*-negative *S. aureus* Kultur; M = siehe Abb. 2

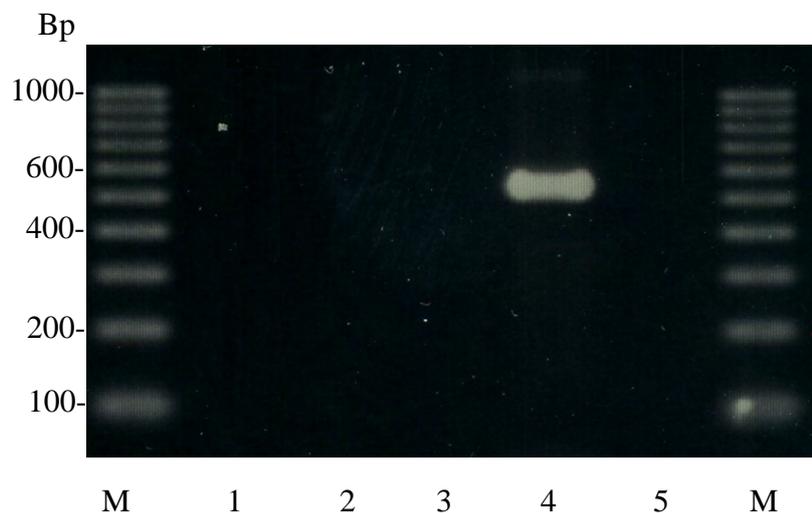


Abb. 47: Typisches Amplikon des *mecA*-Gens mit einer Größe von ca. 530 Bp; 1 bis 3 = *mecA*-negative Kulturen (Feldisolate); 4 = Referenzstamm *S. aureus* 1150/29 (*mecA*-positiv); 5 = Leerwert; M = siehe Abb. 2

## 5 DISKUSSION

### 5.1 *S. aureus*-Identifizierung

Alle 325 untersuchten Kulturen zeigten in dem nach KLOOS und LAMBE (1991) zum Nachweis der Koagulase durchgeführten Röhrchentest innerhalb von 24h eine Koagulation des Kaninchenplasmas. Die Koagulasereaktion diente zum Nachweis der extrazellulären Substanz Koagulase, um die zu untersuchenden Stämme der vorliegenden Arbeit zunächst phänotypisch als *S. aureus* zu identifizieren. Die Fähigkeit, Koagulase zu bilden, ist eine charakteristische Eigenschaft von *S. aureus* und mit Einschränkungen von *S. hyicus*, *S. intermedius* und *S. delphini* (BRÜCKLER et al., 1994)

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem das Thermonuclease-Gen *nuc* bei allen 325 *S. aureus*-Kulturen mit einer einheitlichen Größe von 280 Bp nachgewiesen werden. Dies erfolgte mit den von BRAKSTAD et al. (1992) entwickelten *nuc*-spezifischen Oligonukleotidprimern. BRAKSTAD et al. (1992) konnten bereits zeigen, dass sich der Nachweis des *nuc*-Gens zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* eignet.

Der Koagulasenachweis dient im mikrobiologischen Labor als ein Hauptkriterium zur Differenzierung von *S. aureus* von Koagulase-negativen Staphylokokken. Unter Verwendung der von HOOKEY et al. (1998) beschriebenen Oligonukleotidprimer *coa*-I und *coa*-II konnte zunächst bei allen 325 *S. aureus*-Kulturen dieser Arbeit das *coa*-Gen amplifiziert werden. Dabei wurden sieben unterschiedliche Amplikongrößen von 500, 560, 620, 700, 800, 900 und 970 Bp gefunden. Dies entsprach rechnerisch zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben und acht Einheiten (Repeats). Laut SCHMITZ et al. (1998) kann bei *S. aureus* die Anzahl der 81 Bp großen Repeats zwischen vier und acht variieren. Zahlreiche Autoren [ANNEMÜLLER et al. (1999); CABRAL (2003); KATSUDA et al. (2005); ZECCONI et al. (2005); VIMERCATI et al. (2006); REINOSO et al. (2007)] untersuchten *S. aureus*-Isolate oder verschiedene andere Staphylokokkenspezies auf das Vorkommen des *coa*-Gens und die Anzahl an

Repeats. Die Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl an Repeats für die Virulenz einzelner *S. aureus* ist bislang noch nicht geklärt.

Bei dem Protein A von *S. aureus* handelt es sich um einen Zellwandbestandteil, der unter anderem die Eigenschaft besitzt, das Fc-Fragment des IgG-Moleküls zu binden. Am C-terminalen Ende des Protein A befindet sich die als X-Region bezeichnete zellwandbindende Region, welche keine Bindungsaffinität für das Fc-Stück des IgG-Moleküls besitzt (UHLEN et al., 1984). Nach FRÉNEY et al. (1994) besteht die X-Region des Protein A-Gens (*spa*) aus einem konstanten Bereich sowie aus unterschiedlich vielen, sich wiederholenden Repeats. In der vorliegenden Studie ergab die Amplifikation des die X-Region-kodierenden Abschnitts des Protein A-Gens bei allen 325 *S. aureus*-Stämmen ein positives Ergebnis. Dabei waren 11 unterscheidbare Amplikongrößen (100, 120, 150, 170, 200, 220, 240, 270, 290, 320 und 350 Bp) mit einer ebenfalls rechnerisch ermittelten Anzahl von Repeats zwischen 2 und 12 nachweisbar.

Auch für das Protein A-Gen gibt es zahlreiche Untersuchungen, die sich mit dem Polymorphismus dieses Genabschnittes beschäftigten [TOSHKOVA et al. (1997); ANNEMÜLLER et al. (1999); DALLA POZZA et al. (1999); AKINEDEN et al. (2001, 2006); HASSAN (2002); CABRAL (2003); VIMERCATI et al. (2006); REINOSO et al. (2007); ZECCONI et al. (2005, 2006)].

Anhand von Wiederholungsuntersuchungen nach zahlreichen Subkultivierungen der überprüften Isolate konnten DALLA POZZA et al. (1999) die Reproduzierbarkeit der Methoden und die Stabilität des Protein A-Gens nachweisen.

## 5.2 Hämolyse nachweis

Die Beurteilung der Hämolyse erfolgte nach Anzucht der Bakterien auf Schafblutagarplatten und nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Ausstrichmethode.

Zur Unterscheidung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Hämolyse beschrieben SKALKA et al. (1979) sowie HERBERT und HANCOCK (1985) antagonistische bzw. synergistische Reaktionen dieser Hämolyse mit dem Staphylokokken- $\beta$ -Hämolysin. Hierbei wurden die zu prüfenden Kulturen im 90°-Winkel zu einer  $\beta$ -Hämolysin-

produzierenden Staphylokokkenkultur auf Schafblutagarplatten ausgestrichen und bebrütet. Eine  $\alpha$ -Hämolyse zeigt sich dabei auf Schafblutagar als vollständige Hämolyse um den Staphylokokkenimpfstrich, die aber im Bereich des  $\beta$ -Hämolysins gehemmt wird. Eine  $\beta$ -Hämolyse ist durch eine unvollständige Hämolysezone um den Staphylokokkenimpfstrich gekennzeichnet. Eine  $\delta$ -Hämolyse zeigt sich als halbmondförmige Zone einer vollständigen Hämolyse in der Berührungsstelle des zu untersuchenden Stammes und des  $\beta$ -Hämolysin produzierenden *S. aureus*.

Von den 325 Isolaten zeigten 310 eine Hämolyse, 15 Isolate waren nicht-hämolysierend.

### 5.3 Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

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. Die Makrorestriktionsanalyse der Gesamt-DNA der *S. aureus*-Kulturen ergab in der vorliegenden Arbeit 15 unterscheidbare DNA-Restriktionsmuster. Die Auswertung dieser in der Elektrophorese dargestellten Bandenmuster war visuell möglich. In 17 Betrieben waren *S. aureus*-Kulturen mit einem identischen Bandenmuster vertreten. In 16 anderen Betrieben waren zwei unterschiedliche PFGE-Muster und in nur einem Betrieb waren *S. aureus*-Kulturen mit drei unterschiedlichen PFGE-Mustern nachweisbar. Der Vergleich der Fragmente, insbesondere die Auswertung der Fragmentlängenmuster, erfordert eine reproduzierbare und vergleichbare kolineare Auftrennung in allen Spuren des Gels (Abb. 48). 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.

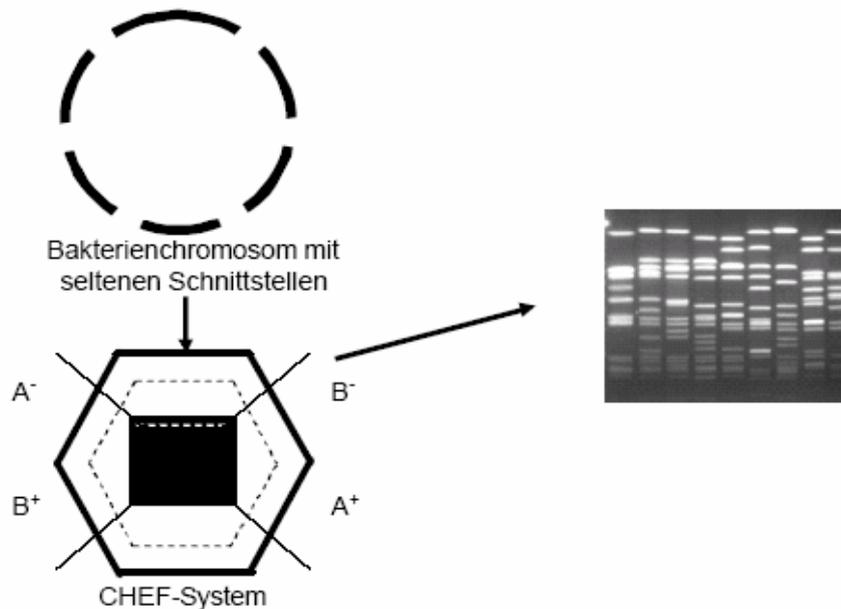


Abb. 48: Schema zur Funktionsweise der PFGE (CHEF-System) nach LAI et al. (1989)

Die von TENOVER et al. (1995) beschriebene, allgemein gültige Verfahrensanweisung für den Vergleich von PFGE-Fragmentmustern gibt an, dass Isolate, die in bis zu drei Bandenpositionen differieren, aus einem einzigen genetischen Vorfall entstanden sein können. Kulturen, die in mehr als drei Positionen differieren, können, nach TENOVER et al. (1995), ebenfalls miteinander verwandt sein, wobei die verwandtschaftlichen Beziehungen der entsprechenden Kulturen jedoch nicht so eng sind (Tab. 20).

In Untersuchungen von TENOVER et al. (1994) und SCHMITZ et al. (1997) zeigte die PFGE bei mutmaßlichen epidemiologischen Zusammenhängen die beste Diskriminierungsfähigkeit. In Untersuchungen von DEGENER et al. (1994) und KLUYTMANS et al. (1998) hat sich ebenfalls die PFGE als „Mittel der Wahl“ zum Nachweis verwandtschaftlicher Beziehung auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) erwiesen.

Tab. 20: Schema zur Beurteilung von PFGE-Gelen nach TENOVER et al. (1995)

	<b>Genetische Ereignisse (n)</b>	<b>Bandenunterschiede</b>	<b>Interpretation</b>
Typ A	0	0	identisch
Subtyp A	1	2-3	teilidentisch
Nicht verwandt	2	4-6	nicht identisch

Die stärkste Diskriminierungsfähigkeit ( $D = 0,915$ ) ergab sich in Übereinstimmung mit verschiedenen Literaturangaben aus der Kombination verschiedener Typisierungsmethoden (TENOVER et al., 1994; AARESTRUP et al., 1995; SCHMITZ et al., 1997).

ANNEMÜLLER et al. (1999), ZSCHÖCK et al. (2000a), ZADOCKS et al. (2000), AKINEDEN et al. (2001) und SOMMERHÄUSER et al. (2003) untersuchten *S. aureus*-Stämme, isoliert von boviner Mastitis, mittels PFGE-Analysen unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *SmaI*. Nur wenige Bakterienklone waren innerhalb der Betriebe, teilweise auch betriebsübergreifend, für die Mastitissituation verantwortlich. Die Untersuchungen bestätigten damit die Kontagiosität dieses Mastitiserregers. HATA et al. (2006) fanden bei 231 *S. aureus*-Isolaten, isoliert von boviner Mastitis aus 214 verschiedenen Betrieben in 8 Distrikten, 16 unterscheidbare DNA-Bandenmuster (A bis P).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der als „Goldstandard“ bekannten Makrorestriktionsanalyse mittels PFGE unter Verwendung des Restriktionsenzym *SmaI* zusätzlich die Typisierung mittels *coa*- bzw. *spa*-Gen-Polymorphismen zur Vorauswahl der im Weiteren verwendeten Stämme angewendet.

Nach SCHLICHTING et al. (1993) und NADA et al. (1996) erreichte die Makrorestriktionsanalyse die höchste Diskriminierungsrate. Mittels Protein A-Gen-Polymorphismus bzw. Koagulase-Gen-Polymorphismus wurden vergleichsweise geringe Diskriminierungsraten erzielt.

Der höchstmögliche Grad des Nachweises der genetischen Diversität wurde durch die Kombination aller 3 vorgenannten Verfahren erreicht. Diese Verfahrensweise

wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um die Sicherheit der genetischen Verschiedenartigkeit ausgewählter Feldisolate für alle weitergehenden Untersuchungen, insbesondere dem PCR-Nachweis von Virulenzgenen, zu gewährleisten.

Der im Rahmen der *coa*-Gen-Polymorphismus-Untersuchung durchgeführte Restriktionsverdau mittels *AluI* ergab bis zu 3 Fragmente. Ebenso traten Isolate auf, deren Amplifikate durch *AluI* nicht geschnitten wurden. Bei dem *AluI*-Verdau von 116 PCR-Produkten des Koagulase-Gens fanden VIMERCATI et al. (2006) 1 bis 4 verschiedene Fragmente mit einer Größe von ca. 80 bis 600 Bp. MOON et al. (2007) untersuchten 696 *S. aureus*-Isolate aus boviner Mastitis. Durch den *AluI*-Verdau der PCR-Produkte konnten sie 1 bis 4 verschiedene Fragmente mit einer Größen von 126 bis 670 Bp nachweisen.

Die Voruntersuchungen zur Typisierung mittels der vorgenannten Methoden dienten jedoch auch einer epidemiologischen Kategorisierung einzelner *S. aureus*-Feldstämme. So wurden bei mindestens 6-fachem Auftreten eines *S. aureus*-Isolates mit identischem Typisierungsmuster innerhalb eines Milcherzeugerbetriebes der betreffende Stamm als „epidemisch“ eingestuft. Im Gegensatz dazu erfolgte die Einordnung einzelner *S. aureus*-Isolate in eutergesunden bzw. durch andere Leitkeime gekennzeichneten Betrieben als „sporadisch“.

Im Verlauf dieser Arbeit erwies sich diese Vorgehensweise jedoch als außerordentlich schwierig. Nur wenige *S. aureus*-Kulturen erfüllten die für die sporadischen Stämme geforderten Voraussetzungen. Daher wurden zusätzlich *S. aureus*-Feldisolate, die innerhalb eines epidemischen Infektionsgeschehens isoliert worden waren, die jedoch ein von dem dominierenden Stamm abweichendes Typisierungsmuster zeigten, als „sporadisch I“-Isolate bezeichnet, während Isolate aus dem oben beschriebenen Betrieben mit „sporadisch II“ benannt wurden. Dies führte zur Auswahl von 76 *S. aureus*-Kulturen.

## 5.4 Weiterführende Untersuchung ausgewählter *S. aureus*-Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit für weiterführende Untersuchungen ausgewählten 76 Kulturen konnten, wie im Folgenden aufgeführt, aufgrund ihrer kulturellen, biochemischen und molekularen Eigenschaften als *S. aureus* identifiziert werden. Somit wurden die Ergebnisse der Vorauswahl (5.1) bestätigt.

### 5.4.1 Phänotypische Charakterisierung ausgewählter *S. aureus*-Isolate

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden das Hämolyseverhalten, die Anzüchtung auf Staphylokokken-Selektivnährmedium, der Clumping-Factor-Test, das kommerzielle MASTASTAPH-Testsystem sowie der Nachweis der Enzyme DNase und Hyaluronidase herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit war eine alleinige  $\alpha$ -Hämolyse bei 14 (18,4%), eine  $\beta$ -Hämolyse bei 20 (26,3%) und eine  $\alpha\beta$ -Hämolyse bei 16 Kulturen (21,1%) nachweisbar. Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysin sind die am besten charakterisierten Hämolsine. Nach JONSSON et al. (1985) gehört das  $\alpha$ -Hämolysin zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* und kommt bei Tierisolaten häufig gemeinsam mit dem  $\beta$ -Hämolysin vor. JONSSON und WADSTRÖM (1993) wiesen das  $\beta$ -Hämolysin bei den meisten *S. aureus*-Stämmen, isoliert von Rindermastitiden, weniger jedoch bei *S. aureus*-Stämmen von Menschen, nach. Die Wirkung des  $\beta$ -Hämolysins *in vitro* wurde von CIFRIAN et al. (1996) geprüft. Diese Autoren zeigten, dass das  $\beta$ -Hämolysin nicht nur Drüsenzellen des Euters schädigt, sondern auch die schädigende Wirkung des  $\alpha$ -Hämolysins verstärkt, eine vermehrte Adhärenz an Drüsenzellen fördert und auch eine Proliferation von *S. aureus* begünstigt.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten 11 (14,5%) Kulturen nach der ursprünglich von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode eine  $\delta$ -Hämolyse. Das  $\delta$ -Toxin von *S. aureus* hat sehr starke Oberflächenaktivität und auf biologischen Membranen Detergentien-ähnliche Wirkung (SOMERVILLE et al., 2003).

Laut CLYNE et al. (1992) hemmen die in Blutagarplatten möglicherweise enthaltenen sulfonierten Polymere (Agar, Heparin, Dextran-Sulfat) bzw. Lipide (Phospholipide,

Fettsäuren und Cholesterol) das  $\gamma$ -Hämolyisin, weshalb sein Vorkommen in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden konnte.

Als phänotypischer Marker bietet sich das Hämolyseverhalten an, da sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu einigen Virulenzfaktorgenen ergab. Ebenfalls statistisch signifikant erwies sich der Zusammenhang zwischen Hämolyse und den genotypischen Markern *coa*-Repeats und *spa*-Repeats.

Zum Nachweis der Eigenschaften „Telluritreduktion“ und „Lipolyse“ erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf dem Staphylokokken-Selektivnährmedium (3.3.1.2) nach Baird-Parker (BAIRD-PARKER, 1962). Das Baird-Parker-Medium enthält neben Tellurit und Lithiumchlorid zur Hemmung der Begleitflora auch Pyruvat und Glycin, welche auf Staphylokokken selektiv wachstumsfördernd wirken. Durch Lipolyse und Proteolyse kommt es zu der charakteristischen Hof- und Ringbildungen, sowie infolge Reduktion des Tellurits zu Tellur zu einer Schwarzfärbung.

Der Nachweis des Clumping-Factors (CF) im Objektträgertest war bei allen 76 untersuchten Kulturen der vorliegenden Arbeit möglich. Der Nachweis des CF auf dem Objektträger stellt gegenüber dem Koagulase-Test eine wesentlich einfachere durchführbare Methode zur Identifizierung von *S. aureus* dar (CADNESS-GRAVES et al., 1943). Der CF gilt darüber hinaus als taxonomisches Kriterium für *S. aureus* (KLOOS und SCHLEIFER, 1986) und mit Einschränkung auch für *S. intermedius*, *S. hyicus* (DEVRIESE und HAJEK, 1980; LÄMMLER et al., 1985), *S. lugdunensis* und *S. schleiferi* (KLOOS und LAMBE, 1991). Es müssen jedoch nicht alle *S. aureus*-Stämme, besonders diejenigen bovinen Ursprunges, CF positiv sein. Ein hoher Prozentsatz von Koagulase-positiven *S. aureus*-Stämmen des Menschen ist allerdings auch gleichzeitig CF positiv (DUTHIE, 1954; HAJEK und MARSALEK, 1969). Bei bekapselten *S. aureus*-Stämmen können nach BLACKSTOCK et al. (1968) z.B. überlagernde Polysaccharide den CF abdecken.

Mit dem kommerziellen Nachweisverfahren MASTASTAPH-Testsystem war bei allen 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen eine positive Reaktion zu beobachten. Eine Identifizierung von *S. aureus* mit dem MASTASTAPH-Testsystem zeigte bei anderen Autoren eine variable Sensibilität von 98% bis 100% und eine Spezifität von 93,4% bis 96,2% (VAN GRIETHUYSEN et al., 2001; ZSCHÖCK et al., 2005a).

Bei den 76 Kulturen der vorliegenden Arbeit wurde ferner das Enzym DNase nachgewiesen. Das Vorhandensein dieser Enzyme wurde mit Hilfe des Fertignährmediums DNase-Testagar (3.3.1.6.1) untersucht. BOCKLISCH und WORBES (1993) untersuchten in einem Zeitraum von fünf Jahren 849 Milchproben von mastitiskranken Schafen, und wiesen darin nur *S. aureus*-Kulturen nach, die DNase positiv waren.

Übereinstimmend mit BRÜCKLER et al. (1994) konnte bei allen untersuchten 76 Kulturen das Enzym Hyaluronidase nachgewiesen werden. Nach diesen Autoren wird die Hyaluronidase vor allem von pathogenen Staphylokokken gebildet und ist bei nahezu allen koagulasepositiven Staphylokokken nachweisbar.

#### **5.4.2 Biotypisierung**

Mittels Biotypisierung konnten insgesamt sieben Biotypen unterschieden werden, von denen nur ein Biotyp dem Ökovar *bovis* zugeordnet werden konnte. Das Ökovar *bovis* (Biotyp 1) trat bei 25% aller Isolate auf. Die meisten Isolate waren jedoch keinem Ökovar zuzuordnen und gehörten somit den Biotypen 2 bis 7 an. Diese Verteilung entsprach weitgehend den Ergebnissen anderer Autoren. Auch hier konnten die meisten *S. aureus*-Isolate, isoliert von bovinen Mastitiden, keinem Ökovar zugeordnet werden. So wiesen HUMMEL et al. (1992) *S. aureus*-Isolate des Ökovars *bovis* mit einem Anteil von 22 - 38,3% nach. AARESTRUP et al. (1995) konnten dagegen unter 105 Isolaten das Ökovar *bovis* nicht nachweisen. SOMMERHÄUSER (2001) fand bei 110 *S. aureus*-Kulturen in 32,7% der Fälle das Ökovar *bovis*, bei 7,3% das Ökovar *ovis* und bei 4,5% das Ökovar *hominis*. 55,4% der Isolate waren nicht wirtsspezifisch.

#### **5.4.3 Nachweis *S. aureus*-spezifischer Gene mittels PCR**

In der vorliegenden Arbeit wurde im Weiteren das 23S rRNA-Gen zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* verwendet. Unter Nutzung der von STRAUB et al. (1999) beschriebenen Oligonukleotidprimer konnten alle 76 untersuchten Isolate als *S. aureus* identifiziert werden. LÄMMLER et al. (2000), AKINEDEN et al. (2001) und

auch CABRAL (2003) verwendeten ebenfalls die von STRAUB et al. (1999) beschriebenen Oligonukleotidprimer zur Identifizierung von *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus Milchproben von Kühen mit subklinischer Mastitis. HASSAN (2002) konnte zeigen, dass diese Oligonukleotidprimer zu keinen Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenkontrollstämmen führten.

Die Amplifizierung des Clumping-Factor-kodierenden Gens *clf* mit den nach STEPHAN et al. (2000) beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab bei 74 Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 1000 Bp und bei zwei Kulturen ein Amplikon in der Größe von 900 Bp. AKINEDEN et al. (2001) verwendeten bei der Untersuchung von 103 *S. aureus*-Isolaten aus Rindermastitiden ebenfalls die genannten *clfA*-spezifischen Oligonukleotidprimer und erhielten Amplikongrößen von 940 und 1000 Bp. STEPHAN et al. (2000) hingegen fanden bei allen 34 untersuchten *S. aureus*-Stämmen eine einheitliche Amplikongröße des *clfA*-Gens mit 1000 Bp. Auch in Untersuchungen anderer Autoren wurden überwiegend *clfA*-Gene in der Größe von 1000 Bp nachgewiesen [CABRAL (2003); REINOSO et al. (2007); AKINEDEN (2006)].

Der Nachweis des Gens *clf* erwies sich somit ebenso als konstante Eigenschaft von *S. aureus* und als weitere Möglichkeit zur Identifizierung dieser Spezies.

#### **5.4.4 Nachweis von mutmaßlichen Virulenzfaktorgenen mittels PCR**

Bei der Amplifizierung des die IgG-bindende-Region kodierenden Teils des *spa*-Gens wiesen 88,2% der untersuchten 76 Isolate ein Amplikon mit einer Größe von 920 Bp, 6,6% der Isolate ein Amplikon mit einer Größe von 560 Bp und 5,2% der Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 380 Bp auf. STEPHAN et al. (2000), AKINEDEN et al. (2001) und HASSAN (2002) fanden bei den meisten untersuchten *S. aureus*-Kulturen ebenfalls eine Amplikongröße von 920 Bp. AKINEDEN fand bei einer Untersuchung in 2006 drei Amplikongrößen (920, 750, 580 Bp) mit 5, 4 und 3 Repeats.

Bei der Amplifizierung des second IgG-binding protein-Gens *sbi* waren nur 21 (27,6%) der 76 *S. aureus*-Kulturen positiv. Das *sbi*-Gen war bei zwei (5,9%) Stämmen aus der „epidemischen“ Gruppe, bei 8 (66,7%) „sporadisch I“-Stämmen,

bei 10 (66,7%) „sporadisch II“-Stämmen und bei nur einem anhämolysierenden (6,7%) *S. aureus*-Stamm nachweisbar. EI-SAYED et al. (2006) hingegen konnte bei 40 *S. aureus*-Isolaten aus klinischen und subklinischen Rindermastitiden das *sbi*-Gen gar nicht nachweisen. Dennoch ist die Fähigkeit, IgG zu binden, unter den Staphylokokken und Streptokokken weit verbreitet, was die Vermutung zulässt, dass diese Fähigkeit für die Pathogenese von Bedeutung sein könnte (ZHANG et al., 1998a).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie das für das Fibronektin-bindende Protein A (FnBPA) kodierende Gen *fnbA* bei allen 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen nachgewiesen. Bei der Amplifizierung des FnBPB-kodierenden Gens *fnbB* waren nur 38 (50%) der *S. aureus*-Kulturen positiv. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen von CABRAL (2003), der bei allen *S. aureus*-Kulturen *fnbA* nachwies, *fnbB* jedoch nur bei 37 (42,5%) von 87 *S. aureus*-Kulturen. EI-SAYED et al. (2006) fanden das Gen *fnbA* bei allen *S. aureus*-Stämmen, das *fnbB*-Gen mit einer Amplikongröße von 820 Bp jedoch nur bei 18 (75%) bzw. 6 (37,5%) *S. aureus*-Stämmen aus klinisch bzw. subklinisch erkrankten Tieren. Bei der explorativen statistischen Analyse fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *fnbB*-Gen Nachweis, der phänotypischen Ausbildung einer  $\delta$ -Hämolyse und dem bovinen Biotyp.

Nach Angaben zahlreicher Autoren (BOOTH et al., 2001; MOORE und LINDSAY, 2001) ist das Gen *cna* des Kollagen-bindenden Proteins nur vereinzelt bei *S. aureus* feststellbar. Korrespondierend zu diesen Angaben wurde dieses Gen mit den Genabschnitten *cnaA* und *cnaB* in der vorliegenden Arbeit bei nur insgesamt 12 Kulturen nachgewiesen. Bei der Amplifizierung des *cna*-Gen-Abschnitts A war eine Amplikongröße von 1600 Bp und bei *cnaB* Amplikongrößen von 1200 und 640 Bp nachweisbar. Vergleichbare Ergebnisse erzielten in ihren Untersuchungen auch CABRAL (2003), ZECCONI et al. (2005), EL-SAYED et al. (2006) und REINOSO et al. (2007). Nach SNODGRASS et al. (1999) sind Genmutanten, die keinen B-Abschnitt des *cna*-Gens besitzen, trotzdem fähig, Kollagen zu binden. Da dieses adhäsive Gen nicht bei allen *S. aureus*-Stämmen vorkommt, ist es möglicherweise für die Virulenz einzelner Stämme dieser Spezies von Bedeutung (BOOTH et al., 2001; MOORE et al., 2001). Bei der explorativen statistischen Auswertung der

vorliegenden Arbeit ergaben sich gegenüber dem epidemiologischen Verhalten sowie der Höhe der Zellzahl als Entzündungsparameter sowohl auf Viertel- als auch auf Betriebsebene keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Diese und die Ergebnisse aus der Literatur könnten darauf hinweisen, dass dieses Bindungsprotein keine oder nur eine untergeordnete Bedeutung bei der bovinen *S. aureus*-Mastitis hat.

Das Elastin-bindende Protein kodierende Gen *ebpS* konnte in der vorliegenden Untersuchung bei allen 76 *S. aureus*-Kulturen mit einer einheitlichen Größe von 1330 Bp nachgewiesen werden. Dies entspricht Untersuchungsergebnissen von EL-SAYED et al. (2006), die ebenfalls bei allen untersuchten *S. aureus*-Stämmen *ebpS* nachweisen konnten. Aufgrund des universellen Auftretens des *ebpS*-Gens bei allen untersuchten *S. aureus*-Kulturen scheint auch dieses Gen für das epidemiologische Verhalten eines Isolates eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In 23 (30,3%) der 76 *S. aureus*-Kulturen wurde das Mikrokapselform Typ 5-kodierende Gen *cap5* gefunden, 53 (69,7%) der untersuchten Kulturen waren positiv für das Mikrokapselform Typ8-kodierende Gen *cap8*. Zu ähnlichen Nachweisraten von *cap8* kamen auch MOORE und LINDSAY (2001), CABRAL (2003) und HATA et al. (2006). Auch bei Kulturen aus den USA fand POOLMAN (1990) 15% der Kulturen positiv für Serotyp 5 und 27% der Kulturen positiv für Serotyp 8. REINOSO et al. (2007) dagegen wiesen bei 21 (47%) *S. aureus*-Kulturen *cap5* (11 humane, 9 bovine Stämme und ein Stamm aus einem Lebensmittel) nach, nur 7 (15%) *S. aureus*-Isolate waren positiv für *cap8* (4 vom Menschen und 3 aus einem Lebensmittel).

Die im Hinblick auf das epidemiologische Verhalten und die Zellzahl explorativ ausgewerteten Nachweisraten der Mikrokapselformgene ergaben in dieser Untersuchung jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Somit ist die Bedeutung der Mikrokapselformgene für das epidemiologische Verhalten bzw. die Zellzahl nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie ebenfalls unwesentlich.

Der genotypische Nachweis der Hämolyisin-Gene ergab in der vorliegenden Untersuchung 72 (94,7%) *hla*-positive und 60 (78,9%) *hly*-positive *S. aureus*-Kulturen. Alle 76 untersuchten Stämme waren positiv für *hly* und 70 (92,1%) waren positiv für *hlg*. Die Verteilung auf die epidemiologischen Gruppen „epidemisch“, „sporadisch I und II“ sowie „anhämolyisierend“ war unterschiedlich.

CABRAL (2003) fand für *hla* bei 86 (98,9%) und für *hnb* bei 84 (96,6%) der untersuchten Kulturen eine positive Reaktion, ANDO et al. (2004) beschrieben bei 109 MRSA-Isolaten 89 (81,7%) als *hla*-positiv und 73 (67%) als *hnb*-positiv. FUEYO et al. (2005) fanden bei 84 *S. aureus*-Isolaten aus subklinischer Mastitis 100% positiv für *hla* und *hlg*, 81 (96,4%) *hld*-positiv und 76 (90,5%) *hnb*-positiv.

Phänotypisch war in der vorliegenden Untersuchung eine  $\alpha$ -Hämolyse sowohl nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode zur Unterscheidung der Hämolyseformen als auch auf Columbia-Blut-Agarplatten (siehe [3.3.1.1](#)) nachweisbar. Das *hla*-Gen war bei 72 (94,7%) Kulturen nachweisbar, phänotypisch zeigte sich eine  $\alpha$ -Hämolyse jedoch nur bei 30 (39,5%) Kulturen. Ebenso fanden sich 24 (31,5%) *hnb*-positive Kulturen, die phänotypisch  $\beta$ -Hämolysin negativ waren.

Eine Erklärung könnte sein, dass das jeweilige Hämolysin-Gen unter den gegebenen Bedingungen kein Hämolysin exprimiert. Das Auftreten einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - sowie auch eine  $\delta$ -Hämolyse scheint, nach den Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, typisch für *S. aureus* aus Mastitismilchproben zu sein.

Der genotypische Nachweis der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysin-Gene scheint in der Praxis relativ wenig Aussagekraft zu besitzen wie die festgestellten, deutlichen Diskrepanzen zwischen dem Nachweis von *hla*, *hnb* und dem tatsächlichen Hämolyseverhalten zeigten. Dies wurde für die *S. aureus*-Hämolysine auch von CABRAL (2003) beschrieben.

Bezüglich der explorativen statistischen Analyse des Auftretens der verschiedenen Hämolysingene ergab sich lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *hlg* und dem epidemiologischen Verhalten.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte im Weiteren bei allen 76 untersuchten *S. aureus* das ED-Leukotoxin (*luk E/D*) nachgewiesen werden. Nach GRAVET et al. (1999) wurde dieses Leukotoxin (*lukE-lukD*) von 93,6% der 47 repräsentativ ausgewählten *S. aureus*-Stämme produziert. In einer Arbeit aus dem Jahre 2001 fanden GRAVET et al. 66 von 83 (75%) *S. aureus*-Isolaten positiv für *LukE-LukD*. FUEYO et al. (2005) fanden bei 84 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von subklinischen bovinen Mastitiden, 83 (98,8%) *luk E/D*-positiv-Kulturen, ein Isolat war negativ.

Aufgrund des generellen Auftretens des Gens scheint der Einfluß auf das epidemiologische Verhalten bzw. die Höhe des Zellzahl-niveaus gering oder nicht vorhanden zu sein.

Die *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin auf das Vorkommen von Enterotoxin- und von anderen Toxingenen untersucht.

Mittels PCR waren die Toxingene relativ einfach nachweisbar. Anhand der PCR-Ergebnisse konnten die Isolate 12 verschiedenen Toxingenprofilen zugeordnet werden. Insgesamt konnten bei 39 (51,3%) *S. aureus*-Isolaten ein oder mehrere Toxingene nachgewiesen werden.

Um den Arbeitsaufwand beim routinemäßigen Nachweis der Enterotoxingene zu reduzieren, wurde versucht, eine „Multiplex-PCR“ für möglichst viele Toxingene zu entwickeln. Zunächst wurden alle Enterotoxin-Referenzstämme und alle 76 *S. aureus*-Isolate der vorliegenden Studie mittels drei verschiedener „Multiplex-PCR“-Protokolle auf das Vorkommen von Enterotoxingenen untersucht. Konnte in der „Multiplex-PCR“ ein Enterotoxin nachgewiesen werden, wurde das Ergebnis mit einer Einzel-PCR nochmals überprüft. Die „Multiplex-PCR“ erzielte dabei in Bezug auf die Toxingene eine vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Einzel-PCR. Auch andere Autoren berichteten über den Einsatz der „Multiplex-PCR“ zum Nachweis von Enterotoxingenen. TAMARAPU et al. (2001) beschrieben eine „Multiplex-PCR“ für den schnelleren Nachweis von Enterotoxingenen bei *S. aureus* in Milchprodukten. NAJERA-SANCHEZ et al. (2003) untersuchten Enterotoxinogene von *S. aureus*-Isolaten aus Fleisch und Milchprodukten und entwickelten zwei „Multiplex-PCR“ zum gleichzeitigen Nachweis der Staphylokokkenenterotoxingene A bis E.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Nachweises der einzelnen Enterotoxingene bzw. anderer Toxingene diskutiert:

Bei keiner der untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnten die Gene *sea*, *seb*, *eta* und *etb* nachgewiesen werden.

Das *sed*-Gen war bei 3 der 76 (3,9%) *S. aureus*-Kulturen, immer gemeinsam mit dem *sej*-Gen nachweisbar, *see* konnte nur bei einer (1,3%) *S. aureus*-Kultur, *sec* bei 14 (18,4%) und *tst* bei 13 (17,1%) Stämmen nachgewiesen werden. *Sec* kam bei 13 Kulturen gemeinsam mit *tst* vor. Bei einem Isolate konnte das *sec*-Gen jedoch nur alleine nachgewiesen werden. Aus den Untersuchungen von FITZGERALD et al. (2001) geht hervor, dass das gemeinsame Auftreten der beiden Toxingene *sec* und *tst* auf das Vorhandensein der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel SaPI<sub>bov</sub>

zurückzuführen ist, welche die Gene *tst* und *sec-bovine*, sowie das Enterotoxin-ähnliche Gen *seI* beinhaltet. Der für *tst*-kodierende Abschnitt dieser Pathogenitätsinsel stimmt laut FITZGERALD et al. (2001) in der Sequenz mit der bereits 1998 von LINDSAY et al. beschriebenen Staphylokokken-Pathogenitätsinsel SaPI1 überein, welche die Gene *tst* und *ent*, getrennt von einem 10234 kb großen Bereich, beinhaltet. Der Nachweis von *sec* und *tst* war statistisch signifikant korreliert mit dem phänotypischen Merkmal Hämolyse, insbesondere mit dem Auftreten des  $\beta$ -Hämolysins.

In der vorliegenden Arbeit wurden vermehrt die häufig gemeinsam auftretenden Toxingene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* gefunden. JARRAUD et al. (2001) stellten im Rahmen von Sequenzanalysen fest, dass *seg*, *sei*, *sem*, *sen* (ehemals *sek*) und *seo* (ehemals *seI*) gemeinsam auf einem 3,2 kb großen DNA-Fragment liegen und bezeichneten dieses Fragment als „enterotoxin gene cluster“ (*egc*). Die Gene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* traten, wie aufgrund des gemeinsamen Vorkommens dieser Gene auf einer Pathogenitätsinsel zu erwarten war, in den vorliegenden Untersuchungen immer gemeinsam auf. Dies bestätigte die Untersuchungsergebnisse von JARRAUD et al. (1999 und 2001). HATA et al. (2006) fanden bei 231 *S. aureus*-Kulturen 167 mal *seg*, 161 mal *sei*, 29 mal *sen*, 14 mal *seo* und 8 mal *sem*. ZECCONI et al. (2006) wiesen bei 50 untersuchten *S. aureus* isoliert von boviner Mastitis 35 mal *seg* (70%) und 50 mal *sei* (100%) nach. VIMERCATI et al. (2006) fanden bei 51 *S. aureus*-Kulturen aus boviner Mastitis *seg* 3 mal (6%) und *sei* 2 mal (4%).

Das Toxigen *seh* war in dieser Arbeit nur bei fünf (6,6%) Kulturen nachweisbar. OMOE et al. (2002) untersuchten 146 *S. aureus*-Kulturen, isoliert vom Menschen und aus Milchproben, und konnten bei 21 (14,4%) Isolaten das Gen *seh* und bei 20 (13,7%) Isolaten auch die Expression von SEH nachweisen. HATA et al. (2006) wiesen bei 231 untersuchten *S. aureus*-Kulturen nur vier *seh*-positive Stämme nach. VIMERCATI et al. (2006) fanden bei 51 *S. aureus*-Kulturen aus boviner Mastitis nur einen Stamm (2%), der *seh* positiv war.

Das Toxingen *sej* war in dieser Untersuchung bei drei (3,9%) Kulturen nachweisbar. *sej* wurde, wie bereits beschrieben, immer gemeinsam mit dem *sed*-Gen nachgewiesen. Beide Gene werden von *S. aureus* exprimiert, scheinen aber einer unterschiedlichen Regulation zu unterliegen. Durch PCR-Amplifikationen konnte bewiesen werden, dass alle *sed*-tragenden Plasmide auch *sej* tragen (ZHANG et al., 1998b). Mehrere andere Autoren beschrieben die vergleichbare Ergebnisse (AKINEDEN et al., 2001; FUEYO et al., 2005; VIMERCATI et al., 2006; ZECCONI et al., 2006).

KATSUDA et al. (2005) fanden bei 270 *S. aureus*-Kulturen aus bovinen Mastitiden 183 (67,8%) positiv für ein oder mehrere Toxingene. Es wurden 5 Gruppen unterschieden, je nach Vorkommen der Gene: 2 Stämme waren positiv für *seh*, 151 für *sec*, *seg*, *sei* und *tst*, 21 für *seg* und *sei*, 6 für *sec*, *sed*, *seg*, *sei*, *sej* und *tst* und 3 für *sec* und *tst*. ZSCHÖCK et al. (2005) wiesen mittels PCR bei 104 *S. aureus*-Kulturen aus boviner Mastitis bei 61 (58,7%) ein oder mehrere der „neuen“ Enterotoxingene nach: bei 36 Kulturen war *seg* nachweisbar, bei 22 Kulturen *sei*, bei 23 Kulturen *sej* und bei 37 von 61 *S. aureus*-Stämmen wurde eine Kombination von Genen, die für die Enterotoxin-Typen A-E oder TSST1 kodieren, nachgewiesen. HATA et al. (2006) untersuchten 231 *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus bovinen Mastitiden, und wiesen bei 3 Kulturen *seb*, bei 109 Kulturen *sec* und *tst* nach. ZECCONI et al. (2006) fanden bei 50 *S. aureus*-Kulturen aus bovinen Mastitiden *sea* 9 mal (18%), *sec* 22 mal (44%), *sed* 31 mal (62%) und *see* nur einmal (2%). VIMERCATI et al. (2006) fanden bei 116 *S. aureus*-Stämmen (51 Stämme aus bovinen Mastitiden) *sea* in 22 (43%) Fällen, *sec* in 2 (4%) Fällen und *sed* in 26 (51%) Fällen.

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem epidemiologischen Verhalten und dem Auftreten einzelner Enterotoxingene waren bei der als Enterotoxingen-Cluster (*egc*) bezeichneten Pathogenitätsinsel, die die Gene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo* beinhaltet, gegeben. Auch bezüglich der Zellzahl auf Viertelgemelksproben-Ebene war ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisbar. Dem Enterotoxingen-Cluster scheint somit bezüglich der pathogenen Eigenschaften des *S. aureus* eine Bedeutung zu zukommen.

Die *S. aureus*-Kulturen wurden ferner hinsichtlich des Gens *ssI7* (*set1*), das ein SSL kodiert, untersucht, wobei 62 (81,6%) Kulturen positiv und 14 (18,4%) Kulturen negativ waren. CABRAL (2003) beschrieb von 87 *S. aureus*-Isolaten 85 (97,7%) Kulturen als positiv für *ssI7* und nur zwei (2,3%) als negativ. EL-SAYED et al. (2006) wiesen bei allen 24 *S. aureus*-Isolaten (100%) das *ssI7*-Gen nach. Die *ssI7*-Gene können mit zahlreichen Variationen auf einer Pathogenitätsinsel vorkommen (KURODA et al., 2001). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Gens, dem epidemiologischen Verhalten und der Zellzahl war nicht nachweisbar. Die Bedeutung dieses Virulenzfaktors für die *S. aureus*-Mastitis ist unklar.

## 5.5 Reverse Transkriptions-PCR

Die RT-PCR diente in den vorliegenden Untersuchungen als Methode zum Nachweis der Genexpression. Damit sind zwar keine definierten Aussagen zur „Produktivität“ eines Isolates möglich, es kann im Gegensatz zur DNA-PCR jedoch zumindest die tatsächliche Bildung des entsprechenden Proteins als wahrscheinlich angesehen werden. Bisher wurde diese Technik erst sporadisch für einzelne Toxingene eingesetzt (JARRAUD et al., 1999; OMOE et al., 2002).

Die genomische DNA und die mRNA der Toxine sind mit RT-PCR nicht zu unterscheiden, da RNA-Präparationen geringe Mengen genomischer DNA enthalten. Daher musste zunächst ein DNase-Verdau vor der eigentlichen RT-PCR durchgeführt werden. Die vollständige DNA-Elimination wurde mit einer Kontrollreaktion nachgewiesen. Zu den weiteren Kontrollen gehörte eine Negativkontrolle zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen der Reagenzien und eine Positivkontrolle zur Funktionsprüfung der PCR.

Im Rahmen der Optimierung erwiesen sich die DNase-Behandlung und die Reverse Transkription als kritische Schritte, während die eigentliche PCR relativ leicht zu etablieren war. Zur Überprüfung, ob die RT-PCR die richtigen Amplifikate nachwies, wurden diese mit der bei jeder PCR mitgeführten DNA-Probe des jeweiligen Referenzstammes verglichen.

In dieser Arbeit gelang es erstmals, eine RT-PCR für fast alle bekannten Toxingene (*sec*, *tst*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) sowie für die Gene *fnbA* und *luk E/D* zu entwickeln und zu etablieren.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass die nachgewiesenen und anschließend untersuchten Gene auch tatsächlich exprimiert wurden.

AKINEDEN (2006) konnte mit Hilfe der RT-PCR, mit Ausnahme von *seo*, alle Toxingene nachweisen. Eine quantitative Aussage zur Menge an gebildetem Protein war aus oben erwähnten Gründen nicht möglich. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass neben den klassischen Enterotoxinen SEA-SEE auch mit der Expression der „neuen“ Toxine gerechnet werden muss.

Die exemplarisch anhand von 10 Feldisolaten durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass für die nachgewiesenen Enterotoxingene, denen offensichtlich eine besondere Bedeutung innerhalb der Pathogenese der *S. aureus*-Mastitis zukommt, eine Expression stattfindet.

## 5.6 Antibiotische Resistenzgene

Penicillin gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Lactamantibiotika und wirkt bakterizid auf proliferierende Keime. Ihr  $\beta$ -Lactam-Ring reagiert mit der Mureintranspeptidase, einem für den Aufbau der Bakterienzellwand wichtigen Enzym. Einige Bakterien, insbesondere *S. aureus*, sind in der Lage,  $\beta$ -Lactamasen zu bilden (KROKER, 1997). Von den 76 untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich 45 (59,2%) Stämme als resistent gegenüber Penicillin. Die Ergebnisse mehrerer Studien (ERSKINE et al., 2002; GUERIN-FAUBLEE et al., 2003; VINTOV et al., 2003; RABELLO et al., 2005) zeigten, dass ca. 30 bis 70% der Mastitis-auslösenden *S. aureus* vom Rind Penicillin-resistent waren. BOERLIN und NICOLET (2002) beschrieben für *S. aureus* eine seit den achtziger Jahren zunehmende Resistenz gegenüber Penicillinen. So fanden ØSTERAS et al. (2006) bei 11,4% der insgesamt 1155 von diesen Autoren untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, Antibiotikaresistenzen, dies insbesondere gegenüber Penicillinen. Auch ROESCH et al. (2006) untersuchten *S. aureus* aus Rindermastitiden und fanden 16% der Stämme resistent gegenüber Penicillin. BENNEDSGAARD et al.

(2006) wiesen bei 74 (10%) *S. aureus*-Isolaten aus Rindermastitiden aus Dänemark eine Penicillin-Resistenz nach. ANDERSON et al. (2006) fanden bei 357 *S. aureus*-Isolaten aus Milchproben vom Rind 46 Stämme (13%) resistent gegenüber Penicillin. Das Resistenzverhalten gegenüber Penicillinen entspricht weitgehend dem in der Literatur beschriebenen, wobei die in der Humanmedizin häufig zu beobachtende Resistenz gegenüber synthetischen Penicillinen bei bovinen *S. aureus*-Stämmen aus Mastitisfällen nicht nachweisbar war.

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich alle 76 Kulturen als empfindlich gegenüber Methicillin. Methicillin war das zuerst in die Therapie eingeführte penicillinasefeste Penicillin. Dies war aber nur parenteral anwendbar, relativ toxisch und hatte eine geringere *in vitro*-Aktivität auf penicillinasebildende Staphylokokken. Daher wurde es durch die später entwickelten penicillinasefesten Isoxazolylpenicilline Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin abgelöst (SIMON und STILLE, 2000).

*mecA* kodiert für das Penicillin-bindende-Protein PBP2a. Laut BRANDER et al. (1991), GRÄFE (1992) sowie BRAKSTAD und MAELAND (1997) führen Modifikationen der penicillinbindenden Proteine (PBPs) zu Resistenzen von Staphylokokken gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika.

Staphylokokken besitzen fünf verschiedene membrangebundene Penicillin-bindende Proteine, die die Quervernetzung der Peptidglykanschichten der Zellwand durch eine Transpeptidation bewirken (PINHO et al., 2001; WALTHER et al., 2006).

MOON et al. (2007a) fanden bei insgesamt 835 *S. aureus*-Isolaten von boviner Mastitis in Korea 21 (2,8 %) Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), das *mecA*-Gen wurde bei 13 der 21 MRSA gefunden. Das *mecA*-Gen wurde von diesen Autoren bei MRSA mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Methicillin von  $\geq 16\mu\text{g} / \text{ml}$  häufiger gefunden als bei solchen mit einer MHK  $\leq 8\mu\text{g} / \text{ml}$ . Bei den 8 *mecA*-negativen *S. aureus* war die MHK  $< 32\mu\text{g} / \text{ml}$ .

Nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen sowie der Literatur scheint MRSA im Bereich der bovinen Mastitis keine Bedeutung zuzukommen.

## 5.7 Beurteilung der phänotypischen und genotypischen Marker

Neben der Beurteilung der Virulenzeigenschaften sollten einzelne phänotypische und genotypische Marker dahingehend geprüft werden, inwieweit eine prospektive Aussage bezüglich der Virulenz einzelner *S. aureus*-Stämme bei der bovinen *S. aureus*-Mastitis gemacht werden kann.

Als wichtige, in der Routinediagnostik einfach detektierbare phänotypische Marker wurden das Hämolyseverhalten und der Biotyp ausgewählt. Wie oben bereits ausgeführt, kann der Biotyp durch Beurteilung der Koagulaseaktivität gegenüber Rinderplasma labortechnisch relativ leicht bestimmt werden.

Bezüglich der phänotypischen Hämolyseeigenschaften ergaben sich bei der explorativen statistischen Auswertung signifikante Zusammenhänge zum Auftreten der im *egc*-Genkomplex vertretenen Gene (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) sowie zu *hly*, *sec* und *tst*. Weiterhin bestand ein signifikanter Zusammenhang zum Auftreten von *fnbB* und den Mikrokapselfen *cap5* und *cap8*. Statistisch signifikant waren ebenfalls das phänotypische Hämolyseverhalten und die Summe der Enterotoxingene, die Summe der Anheftungsfaktorengene und die Anzahl der *coa*-Repeats. Statistisch hoch signifikant waren die Summe der Mikrokapselfene, die Summe aller Virulenzfaktorgene und die Anzahl der *spa*-Repeats.

VANCRAEYNEST et al. (2006) fanden bei 2 Typen von *S. aureus*-Infektionen signifikante Zusammenhänge zwischen dem Krankheitsbild (Pododermatitis, subkutane Abszesse und Mastitis bei Kaninchen) und der genetischen Ausstattung der verursachenden Stämme: Typ 1 (Low virulence, LV) war negativ für *egc*, während Typ 2 (high virulence, HV) positiv für *egc* war.

WILLEM et al. (2005) wies das Gen *tst* statistisch signifikant häufiger nach sowohl bei Stämmen tierischen Ursprungs ( $p < 0,0001$ ) als auch bei Stämmen aus Mastitisgeschehen ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zu humanen Isolaten.

Der bovine Biotyp scheint im Vergleich zum Hämolyseverhalten die Virulenzeigenschaften weniger zuverlässig vorausszusagen. Signifikante Zusammenhänge ergaben sich bezüglich der Summe der Virulenzfaktorgene, den Mikrokapselfenen sowie zur Anzahl der *coa*-Repeats.

Neben den labortechnisch relativ einfach nachzuweisenden phänotypischen Eigenschaften sollten auch genotypische Marker, nämlich die Anzahl der *coa*- und *spa*-Repeats auf ihre Eignung zur prospektiven Beurteilung der Virulenzeigenschaften eines *S. aureus*-Isolates geprüft werden. Die explorative statistische Auswertung ergab bei den *coa*- bzw. *spa*-Repeats signifikante Zusammenhänge zum *egc*-Genkomplex sowie zum *hla*-Gen. Bei den *spa*-Repeats waren zusätzlich hoch signifikante Zusammenhänge zu den Mikrokapselgenen *cap 5* und *8* sowie zur Summe der Mikrokapselgene nachweisbar. FRÉNAY et al. (1994) fand bei den meisten epidemischen MRSA-Isolaten (24 von 33) mehr als 7 *spa*-Repeats, während die meisten nicht-epidemischen MRSA-Stämme (10 von 14) 7 oder weniger *spa*-Repeats enthielten. Auch ZECCONI et al. (2006) stellten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen *S. aureus*-Stämmen mit mehr als 9 *spa*-Repeats und der Anzahl somatischer Zellen bei der bovinen Mastitis.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich bei der *S. aureus*-Mastitis des Rindes Feldstämme mit unterschiedlichem Spektrum mutmaßlicher Virulenzfaktoren nachweisen lassen. Nach stichprobenartiger Überprüfung scheinen die nachgewiesenen Gene auch aktiv exprimiert zu werden. Dabei sind zum Teil statistisch signifikante Zusammenhänge zum epidemiologischen Verhalten des betroffenen Stammes und der Anzahl somatischer Zellen gegeben.

Die vorgestellten Ergebnisse könnten zur Entwicklung einer universellen, in jeder Herde einsetzbaren Vakzine unter Verwendung häufig vorkommender Virulenzfaktoren beitragen. Ebenso könnte durch die vorgestellten Verfahren die Auswahl eines dominierenden und damit für die Eutergesundheit entscheidenden Erregerstammes zur Herstellung einer stallspezifischen Vakzine unterstützt werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Untersuchungen wurden insgesamt 325 präsumtiv identifizierte bovine *S. aureus*-Kulturen aus Viertelgemelksproben der Routinediagnostik des LHL, Gießen verwendet. Die Isolate stammten aus unterschiedlichen Regionen in Hessen aus Betrieben mit zum Teil hochgradigen Eutergesundheitsstörungen.

310 Stämme zeigten phänotypisch eine Hämolyse, 15 waren anhämolisierend.

Unter Verwendung verschiedener Genotypisierungsverfahren (Makrorestriktionsanalyse, *coa*-/*spa*-Gen-Polymorphismus) erfolgte unter den hämolysierenden Stämmen eine Auswahl von 61 genetisch differenten *S. aureus*-Isolaten für die weitergehenden Untersuchungen. Ergänzt wurden diese durch die 15 anhämolisierenden *S. aureus*-Kulturen.

Traten genotypisch identische *S. aureus*-Feldisolate in einem Betrieb mehrfach ( $\geq 6$  Kulturen) bei verschiedenen Kühen auf, wurde das betreffende Isolat als „epidemisch“ gewertet. Nur vereinzelt auftretende Genotypen galten als „sporadisch“. Alle 76 ausgewählten Feldstämme wurden nach eingehender kultureller, biochemischer und molekularbiologischer Speziesidentifizierung hinsichtlich mutmaßlicher Virulenzfaktorgene, wie z.B. Anheftungsfaktor-, Mikrokapselfaktor-, Hämolysin- und weiterer Toxingene untersucht.

Zur Beurteilung des krankmachenden Potentials erfolgte eine Zuordnung der Zellzahl der Ursprungsviertelgemelksprobe zu Eigenschaften von jedem dieser ausgewählten *S. aureus*-Feldisolate (Viertel-Zellzahl), ebenso wie eine Zuordnung der durchschnittlichen Zellzahl der Viertelgemelksproben der untersuchten Viertel eines Betriebes, die positiv für die genotypisch identischen *S. aureus*-Isolate waren (Betriebs-Zellzahl).

Die anschließend durchgeführte explorativ-statistische Auswertung ergab signifikante Zusammenhänge zwischen dem epidemiologischen Verhalten und dem Auftreten der im *egc*-Gencluster zusammengefassten Enterotoxingene *seg*, *sei*, *sem*, *sen* und *seo*. Ebenso war das phänotypische Hämolyseverhalten statistisch signifikant mit dem Auftreten des *egc*-Genclusters verbunden. Bezüglich der genetischen Marker *coa*- und *spa*-Gen war die Repeat-Anzahl ebenfalls statistisch signifikant mit dem Auftreten des *egc*-Genclusters korreliert. Und schließlich ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Ursprungsviertelgemelksprobe und dem

*egc*-Gencluster. Zusätzlich erwies sich der Zusammenhang zwischen Zellzahl und der Anzahl der *spa*-Gen-Repeats als statistisch signifikant.

Das Auftreten des *sbi*-Gens innerhalb der Gruppe der „sporadischen“ *S. aureus*-Kulturen erwies sich als hochsignifikant. Weitere Signifikanzen ergaben sich bei den „sporadische“ *S. aureus* gegenüber der Summe der Enterotoxin-, der Anheftungsfaktorgene und der Anzahl der *spa*-Repeats. Die Summe aller Virulenzfaktoren erwies sich ebenfalls als statistisch hochsignifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das *egc*-Gencluster und die Anzahl der *spa*-Gen-Repeats in der Pathogenese der durch *S. aureus* hervorgerufenen Mastitis offensichtlich eine Rolle spielen. Dabei scheint allgemein den phänotypisch  $\beta$ -hämolysierenden Stämmen eine größere Bedeutung zuzukommen, da die betreffenden Feldstämme ein statistisch signifikant höheres Virulenzpotential aufwiesen. Auch die Anzahl an *spa*-Gen-Repeats könnte als genetischer Marker eingesetzt werden, da diese mit dem Auftreten verschiedener Virulenzgene positiv assoziiert sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Verfahren könnten die Auswahl des für das Eutergesundheitsproblem des Betriebes entscheidenden *S. aureus*-Stammes erleichtern und die Herstellung einer stallspezifischen Vakzine unterstützen.

## 7 SUMMARY

In the present study 325 presumptively identified *S. aureus*-strains from routine diagnostic of bovine quarter-milk samples of LHL, Giessen were used. The isolates were obtained from farms all over Hesse, Germany, with partly severe mastitic problems.

310 strains were phenotypically hemolytic, 15 were non-hemolytic.

Using different methods of genotyping (PFGE analysis, *coa/spa*-gene polymorphism) among the hemolytic strains 61 genetically different *S. aureus* isolates were selected for further investigations. Additionally, the 15 non-hemolytic *S. aureus*-strains were used.

If genotypically identical *S. aureus* field-strains were found several times in different cows of one farm ( $\geq 6$  cultures) these isolates were classified as “epidemic”. Single genotypes were called “sporadic”.

The species identity of the 76 field-strains was confirmed by cultural, biochemical and molecular methods. The 76 strains were additionally investigated for the presence of genes encoding potential virulence factors such as bindingproteins, microcapsule, hemolysins, and other toxins.

To evaluate the potential of causing sickness the properties of each of the selected *S. aureus* field-isolates was related to the number of somatic cells of the original quarter-milk-sample as well as to the average cell count of all investigated quarter-milk-samples of the same farm with genotypically identical *S. aureus* isolates.

In an additionally performed explorative-statistical evaluation significant correlations were found between epidemiological behaviour and the *egc*-gencluster (this is the gencluster with the combined enterotoxin genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* and *seo*). Furthermore there was a statistically significant correlation between the phenotypic property  $\beta$ -hemolysis and the *egc*-gencluster. The number of repeats of the genetic marker “*coa*”- and “*spa*”-gene was statistically significant correlated with the *egc*-gencluster. In addition there was a significant correlation between cell count of the original quarter-milk sample and the *egc*-gencluster. Additionally the number of *spa*-repeats was statistically significant and the presence of *sbi*-gene was highly significant in the group of sporadic *S. aureus*. Further significant correlations were found in the total of the genes encoding enterotoxins, bindingproteins and the

number of *spa*-repeats. The total of all virulence factors was statistically highly significant.

In summary it can be concluded that the presence of the *egc*-gencluster and the number of *spa*-gene-repeats has obviously an importance in the pathogenesis of mastitis caused by *S. aureus*. It appears that the presence of phenotypically  $\beta$ -hemolytic strains seems to be more important, as these field-strains had a significant higher virulence potential. The *spa*-gene-repeats can also be used as genetic markers as their number was positively associated with different virulence genes.

The results of the present study can help to select a *S. aureus* strain mainly involved in mastitic problems of a single farm. This strain could subsequently be used for production of a farm specific vaccine.

**8 LITERATURVERZEICHNIS**

AARESTRUP, F. M., H. D. LARSEN, N. H. ERIKSEN, C. S. ELSBERG und N. E. JENSEN (1999)

Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression

APMIS **107**, 425-430.

AARESTRUP, F. M., H. C. WEGENER und V. T. ROSDAHL (1995)

Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark

Vet. Microbiol. **45**, 139-150.

ABE, J. Y. ITO., M. ONIMARU, T. KOHSAKA und T. TAKEDA (2000)

Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*

Microbiol. Immun. **44**, 79-88.

AHLNER, S. (2004)

Prevalence of sub-clinical mastitis in Uruguay

Vet. Med. Diss. Faculty of Veterinary Medicine-SLU.

AKINEDEN, Ö. (2006)

Phäno- und genotypische Charakterisierung von *Staphylococcus aureus* aus Ziegenkäse unter besonderer Berücksichtigung des Enterotoxinbildungsvermögens

Vet. Med. Diss, Justus-Liebig-Universität Gießen.

AKINEDEN, Ö., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN, C. LÄMMLER, W. WOLTER und M. ZSCHÖCK (2001)

Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis

Clin. Diag. Lab. Immun. **8**, 959-964.

ALMEIDA, R. A., K. R. MATTHEWS, E. CIFRIAN, A. J. GUIDRY und S. P. OLIVER (1996)

*Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells  
J. Dairy. Sci. **79**, 1021-1026.

ALMEIDA, R. A., K. R. MATTHEWS und S. P. OLIVER (1997)

Eukaryotic and prokaryotic cell functions required for invasion of *S. aureus* into bovine mammary epithelial cells  
J. Vet. Med. B. **44**, 139-145.

AL-SHANGITI, A. M., C. E. NAYLOR, S. P. NAIR, D. C. BRIGGS, B. HENDERSON und B. M. CHAIN (2004)

Structural relationships and cellular tropism of staphylococcal superantigen-like proteins  
Infect. Immun. **72**, 4261-4270.

AL-SHANGITI, A. M., S. P. NAIR und B. M. CHAIN (2005)

The interaction between staphylococcal superantigen-like proteins and human dendritic cells  
Clin. Exp. Immun. **140**, 461-469.

ANDERSON, J. C. (1976)

Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis  
Br. Vet. J. **132**, 229-245.

ANDERSON, J. C. (1982)

Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunization and therapy  
Vet. Rec. **110**, 372-376.

ANDERSON, K. L., R. L. LYMAN, S. M. BODEIS-JONES und D. G. WHITE (2006)

Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples  
Am. J. Vet. Res. **67**, 1185-1191.

- ANDO, E., K. MONDEN, R. MITSUHATA, R. KARIYAMA und H. KUMON (2004)  
Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection  
Acta. Med. Okayama. **58**, 207-214.
- ANNEMÜLLER, C., C. LÄMMLER und M. ZSCHÖCK (1999)  
Genotyping of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis  
Vet. Microbiol. **69**, 217-244.
- BABA, T., F. TAKEUCHI, M. KURODA, H. YUZAWA, K. AOKI, A. OGUCHI, Y. NAGAI, N. IWAMA, K. ASANO, T. NAIMI, H. KURODA, L. CUI, K. YAMAMOTO und K. HIRAMATSU (2002)  
Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA  
Lancet **359**, 1819-1827.
- BAIRD-PARKER, A. C. (1962)  
An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci  
J. Appl. Bacteriol. **25**, 12-19.
- BALABAN, N. und A. RASOOLY (2000)  
Staphylococcal enterotoxins  
Int. J. Food. Microbiol. **61**, 1-10.
- BARON, F., M. COCHET, J. L. PELLERINI, N. B. ZAKOUR, A. LEBON, A. NAVARRO, I. PROUDY, Y. L. LOIR und M. GAUTIER (2004)  
Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*  
J. Food. Prot. **67**, 2302-2305.
- BAUTISTA, L., P. GAYA, M. MEDIAN und M. NUNEZ (1988)  
A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci  
Appl. Environ. Microbiol. **54** (2), 566-569.

BECKER, K., R. ROTH und G. PETERS (1998)

Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene

J. Clin. Microbiol. **36**, 2548-2553

BENNEDSGAARD, T. W., S. M. THAMSBORG, F. M. AERESTRUP, C. ENEVOLDSEN, M. VAARST und A. B. CHRISTOFFERSEN (2006)

Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark

Bio. Med. Central. **48**/1/24.

BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA und R. M. AVENA (1965)

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C

J. Bacteriol. **90**, 1481-1485.

BESTEBROER, J., M. J. POPPELIER, L. H. ULFMAN, P. J. LENTING, C. V. DENIS, K. P. VAN KESSEL, J. A. VAN STRIJP und C. J. DE HAAS (2007)

Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling

Blood. **109** (7), 2936-2943.

BHAKDI, S. und J. TRANUM-JENSEN (1991)

Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*

Microbiol. Rev. **55**, 733-751.

BISPING, W. und G. AMTSBERG (1988)

Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere

1. Auflage, Paul Parey Verlage Berlin und Hamburg.

BJERKETORP, J. (2004)

Novel adhesive proteins of pathogenic staphylococci and their interaction with host protein

Vet. Med. Diss, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.

BLACKSTOCK, R., R. M. HYDE und F. C. KELLY (1968)

Inhibition of fibrinogen reaction by polysaccharide of encapsulated *Staphylococcus aureus*

J. Bacteriol. **96**, 766-803.

BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1994)

Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine

Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band II/1, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

BOCKLISCH, H. und H. WORBES (1993)

Bacteriological investigations of the ovine mastitis

Poster im Rahmen der: Third International Sheep Veterinary Conference "Science Serving Sheep", Edinburgh.

BOERLIN, P. und J. NICOLET (2002)

Grampositive Kokken

Kompendium der Veterinärmedizinischen Bakteriologie 2002, 9. Kapitel. Institut der Veterinär-Bakteriologie, Universität Bern.

BOOTH, M. C., L. M. PENCE, P. MAHASRESHTI, M. C. CALLEGAN und M. S. GILMORE (2001)

Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection

Infect. Immun. **69**, 345-352.

BRAKSTAD, O. D., K. AASBAKK und J. A. MAEELAND (1992)

Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene

J. Clin. Microbiol. **30**, 1654-1660.

BRAKSTAD, O. G. und J. A. MAELAND (1997)

Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci

Acta Pathol. Microbiol. Immun. Scand. **105**, 264-276.

- BRANDER, G. C., D. M. PUGH, R. J. BYWATER und W. L. JENKINS (1991)  
Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics, 5. Auflage. Hrsg: Saunders, W. B., Bailliere, Tindall, London.
- BRÜCKLER, J., H. KLIMA, W. SCHAEGL, D. MANZ und H. BLOBEL (1981)  
*Staphylococcus aureus* von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen  
Zbl. Vet. Med. B **28**, 494-499.
- BRÜCKLER, J., S. SCHWARZ und F. UNTERMANN (1994)  
Staphylokokken – Infektionen und – Enterotoxine, Band. II/1  
In: BLOBEL, H und TH. SCHLIESSER, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- BUSSCHE, van den. R. A., J. D. LYON und G. A. BOHACH (1993)  
Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family  
Mol. Phylogenet. Evol. **2**, 281-292.
- CABRAL, K. (2003)  
Phäno- und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von Rindermastitiden aus dem Bundesstaat Sao Paulo, Brasilien  
Vet. Med. Diss, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- CADNESS-GRAVES, B., R. WILLIAMS, G. HARPER und A. A. MILES (1943)  
Slide-test for coagulase-positive staphylococci  
Lancet **1**, 736-738.
- CARDOSO, H. F. T., N. SILVA, M. J. SENA und L. S. CARMO (1999)  
Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil  
Lett. Appl. Microbiol. **29**, 347-349.
- CASMAN, E. P. (1965)  
Staphylococcal enterotoxin  
Ann. N. Y. Acad. Sci. **128**, 124-131.

CIFRIAN, E., A. J. GUIDRY, A. J. BRAMLEY, N. L. NORCROSS, F. D. BASTIDA-CORCUERA und W. W. MARQUARDT (1996)

Effect of staphylococcal  $\beta$  toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells

Vet. Microbiol. **48**, 187-198.

CLYNE, M., T. H. BIRKBECK und J. P. ARBUTHNOTT (1992)

Characterization of staphylococcal  $\gamma$ -lysin

J. Gen. Microbiol. **138**, 923-930.

COENEN, C. (2000)

Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung

Vet. Med. Diss, Freie-Universität Berlin.

COUCH, J., M. T. SOLTIS und M. J. BETLEY (1988)

Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene

J. Bact. **170**, 2954-2960.

DAJANI, A. S. (1972)

The scaled-skin syndrome: relation to phage group II staphylococci

J. Infect. Dis. **125**, 548-551.

DALLA POZZA, M. C., A. RICCI und G. VICENZONI (1999)

Protein A gene polymorphism analysis in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis

J. Dairy. Res. **66**, 449-453.

DEGENER, J. E., M. E. O. C. HECK, W. J. VAN LEEUWEN, C. HEEMSKERK, A. CRIELAARD, P. JOOSTEN und P. CAESAR (1994)

Nosocomial infection by *Staphylococcus haemolyticus* and typing methods for epidemiological study

J. Clin. Microbiol. **32**, 2260-2265.

DEGO, O. K., J. E. VAN DIJK und H. NEDERBRAGT (2002)

Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion  
Vet. Quart. **24** (4), 181-198.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (2000)

Entnahme von Milchproben unter aseptischen Bedingungen  
Sachverständigenausschuss "Subklinische Mastitis" des Arbeitskreises  
Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebiets  
Lebensmittelhygiene, DVG Gießen.

DEVRIESE, L. A. (1984)

A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species  
J. Appl. Bacteriol. **56**, 215-220.

DEVRIESE, L. A. und V. HAJEK (1980)

A review: Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals  
J. Appl. Bacteriol. **49**, 1-11.

DINGES, M. M., P. M. ORWIN und P. M. SCHLIEVERT (2000)

Exotoxins of *Staphylococcus aureus*  
Clin. Microbiol. Rev. **13**, 16-34.

DINGWELL, R. T., K. E. LESLIE, Y. H. SCHUKKEN, J. M. SARGEANT und L. L. TIMMS (2003)

Evaluation of the california mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows  
Can. Vet. J. **44**, 413-416.

DIXON, W. J. (chief editor) (1993)

BMDP Statistical Software Manual  
Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

DOMANSKI, P. J., P. R. PATEL, A. S. BAYER, L. ZHANG, A. E. HALL, P. J. SYRIBEYS, E. L. GOROVITS, D. BRYANT, J. H. VERNACHIO, J. T. HUTCHINS und J. M. PATTI (2005)

Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by *Staphylococcus aureus*  
Infect. Immun. **73**, 5229-5232.

DUTHIE, E. S. (1954)

Evidence of *Staphylococcus aureus*  
Clin. Microbiol. **10**, 427-436.

DZIEWANOWSKA, K., J. M. PATTI, C. F. DEOBALD, K. W. BAYLES, W. R. TRUMBLE und G. A. BOHACH (1999)

Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells  
Infect. Immun. **67**, 4673-4678.

EBLING, T. L., L. K. FOX, K. W. BAYLES, G. A. BOHACH, K. M. BYRNE, W. C. DAVIS, W. A. FERENS und J. K. HILLERS (2001)

Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene for staphylococcal enterotoxin C1  
J. Dairy. Sci. **84**, 2044-2050.

EDWARDS, V. M., J. R. DERINGER, S. D. CALLANTINE, C. F. DEOBALD, P. H. BERGER, V. KAPUR, C. V. STAUFFACHER und G. A. BOHACH (1997)

Characterization of the canine type C enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates  
Infect. Immun. **65**, 2346-2352.

EL-SAYED, A., J. ALBER, C. LÄMMLER, S. JÄGER, M. ZSCHÖCK, W. WOLTER und V. H. CASTANEDA (2006)

Comparative studies on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitic cows in Mexico  
Vet. Méx, **37** (2), 165-177.

ELEK, S. D. und E. LEVY (1950)

Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci

J. Pathol. Bacteriol. **62**, 541-554.

ERSKINE, R. J., R. D. WALKER und C. A. BOLIN (2002)

Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period

J. Dairy. Sci. **85**, 1111-1118.

FATTOM, A., R. SCHNEERSON, D. C. WATSON, W. W. KARAKAWA, D. FITZGERALD, I. PASTAN, X. LI, J. SHILOACH, D. A. BRYLA und J. B. ROBBINS (1993)

Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A

Infect. Immun. **61**, 1023-1032.

FERENS, W. A., W. C. DAVIS, M. J. HAMILTON, Y. H. PARK, C. F. DEOBALD, L. FOX und G. BOHACH (1998)

Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C

Infect. Immun. **66**, 573-580.

FITZGERALD, J. R., S. D. REID, E. RUOTSALAINEN, T. J. TRIPP, M. Y. LIU, R. COLE, P. KUUSELA, P. M. SCHLIEVERT, A. JÄRVINEN und J. M. MUSSER (2003)

Genome diversification in *Staphylococcus aureus* molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin- like family of proteins

Infect. Immun. **71**, 2827-2838

FITZGERALD, J. R., S. R. MONDAY, T. J. FOSTER, G. A. BOHACH, P. J. HARTIGAN, W. J. MEANEY und C. J. SMYTH (2001)

Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens

J. Bacteriol. **183**, 63-70.

FORSGREN, A. (1970)

Significance of protein A production by staphylococci

Infect. Immun. **2**, 672-673.

FRÉNAY, H. M. E., A. E. BUNSCHOTEN, L. M. SCHOOLS, W. J. V. LEEUWEN, C. M. J. E. V. GRAULS, J. VERHOEF und F. R. MOOI (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.

FRÉNAY, H. M. E., J. P. G. THEELEN, L. M. SCHOOLS, C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS, J. VERHOEF, W. J. VAN LEEUWEN und F. R. MOOL (1994)

Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism

J. Clin. Microbiol. **32**, 846-847.

FRITSCHKE, D. (1970)

Untersuchungen zur Funktion des  $\beta$ -Hämolysins von *S. aureus*

Zbl. Bakt. Hyg. I, Orig. **213**, 348-355.

FROST, A. J., D. D. WANASINGHE und J. B. WOOLCOCK (1977)

Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland

Infect. Immun. **15**, 245-253.

FUEYO, J. M., M. C. MENDOZA, M. R. RADICIO, J. MUNIZ, M. A. ALVAREZ und M. C. MARTIN (2005)

Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with macrorestriction genomic profiles

J. Clin. Microbiol. **43**, 1278-1284.

GILLASPY, A., J. PATTI, F. PRATT, J. IANDOLO und M. SMELTZER (1997)

The *Staphylococcus aureus* collagen adhesion-encoding gene (*cna*) is within a discrete genetic element

Gene. **196**, 239-248.

GOH, S. H., S. K. BYRNE, J. L. ZHANG und A. W. CHOW (1992)

Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphism

J. Clin. Microbiol. **30**, 1642-1645.

GOMEZ, M. I., A. LEE, B. REDDY, A. MUIR, G. SOONG, A. PITT, A. CHEUNG und A. PRINCE (2004)

*Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1

Nat. Med. **10**, 842-848.

GOULOUMES, C., M. BES, F. RENAUD, B. LINA, M. E. REVERDY, Y. BRUN und J. FLEURETTE (1996)

Phenotypic and genotypic (Pulsed-field gel electrophoresis) characteristic of enterotoxin -A- producing *Staphylococcus aureus* strains

Res. Microbiol. **147**, 263-271.

GRÄFE, U. (1992)

Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Hrsg. Gräfe, U. Spektrum, Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, New-York.

GRAVET, A., M. RONDEAU, C. HARF-MONTEIL, F. GRUNENBERGGER, H. MONTEIL, J. M. SCHEFTEL und G. PREVOST (1999)

Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LUKE-LUKD

J. Clin. Microbiol. **37**, 4012-4019.

GRAVET, A., P. COUPPIE, O. MEUNIER, E. CLYTI, B. MOREAU, R. PRADINAUD, H. MONTEIL und G. PREVOST (2001)

*Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LUKE-LUKD in 78% of 131 retrospective and prospective cases

J. Clin. Microbiol. **39**, 4349-4356.

GREENE, C., D. MCDEVITT, P. FRANCOIS, P. VAUDAUX, D. LEW und T. FOSTER (1995)

Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes

Mol. Microbiol. **17**, 1143-1152.

GRIETHUYSEN, van, A., M. BES, J. ETIENNE, R. ZBINDEN und J. KLUYTMANS (2001)

International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*

J. Clin. Microbiol. **39**, 86-89.

GUÉRIN-FAUBLEE, V., G. CARRET und P. HOUFFSCHMITT (2003)

*In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis

Vet. Rec. **152**, 466-471.

GUSS, B., M. UHLEN, B. NILSSON, M. LINDBERG, J. SJÖQUIST und J. SJÖDAHL (1984)

Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A

Eur. J. Biochem. **138**, 413-420.

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1969)

A study of staphylococci isolated from the upper respiratory tract of different animal species

Zbl. Bacteriol. [Orig]. **212**, 60-73.

HAN, H. R., S-II. PAK, S. W. KANG, W. S. JONG und C. J. YOUN (2000)

Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. I. capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains

J. Vet. Sci. **1** (1), 53-60

HARTLEIB, J., N. KOHLER, R. B. DICKINSON, G. S. CHHATWAL, J. J. SIXMA, O. M. HARTFORD, T. J. FOSTER, G. PETERS, B. E. KEHREL und M. HERRMANN (2000)  
Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*  
Blood. **96**, 2149-2156.

HASSAN, A. A. (2002)

Nachweis und weitergehende Analyse von speziesspezifischen Genabschnitten zur molekularen Charakterisierung einiger Mastitiserreger vom Rind  
Vet. Med. Diss, Justus-Liebig-Universität Gießen.

HATA, E., K. KATSUDA, H. KOBAYASHI, T. OGAWA, T. ENDO und M. EGUCHI (2006)

Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Hokkaido, Japan  
J. Vet. Med. Sci. **68** (2), 165-170.

HAWRYLUK, T. und I. HIRSHFIELD (2002)

A superantigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A  
J. Food. Prot. **65**, 1183-1187.

HERBERT, G. A. und G. A. HANCOCK (1985)

Synergistic hemolysis by species of staphylococci  
J. Clin. Microbiol. **28**, 2425-2431.

HOLECKOVA, B., E. HOLODA, M. FOTTA, V. KALINACOVA, J. GONDOL und J. GROLMUS (2002)

Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food  
Ann. Agric. Environ. Med. **9**, 179-182.

HOOKEY, J. V., J. F. RICHARDSON und B. D. COOKSON (1998)

Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene  
J. Clin. Microbiol. **36**, 1083-1089.

HUMMEL, R., L. A. DEVRIESE und G. LEHMANN (1992)

Characteristics of bovine *Staphylococcus* with special regard to clumping factor activity

Zbl. Bacteriol. **276**, 487-492.

JARRAUD, S., GREGOIRECOZON, F. VANDENESCH, M. BES, J. ETIENNE und G. LINA (1999)

Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and Staphylococcal scarlet fever

J. Clin. Microbiol. **37**, 2446-2449.

JARRAUD, S., M. A. PEYRAT, A. LIM, A. TRISTAN, M. BES, C. MOUGEL, J. ETIENNE, F. VANDENSCH, M. BONNEVILLE und G. LINA (2001)

*egc*, A Highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*

J. Immun. **166**, 669-677.

JARRAUD, S., C. MOUGEL, J. THIOULOUSE, G. LINA, H. MEUGNIER, F. FOREY, X. NESME, J. ETIENNE und F. VANDENESCH (2002)

Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease

Infect. Immun. **70**, 631-641.

JENSEN, K. (1958)

A normally occurring *Staphylococcus* antibody in human serum

Acta. Pathol. Microbiol. Scand. **44**, 421-428.

JOHNSON, W. M., S. D. TYLER, E. P. EWAN, F. E. ASHTON, D. R. POLLARD und K. R. ROZEE (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.

JONSSON, K., C. SIGNÄS, H. P. MÜLLER und M. LINDBERG (1991)

Two different genes encode fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene

Eur. J. Biochem. **202**, 1041-1048.

JONSSON, P. und T. WADSTRÖM (1993)

*Staphylococcus*

In: Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals, Iowa State University Press, Ames, USA, 21-35.

JONSSON, P., M. LINDBERG, I. HARALDSSON und T. WADSTRÖM (1985)

Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of  $\alpha$ -hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning

Infect. Immun. **49**, 765-769.

JOSEPH, M. P., F. TIMOTHY und H. MAGNUS (2004)

Staphylococcal immunotherapeutics via donor selection and donor stimulation  
Pharmaceutical Patents **6**, 692-739.

KAIDA, S., T. MIYATA, Y. YOSHITAWA, H. IGARASHI und S. IWANAGA (1989)

Nucleotide and deduced amino acid sequences of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213

Nucleic. Acids. Res. **17**, 8871.

KARAKAWA, W. W., A. SUTTON, R. SCHNEERSON, A. KARPAS und W. F. VANN (1988)

Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes

Infect. Immun. **56**, 1090-1095.

KARIN, J., A. ROSANDER, J. BJERKETORP und L. FRYKBERG (2003)

Shotgun phage display-selection for bacterial receptors or other exported proteins  
Biol. Proc. Online. **5**, 123-135.

KATRI, J. (2004)

Surface protein PIs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – role in adhesion, invasion and pathogenesis, and evolutionary aspects  
Academic. Diss in General Microbiology- Universität - Helsinki.

KATSUDA, K., E. HATA, H. KOBAYASHI, M. KOHMOTO, K. KAWASHIMA, H. TSUNEMITSU und M. EGUCHI (2005)

Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms

Vet. Microbiol. **105**, 301-305.

KENNY, K., F. D. BASTIDA und N. L. NORCROSS (1992)

Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*

Can. J. Vet. Res. **56**, 265-268.

KENNY, K., R. F. REISER, F. B. CORCUERA und N. L. NORCROSS (1993)

Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*

J. Clin. Microbiol. **31**, 706-707.

KLOOS, W. E. und D. W. LAMBE (1991)

*Staphylococcus*

In: Balows, A., W. J. Hausler jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg und H. J. Shadomy, Manual of Clinical Microbiology, 5<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., USA, 222-237.

KLOOS, W. E. und K. H. SCHLEIFER (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 und Wilkins Verlag, Baltimore, USA, pp. 1013-1035.

KLUYTMANS, J., H. BERG, P. STEEGH, F. VANENESCH, J. ETIENNE und A. VAN BELKUM (1998)

Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis

J. Clin. Microbiol. **36**, 2214-2219.

KOMINE, K. I., T. KUROISHI, Y. KOMINE, K. WATANABE, J. KOBAYASHI, T. YAMAGUCHI, S. I. KAMATA und K. KUMAGAI (2004)

Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells

Clin. Diag. Lab. Immun. **11**, 203-210.

KROKER, R. (1997)

In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 3. Auflage. Hrsg: Löscher, W., F. R. Ungemach und R. Kroker. Parey Verlag, Berlin.

KURODA, M., T. OHTA, I. UCHIYAMA, T. BABA, H. YUSAWA, I. KOBAYASHI, L. CUI, A. OGUCHI, K. I. AOKI, Y. NAGAI, J. KIAN, T. ITO, M. KANAMORI, H. MATSUMARU, A. MARUYAMA, H. MURAKAMI, A. HOSOYAMA, Y. MIZUTANIUI, N. K. TAKAHASHI, T. SAWANO, R. INOUE, C. KAITO, K. SEKIMIZU, H. HIRAKAWA, S. KUHARA, S. GOTO, J. YABUZAKI, M. KANEHISA, A. YAMASHITA, K. OSHIMA, K. FURUYA, C. YOSHINO, T. SHIBA, M. HATTORI, N. OGASAWARA, H. HAYASHI und K. HIRMATSU (2001)

Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
Lancet. **357**, 1225-1240.

KUROISHI, T., K. KOMINE, K. KAI, M. ITAGAKI, J. KOBAYASHI, M. OHTA, S. KAMATA und K. KUMAGAI (2003)

Bovine mastitis induced by the inoculation of staphylococcal enterotoxin-C into lactating mammary gland

J. Vet. Med. Sci. **65**, 899-906.

KUZMA., K., E. MALINOWSKI, H. LASSA und A. KLOSSOWSKA (2003)

Detection of genes for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis

Bull. Vet. Pulawy. **47**, 419-426.

LADHANI, S., C. L. JOANNOU, D. P. LOCHRIE, R. W. EVANS und M. POSTON (1999)

Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome

Clin. Microbiol. Rev. **12**, 224-242.

LAEVENS, H., L. A. DEVRIESE, H. DELUYKER, J. HOMMEZ und A. DE KRUIF (1996)

An atypical *Staphylococcus aureus* intramammary infection in a dairy herd  
Vet. Microbiol. **52**, 271-275.

LAI, E., B. W. BIRREN, S. M. CLARK, M. I. SIMON und L. HOOD (1989)

Pulsed Field Electrophoresis  
Biotechniques **7**, 34-42.

LÄMMLER, C., J. C. DE FREITAS, G. CHHATWAL und H. BLOBEL (1985)

Interactions of immunoglobulin G, fibrinogen and fibronectin with *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius*  
Zbl. Bakt. Hyg. A **260**, 232-237.

LÄMMLER, C., Ö. AKINEDEN, C. ANNEMÜLLER, W. WOLTER und M. ZSCHÖCK (2000)

Molecular analysis of virulence factor of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis  
International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland, Stresa, 11-14 June, Italy. Proceedings. Intern. Dairy Federation, 326-330.

LARSEN, H. D., F. M. AARESTRUP und N. D. JENSEN (2002)

Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and  $\beta$ -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA  
Vet. Microbiol. **85**, 61-67.

LEE, J. H. (2003)

Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans  
Appl. Envir. Microbiol. **69**, 6489-6494.

LEE, P. K., B. N. KREISWIRTH, J. R. DERINGER, S. J. PROJAN, W. EISNER, B. L. SMITH, E. CARLSON, R. P. NOVICK und P. M. SCHLIEVERT (1992)

Nucleotid sequence and biological properties of toxic shock syndrome toxin 1 from ovine- and bovine-associated *Staphylococcus aureus*  
J. Infect. Dis. **165**, 1056-1063.

LETERTRE, C., S. PERELLE, F. DILASSER und P. FACH (2003)

Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*

J. Appl. Microbiol. **95**, 38-43.

LINA, G., G. A. BOHACH, S. P. NAIR, K. HIRAMATSU, E. JOUVIN-MARCHE und R. MARIUZZA (2004)

Standard nomenclature for the superantigenes expressed by staphylococcal

J. Infect. Dis. **189**, 2334-2336.

LINA, G., Y. PIEMONT, F. G. GAMOT, M. BES, M. O. PETER, V. GAUDUCHON, F. VANDENESCH und J. ETIENNE (1999)

Involvement of panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia

Clin. Infect. Dis. **29**, 1128-1132.

LINDSAY, J. A., A. RUZIN, H. F. ROSS, N. KUREPINA und R. P. NOVICK (1998)

The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*

Mol. Microbiol. **29**, 527-543.

LOIR, Y. L., F. BARON und M. GAUTIER (2003)

*Staphylococcus aureus* and food poisoning

Mol. Res. **2** (1), 63-76.

MARADONA, L. (1998)

Detection of staphylococcal enterotoxin in foods

MS Thesis. Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA

MARR, J. C., J. D. LYON, J. R. ROBERSON, M. LUPHER, W. C. DAVIS und G. A. BOHACH (1993)

Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications

Infect. Immun. **61**, 4254-4262.

MARTINEAU, F., F. J. PICARD, L. GRENIER, P. H. ROY, M. OUELLETTE, E. TRIAL und M. G. BERGERON (2000)

Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery

J. Antimicrob. Chem. **46**, 527-533.

MATSUNAGA, T., S. I. KAMATA, N. KAKIICHI und K. UCHIDA (1993)

Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis

J. Vet. Med. Sci. **55**, 297-300.

MEHROTRA, M., G. WANG und W. M. JOHNSON (2000)

Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance

J. Clin. Microbiol. **38**, 1032-1035

MENZIES, B. E., Y. KOURTEVA, A. B. KAISER und D. S. KERNODLE (2002)

Inhibition of staphylococcal wound infection and potentiation of antibiotic prophylaxis by a recombinant fragment of the fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*

J. Infect. Dis. **185**, 937-943.

MIEDZOBRODZKI, J., A. S. NAIDU, J. L. WATTS, P. CIBOROWSKI, K. PALM und T. WADSTRÖM (1989)

Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis

J. Clin. Microbiol. **27**, 540-544

MIELKE, H. und G. MICHEL (1994)

Schutz und Abwehrmechanismen (Immunologie) des Rindereuters

In: Wendt, K., H. Bostedt, H. Mielke und H.-W. Fuchs (Hrsg): Euter- und Gesäugekrankheiten, G. Fischer Verl. Jena, Stuttgart, 94-105.

MINHAS, T., H. A. LUDLAM, M. WILKS und S. TABAQCHALI (1995)

Detection by PCR and analysis of the distribution of a fibronectin-binding protein gene (*fnb*) among staphylococcal isolates

J. Med. Microbiol. **42**, 96-101.

MONDAY, S. R. und G. A. BOHACH (1999b)

Properties of *S. aureus* enterotoxins and toxic shock syndrom toxin-1. In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins  
Hrsg. J. F. Alouf und J. H. Free, Academic press, London.

MONDAY, S. R. und G. A. BOHACH (1999a)

Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates  
J. Clin. Microbiol. **37**, 3411-3414.

MOON, J. S., A. R. LEE, H. M. KANG, E. S. LEE, M. N. KIM, Y. H. PAIK, Y. H. PARK, Y. S. JOO und H. C. KOO (2007a)

Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea  
J. Dairy. Sci. **90**, 1176-1185.

MOON, J. S., A. R. LEE, H. M. KANG, E. S. LEE, Y. S. JOO, Y. H. PARK, M. N. KIM und H. C. KOO (2007)

Antibiogram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis  
J. Dairy. Sci. **90**, 1716-1724.

MOORE, P. C. L. und J. A. LINDSAY (2001)

Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence of horizontal transfer of virulence genes  
J. Clin. Microbiol. **39**, 2760-2767.

MOREILLON, P., J. M. ENTENZA, P. FRANCIOLI, D. MCDEVITT, T. J. FOSTER, P. FRANCOIS und P. VAUDAUX (1995)

Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis  
Infect. Immun. **63**, 4738-4743.

MÜLLER, H. P., M. O. LITKE und H. BLOBEL (1983)

Protein A- Aktivität von Staphylokokken unterschiedlicher tierartlicher Herkunft mit Immunglobulin G von Haus- und Versuchstieren, sowie vom Menschen  
Zbl. Vet. Med. **30**, 305-312.

MÜLLER, M. (1996)

Untersuchungen zum Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in Rohmilch und Weichkäse und zur Bildung von Staphylokokken-Enterotoxinen mit immunchemischen und molekularbiologischen Methoden

Vet. Med. Diss, Freie-Universität Berlin.

MUSSER, J. M., P. M. SCHLIEVER, A. W. CHOW, P. EWAN, B. N. KREISWIRTH und V. T. ROSDAHER (1990)

A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome

Med. Sci. USA. **87**, 225-229.

NADA, T., S. ICHIYAMA, Y. OSADA, M. OTHA, K. SHIMOKATA, N. KATO und N. NAKASHIMA (1996)

Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates

J. Hosp. Infect. **32**, 305-317.

NAIDU, A. S., M. PAULSSON und T. WADSTRÖM (1988)

Particle agglutination assays for rapid detection of fibronectin fibrinogen and collagen receptors on *Staphylococcus aureus*

J. Clin. Microbiol. **26**, 1549-1554.

NAIDU, T. G und F. H. NEWBOULD (1975)

Significance of beta hemolytic *Staphylococcus aureus* as a pathogen to the bovine mammary gland

Zbl. Vet. Med. B **22**, 305-317.

NAJERA-SANCHEZ, G., R. MALDONADO-ROBRIGUEZ, P. R. OLIVERA und L. M. DE LA GARZA (2003)

Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods

J. Food. Prot. **66**, 1055-1062.

- NEILL, R. J., G. R. FANNING, F. DELAHOZ, R. WOLFF und P. GEMSKI (1990)  
Oligonucleotide probes for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* strains containing genes for enterotoxins A, B, C and toxic shock syndrome toxin 1  
J. Clin. Microbiol. **28**, 1514-1518.
- NGUYEN, T., B. GHEBREHIWET und E. I. PEERSCHKE (2000)  
*Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets  
Infect. Immun. **68**, 2061-2068.
- NILSSON, I. M., O. H. HARTFORD, T. FOSTER und A. TARKOWSKI (1999)  
Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis  
Infect. Immun. **67**, 1045-1049.
- NISKANEN und AALTO (1978)  
Internationaler Milchwirtschaftsverband: Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken in Milchpulver (Referenzmethode)  
Internationaler Standard 60 A
- NOTERMANS, S., W. J. V. LEEUWEN, J. DUFRENNE und P. D. TIPS (1983)  
Serum antibodies to enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* with special reference to enterotoxin F and toxic shock syndrome  
J. Clin. Microbiol. **18**, 1055-1060.
- OLIVER, S. P. und B. A. MITCHELL (1983)  
Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period  
J. Dairy. Sci. **66**, 1162-1166.
- OMOE, K., D. HU, A. NAKANE und K. SHINAGAWA (2003)  
Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids  
Immun. **71**, 6088-6094.

OMOE, K., M. ISHIKAWA, Y. SHIMODA, D. HU, S. UEDA und K. SHINAGAWA (2002)

Detection of *seg*, *seh*, and *sei* gene in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring *seg*, *seh*, or *sei* genes

J. Clin. Microbiol. **40**, 857-862.

ORDEN, J. A., J. GOYACHE, J. HERNANDEZ, A. DOMENECH, G. SUAREZ und E. GOMEZ-LUCIA (1992)

Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis: comparison of ELISA and immunoblot

J. Appl. Bacteriol. **72**, 486-489.

ORWIN, P. M., D. Y. M. LEUNG, H. L. DONAHUE, R. P. NOVICK und P. M. SCHLIEVERT (2001)

Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K

Infect. Immun. **69**, 360-366.

ORWIN, P. M., J. R. FITZGERALD, D. Y. M. LEUNG, J. A. GUTIERREZ, G. A. BOHACH und P. M. SCHLIEVERT (2003)

Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L

Infect. Immun. **71**, 2916-2919.

ØSTERAS, O., L. SØLVERØD und O. REKSEN (2006)

Milk culture results in a large norwegian survey-effects of season parity days in milk resistance and clustering

J. Dairy. Sci. **89**, 1010-1023.

PARK, P. W., J. ROSENBLOOM, W. R. ALBRAMS, J. ROSENBLOOM und R. P. MECHAM (1996)

Molecular cloning and expression of the gene for elastin- binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*

J. Biol. Chem. **271**, 15803-15809.

PARKS, W. C. (1997)

Posttranscriptional regulation of lung elastin production

Am. J. Respir. Cell Mol. Biolo. **17**, 1-2.

PATTI, J. M., H. JONSSON, B. GUSS, L. M. SWITALSKI, K. WIBERG, M. LINDBERG und M. HÖÖK (1992)

Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesion

J. Biol. Chem. **267**, 4766-4772.

PEACOCK, S. J., C. E. MOORE, A. JUSTICE, M. KANTZANOU, L. STORY, K. MACKIE, G. O'NEILL und N. P. J. DAY (2002)

Virulent combination of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*

Infect. Immun. **70**, 4987-4996.

PEACOCK, S. J., T. J. FOSTER, B. J. CAMERON und A. R. BERENDT (1999)

Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *S. aureus* to resting human endothelial cells

Microbiology. **145**, 3477-3486.

PEERSCHKE, E. I., A. S. BAYER, B. GHEBREHIWET und Y. Q. XIONG (2006)

gC1qR/p33 blockade reduces *Staphylococcus aureus* colonization of target tissues in an animal model of infective endocarditis

Infect. Immun. **74**, 4418-4423

PIEMONT, Y. (1999)

Staphylococcal epidermolytic toxins: structure, biological and pathophysiological properties

In: The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Hrsg. J. E. Alouf und J. H. Freer, Academic Press, London.

PINHO, M., H. DE LENCASTRE und A. TOMASZ (2001)

An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**, 10886-10891.

POOLMAN, J. T. (1990)

Polysaccharides and membrane vaccines

In: Miziahi, A, Advances in the Biological process, **13**, bacterial Vaccines, wiley-liss, New york, USA, 57-86.

POUTREL, B. und L. SUTRA (1993)

Type 5 and 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits, poultry, pigs, and horses

J. Clin. Microbiol. **31**, 467-469.

POUTREL, B. und M. DUCELLIEZ (1979)

Evaluation of three rapid tests for identification of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine milk

Ann. Rech. Vet. **10**, 125-129.

PROJAN, S. J., J. KORNBLUM, B. KREISWIRTH, SORAYAL, L. MOGHAZEH, W. EISNER und R. P. NOVICK (1989)

Nucleotide sequence: the  $\beta$ -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*

EMBL. Accession. **8**, 3305.

PYÖRÄLÄ, S. H. K. und E. O. PYÖRÄLÄ (1998)

Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995)

J. Am. Vet. Med. Assoc. **212** (3), 407-412.

RABELLO, R. F., C. SOUZA, R und S. DUARTE (2005)

Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil

J. Dairy. Sci. **88**, 3211-3219.

REINOSO, E. B., A. EL-SAYED, C. LÄMMLER, C. BOGNI und M. ZSCHÖCK (2007)

Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina

Microbiol. Res. In press.

REN, K., J. D. BANNAN, V. PANCHOLI, A. L. CHEUNG, J. C. ROBBINS, V. A. FISCHETTI und J. B. ZABRISKIE (1994)

Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin

J. Exp. Med. **180**, 1675-1683.

RIORDAN, K. O. und J. C. LEE (2004)

*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides

Clin. Microbiol. Rev. **17**, 218-234.

ROBERSON, J. R., L. FOX, D. HANCOCK, J. GAY und T. BESSER (1998)

Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition

J. Dairy. Sci. 81, 687-693.

RÖDER, R. (1985)

Beziehung zwischen Zellgehalt und bakteriologischem Befund von Viertelgemelksproben beim Deutschen Fleckvieh

Vet. Med. Diss. München.

ROESCH, M., V. PERRETTEN, M. G. DOHERR, W. SCHÄEREN, M. SCHÄLLIBAUM und J. W. BLUM (2006)

Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms

J. Dairy. Sci. **89**, 989-997.

ROLLE, M. und A. MAYR (2002)

In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

6. Auflage, Enke Verlag Stuttgart.

RÖMLING, U., R. FISLAGE und B. TÜMMLER (1995)

Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern

Immunol. Infekt. **23**, 4-8.

RUSNAK, J. M., M. KORTEPETER, R. ULRICH, M. POLI und E. BOUDREAU (2004)

Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B

Emer. Infect. Dis. **9**, 1544-1549.

RYDING, U., J. I. FLOCK, M. FLOCK, B. SÖDERQUIST und B. CHRISTENSSON (1997)

Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

J. Infect. Dis. **176**, 1096-1099.

SALASIA, S. I. O., Z. KHUSNAN, C. LÄMMLER und M. ZSCHÖCK (2004)

Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hessen in Germany

J. Vet. Sci. **5** (2), 103-109.

SANDBERG, L. B., N. T. SOSKEI und J. G. LESLIE (1981)

Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states

N. Engl. J. Med. **304**, 566-579.

SATO, H., Y. MATSUMORI, T. TANABE, H. SAITO, A. SHIMIZU und J. KAWANO (1994)

A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon

Infect. Immun. **62**, 3780-3785.

SAU, S., N. BHASIN, E. R. WANN, J. C. LEE, T. J. FOSTER und C. Y. LEE (1997)

The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes

Microbiol. **143**, 2395-2405.

SCHAD, E. M., A. C. PAPAGEORGIOU, L. A. SVENSSON und K. R. ACHARYA (1997)

A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxin A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity

J. Mol. Biol. **269**, 270-280

SCHLICHTING, C., C. BRANGER, J. M. FOURNIER, W. WITTE, A. BOUTONNIER, C. WOLZ, P. GOULLET und G. DÖRING (1993)

Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships

J. Clin. Microbiol. **31**, 227-232.

SCHMITZ, F. J., K. E. VELDKAMP, K. P. VAN KESSEL, J. VERHOEF und J. A. VAN STRIJP (1997)

Delta-toxin form *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst

J. Infect. Dis. **176**, 1531-1537.

SCHMITZ, F. J., M. STEIERT, B. HOFMANN, J. VERHOEF, U. HADDING, H. P. HEINZ und K. KÖHRER (1998)

Development of a multiplex- PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates

Path. Sci. Great Britain and Ireland, **47**, 335-340.

SCHRAMM, R. und H. THORLACIUS (2003)

Staphylococcal enterotoxin B- induced acute inflammation is inhibited by dexamethasone: important role of CXC chemokines KC and macrophage inflammatory protein 2

Infect. Immun. **71**, 2542-2547.

SCHULZ, J. (1994)

Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. Grundsätze

In: Wendt, K., H. Bostedt, H. Mielke und H.-W. Fuchs (Hrsg): Euter- und Gesäugekrankheiten, G. Fischer Verl. Jena, Stuttgart, 226-238.

SCHWARTZ, D. C., W. SAFFRAN, J. WELSH, R. HAAS, M. GOLDENBERG und C. R. CANTOR (1982)

New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **47**, 189-195.

SEKI, K., J. SAKURADA, H. K. SEONG, M. MURAI, H. TACHI, H. ISHII und S. MASUDA (1998)

Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals-special reference to correlation with size of protein-A gene  
Microbiol. Immun. **42**, 407-409.

SERGEEV, N., D. VOLKHOV, V. CHIZHIKOV und A. RASOOLY (2004)

Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay  
J. Clin. Microbiol. **42**, 2134-2143.

SHAFER, W. M. und J. J. IANDOLO (1978)

Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B  
Infect. Immun. **20**, 273-278

SHANDS, K. N., G. P. SCHMID, B. B. DAN, D. BLUM, R. J. GUIDOTTI, N. T. HERGRET, R. L. ANDERSON, D. L. HILL, C. V. BROOME, J. D. BAND und D. W. FRASER (1980)

Toxic shock syndrome in menstruating women: its association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and the clinical features in 52 cases  
N. Engl. J. Med. **303**, 1436-1442.

SHIMAOKA, M., M. YOH, Y. TAKARAD, K. YAMAMOTO und T. HONDA (1996)

Detection of the gene for toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by enzyme-labelled oligonucleotide probes  
J. Med. Microbiol. **44**, 215-218.

SHOSHANI, E., G. LEITNER, B. HANOCHI, A. SARAN, N. Y. SHPIGEL und A. BERMAN (2000)

Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection  
J. Dairy. Res. **67**, 155-169.

SIMON, C. und W. STILLE (2000)

Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis, 10. Auflage, F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 29-31.

SKALKA, B., J. SMOLLA und J. PILLICH (1979)

A simple method of detecting staphylococcal hemolysins  
Zbl. Bact. Hyg. I. Abt. Orig. A. **245**, 283-286.

SLOBODNIKOVA, L., D. KOTULOVA und I. ZAHRADNIKOVA (1995)

*Staphylococcus aureus* in chronic and recurrent infections  
Fol. Microbiol. **40**, 655-658.

SMELTZER, M. S., A. F. GILLASPY, F. L. PRATT JR, M. D. THAMES und J. J. IANDOLO (2000)

Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes  
Gene. **196**, 249-259.

SMITH, K. L. und J. S. HOGAN (1993)

Environmental mastitis  
Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. **9**, 489-498.

SMITH, TH., L. K. FOX und J. R. MIDDLETON (1998)

Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd  
J. Am. Vet. Med. Assoc. **212**, 553-556.

SMYTH, D. S., P. J. HARTIGAN, W. J. MEANEY, J. R. FITZGERALD, C. F. DEOBALD, G. A. BOHACH und C. J. SMYTH (2005)

Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and *saPI*bov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbit and poultry  
J. Med. Microbiol. **54**, 401-411.

SNODGRASS, J. L., N. MOHAMED, J. M. ROSS, S. SAU, C. Y. LEE und M. S. SMELTZER (1999)

Functional analysis of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesion B domain  
Infect. Immun. **67**, 3952-3959.

SOMERVILLE, G. A., A. COCKAYNE, M. DURR, A. PESCHEL, M. OTTO und J. M. MUSSER (2003)

Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity

J. Bacteriol. **185**, 6686-6694.

SOMMERHÄUSER, J. (2001)

Untersuchung mittels Geno- und Phänotypisierung zur Epidemiologie von *Staphylococcus aureus* als Erreger subklinischer Mastitiden in hessischen Milcherzeugerbetrieben im Zuge von Bestandssanierungsmaßnahmen

Vet. Med. Diss, Universität Leipzig.

SOMMERHÄUSER, J., B. KLOPPERT, W. WOLTER, M. ZSCHÖCK, A. SOBIRAJ und K. FAILING (2003)

The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme

Vet. Microbiol. **96**, 91-102.

STEPHAN, R., C. ANNEMÜLLER, A. A. HASSAN und C. LÄMMLER (2000)

Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland

Vet. Microbiol. **2051**, 1-10.

STRAUB, J. A., C. HERTEL und W. P. HAMMES (1999)

A 23S rRNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy product

J. Food Prot. **62**, 1150-1156.

STUMPF, H. J. (1988)

Untersuchungen über die Bedeutung koagulase-positiver und koagulase-negativer Staphylokokken für die Mastitis des Rindes

Vet. Med. Diss, Justus-Liebig-Universität Gießen.

SU, Y. C. und A. C. L. WONG (1995)

Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H

Appl. Environ. Microbiol. **61**, 1438-1443.

SU, Y. C. und A. C. L. WONG (1996)

Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay

J. Food. Prot. **59**, 327-330.

SUTRA, L. und B. POUTREL (1994)

Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*

J. Med. Microbiol. **40**, 79-89.

SVENSSON, L. A., E. M. SCHAD, M. SUNDSTRÖM, P. ANTONSSON, T. KALLAND und M. DOHLSTED (1997)

Staphylococcal enterotoxins A, D, and E

Prep. Biochem. Biotechnol. **27**, 199-228.

SWITALSKI, L. M., J. M. PATTI, W. BUTCHER, A. G. PRISTINA, P. SPEZIALE und M. HÖÖK (1993)

A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesin to cartilage

Mol. Microbiol. **7**, 99-107.

TAKESHIGE, K., K. WATANABE, H. IGARASHI, M. SHINGAKI und T. TERAYAMA (1983)

Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types of isolates

Jpn. J. Vet. Sci. **43**, 355-362.

TAKEUCHI, S., K. ISHIGURO, M. IKEGAMI, T. KAIDOH und Y. HAYAKAWA (1996)

Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows milk and farm bulk milk

Vet. Microbiol. **59**, 251-258.

TAMARAPU, S., J. L. MCKILLIP und M. DRAKE (2001)

Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products

J. Food. Prot. **64**, 664-668.

TENOVER, F. C., R. ARBEIT, G. ARCHER, J. BIDDLE, S. BYRNE, R. GOERING, G. HANCOCK, G. A. HEBERT, B. HILL, R. HOLLIS, W. R. JARVIS, B. KREISWIRTH, W. EISNER, J. MASLOW, L. K. McDOUGAL, J. M. MILLER, M. MULLIGAN und M. A. PFALLER (1994)

Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*

J. Clin. Microbiol. **32**, 407-415.

TENOVER, F. C., R. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. E. PERSING und B. SWAMINATHAN (1995)

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing

J. Clin. Microbiol. **33**, 2233-2239.

THELESTAM, M. (1983)

Modes of membrane damaging action of staphylococcal toxins

In: staphylococci and staphylococcal infections 705-744. Hrsg: Easmon, C. S. F und C. Adlam. Academic Press, London, New York.

TODAR, K. (2005)

*Staphylococcus aureus*

Uni. Wisconsin. Madison. Department of Bacteriology.

TODD, J., M. FISHAJT, F. KAPRAL und T. WELCH (1978)

Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci

Lancet. **2**, 1116-1118.

TOLLERSRUD, T., K. KENNY, A. J. REITZ und J. C. LEE (2000)

Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States

J. Clin. Microbiol. **38**, 2998-3003.

TOSHKOVA, K., E. SAVOV, I. SOEDARMANTO, C. LÄMMLER, D. CHANKOVA, A. VAN BELKUM, H. A. VERBRUGH und VAN W. LEEUWEN (1997)

Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers

Zbl. Bakt. **286**, 547-559.

- TRISTAN, A., L. YING, M. BES, J. ETIENNE, F. VANDENESCH und G. LINA (2003)  
Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections  
J. Clin. Microbiol. **41**, 4465-4467.
- TSEN, H. Y. und T. R. CHEN (1992)  
Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods  
Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**, 685-690.
- TSEN, H. Y., G. K. YU und I. T. LIN (1995)  
Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods  
J. Food. Pro. **58**, 147-153.
- TUCHSCHERR, L. P. N., F. R. BUZZOLA, L. P. ALVAREZ, R. L. CACCURI, J. C. LEE und D. O. SORDELLI (2005)  
Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice  
Infect. Immun. **73**, 7932-7937.
- TUNG, H. S., B. GUSS, U. HELLMAN, L. PERSSON, K. RUBIN und C. RYDEN (2000)  
A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal sdr family  
J. Biochem. **345**, 611-619.
- UHLEN, M., B. GUSS, B. NILSSON, S. ATENBECK, L. PHILIPSON, und M. LINDBERG (1984)  
Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A  
J. Biol. Chem. **259**, 1695-1702.
- UNTERMANN, F. (1994)  
Staphylokokken-Enterotoxine  
In: Staphylokokken-Infektionen und –Enterotoxine, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band II/Teil 2. Auflage. Hrsg. Blobel, H. und T. Schließer, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

VALLE, J., S. VADILLO, S. PIRIZ und E. GOMEZ- LUCIA (1991)

Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk  
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 889-891.

VANCRAEYNEST, D., K. HERMANS und F. HAESEBROUCK (2006)

Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains  
Vet. Microbio. **117**, 211-218.

VANDANA, S., M. RAJE und M. V. KRISHNASASTRY (1997)

The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus*  
J. Biol. Chem. **272**, 24858-24863.

VARSHNEY, J. P., M. P. KAPUR und A. SHARMA (1993)

Studies on some biochemical characteristics of *Staphylococcus aureus* of buffalo mammary origin  
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. **16**, 317-321.

VIMERCATI, C., P. CREMONESI, B. CASTIGLIONI, G. PISONI, P. BOETTCHER, A. STELLA, G. VICENZONI und P. MORONI (2006)

Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes  
J. Vet. Med. B **53**, 423-428.

VINTOV, J., F. M. AAERESTRUP und C. E. ZINN (2003)

Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries  
Vet. Microbiol. **95**, 133-147.

WALTHER, B., W. A. FRIEDRICH, L. BRUNNBERG, L. W. WIELER und A. LÜBKE-BECKER (2006)

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Veterinärmedizin: ein „New Emerging Pathogen“  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **119**, 222-232.

- WATTS, J. A., D. K. Q. WANG, A. PILLAY, N. WELLER und J. C. LEE (2005)  
*Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence  
Infect. Immunol. **73**, 3502-3511.
- WEISS, E. (1988)  
Geschlechtsorgane  
In: Dahme, E und E. Weiss (Hrsg): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke Verlag. Stuttgart, 270-313.
- WENDT, K., H. BOSTEDT, H. MIELKE und H. W. FUCHS (1994)  
Euter- und Gesäugekrankheiten  
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- WILLEM, B., V. LEEUWEN, D. MELLES, A. ALAIDAN, M. AL-AHDAL, H. BOELENS, S. V. SNIJDERS, H. WERTHEIM, E. DUIJKEREN, J. PEETERS, P. VAN DER SPEK, R. GORKINK, G. SIMONS, H. VERBRUGH und A. BELKUM (2005)  
Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*  
J. Bacteriol. **187**, 4584-4591.
- WILLIAMS, R. J., J. M. WARD, B. HENDERSON, S. POOLE, B. P. O'HARA, M. WILSON und S. P. NAIR (2000)  
Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1  
Infect. Immunol. **68**, 4407-4415.
- WINKLE, S. (1979)  
Mikrobiologische und serologische Diagnostik mit Berücksichtigung der Pathogenese und Epidemiologie  
Gustav Fischer Verlag, stuttgart, NewYork.
- XU, S., R. D. ARBEIT und J. C. LEE (1992)  
Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes  
Infect. Immun. **60**, 1358-1362.

YAMACUCHI, T., K. NISHIFUJI, M. SASAKI, Y. FUDABA, M. AEPFELBACHER, T. TAKATA, M. OHARA, H. KOMATSUZAWA, M. AMAGAI und M. SUGAI (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., J. K. MCCORMICK, M. L. PAUSTIAN, P. M. ORWIN, V. KAPUR und P. M. SCHLIEVERT (2002)

Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3

J. Biol. Chem. **277**, 13138-13147.

YOKOMIZO, Y., Y. MORI, Y. SHIMOJI, S. SHIMIZU, H. SENTSUI, MICHIKODAMA, und H. IGARASHI (1994)

Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1

J. Vet. Med. Sci. **57** (2), 299-305.

ZADOKS, R., W. LEEUWEN, H. BARKEMA, O. SAMPIMON, H. VERBRUGH, Y. SCHUKKEN und A. BELKUM (2000)

Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates

J. Clin. Microbiol. **38**, 1931-1939.

ZECCONI, A., E. BINDA, V. BORRAMEO und R. PICCININI (2005)

Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts

J. Dairy. Research. **72**, 203-208.

ZECCONI, A., L. CESARIS, E. LIANDRIS, V. DAPRA und R. PICCININI (2006)

Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland

Microbiol. Pathogen. **40**, 177-183.

ZHANG, L., A. A. ROSANDER, K. JACOBSSON, MLINDBERG und L. FRYKBERG (2000)

Expression of staphylococcal protein Sbi is induced by human IgG  
Med. Microbiol. **28**, 211-218.

ZHANG, L., K. JACOBSSON, J. VASI, M. LINDBERG und L. FRYKBERG (1998a)

A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*  
Microbiol. **144**, 985-991.

ZHANG, L., K. JACOBSSON, K. STROM, M. LINDBERG und L. FRYBERG (1999)

*Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I  
Microbiol. **145** (Pt 1), 177-183.

ZHANG, S., J. J. IANDOLO und G. C. STEWART (1998b)

The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*)  
FEMS. Microbiol. Lett. **168**, 227-233.

ZSCHÖCK, M., A. NESSELER und I. SUDARWANTO (2005a)

Evaluation of six commercial identification kits for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis  
J. App. Microbiol. **98**, 450-455.

ZSCHÖCK, M., B. KLOPPERT, W. WOLTER, H. P. HAMANN und C. LÄMMLER (2005)

Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis  
Vet. Microbiol. **108**, 243-249.

ZSCHÖCK, M., D. BOTZLER, S. BLÖCHER und J. SOMMERHÄUSER (1998)

Nachweis von Genen für Enterotoxine (*ent*) und Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (*tst*) in *Staphylococcus aureus*-Isolaten aus subklinischer Mastitis des Rindes mittels Polymerase-Kettenreaktion  
In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft: **39**. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 22.9-25.9.1998, DVG Gießen, 251-256.

---

ZSCHÖCK, M., D. BOTZLER, S. BLÖCHER, J. SOMMERHÄUSER und H. P. HAMMAN (2000)

Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1(*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction  
Inter. Dairy. J. **10**, 569-574.

ZSCHÖCK, M., J. SOMMERHÄUSER und H. CASTANEDA (2000a)

Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd  
J. Dairy. Res. **76**, 429-435.

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Landesbetriebes Hessisches Landeslabor (LHL) für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. C. Lämmler für seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Dissertation zu großem Dank verpflichtet.

Mein Danke gilt auch Herrn Dr. M. Zschöck für die freundliche Überlassung des Themas sowie für sein unermüdliches Interesse und seine Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Insbesondere bedanke ich mich beim Libysch-Arabischen Volksjamahiria, der mir durch finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums die Durchführung und erfolgreiche Beendigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Auch möchte ich Frau Dr. K. Riße für die abschließende Durchsicht der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Mein besondere Dank gilt Frau M. Fdil., Herrn H. – P. Jung., Frau B. Kloppert., Herrn J. Wießner., Frau T. Puchtinger und Frau S. Zimmermann.

Des Weiteren möchte ich mich noch bei Herrn K. Failing aus der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für seine Unterstützung recht herzlich bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Ehemann Fawzi Alhain der mich während des Entstehens dieser Arbeit immer wieder ermutigt und unterstützt hat, sowie meinen Söhnen Abdussalam, Abdurrahman und Abduelellah.

**10 ANHANG****Chemikalien, Biochemika und Verbrauchsmaterial**

2-Propanol	(Merck, Darmstadt, 1.69634.1000)
Agarose	
-Biozym LE Agarose	(Biozym, Hess-Oldendorf, 840004)
-Pulsed Field Certified Agarose	(Bio-Rad, München, 162.0137)
Bovine Serum, Albumin (BSA)	(Promega, Mannheim, 198313)
EDTA-Kaninchenplasma	(Merck, 1.13306)
Ethanol (96-99%)	(Merck, 1.00986)
Ethidiumbromid-Färbung (1%)	(Merck, 1.11615)
Lysostaphin(1 mg/ml)	(Sigma, Deisenhofen, L 2898)
Magnesiumchlorid (25 mmol/l)	(Sigma, M.8787)
Mercaptoethanol (14,3 mol/l)	(Merck, 1.15433)
Phenylmethan-Sulfonylfluorid	(Merck, 1.07349)
Proteinase K	(Qiagen, Hilden, 11867837)
RNase-Free DNase Set	(Promega, 215252)

**Lösungen und Puffer**

Buffer J	(Promega, 15308010)
Lysispuffer:	
-0,5 g Polyoxyethylene	(Sigma, P-5759)
-0,2 g Deoxycholic Acid	(Sigma, D-2510)
-0,5 g N-Lauroylsarcosine	(Sigma, L.5000)
-72,6 mg Tris	(Merck, 1547)
-3,722 g EDTA	(Merck, 1.00944)
-5,86 g Natriumchlorid	(Merck, 1.06404)

Die Chemikalien werden in ca. 450 ml deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von ca. 8,00 eingestellt. Danach wird auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Kristallviolett-Lösung	(Sigma, 026K4343)
------------------------	-------------------

**Stop-Mix:**

-0,083 g Bromphenolblau Natriumsalz 0,25%	(Serva, Heidelberg, 15375)
-0,083 g Xylene Cyanol 0,25%	(ICN Biomedicals Ohio, USA, 806801)
-10 ml Glycerin 30%	(Serva, 23175)
-23,3 ml Aqua dest	

**TBE 10 x:**

121,1 g Tris Base 1M	(Merck, 1.51047)
61,8 g Borsäure 1M	(Merck, 1.00162)
5,845 g 1 mM EDTA	(Merck, 1.00944)

**TE-Puffer**

1,211 g/l 10 mM Tris-HCl	(Merck, 1547)
5,845 g/l 1 mM EDTA	(Merck, 1.00944)

Zitratlösung (Sigma, 915-50 ml)

**Nährmedien und Zusätze**

Äskulin	(Merck, 100842).
Baird-Parker Agar	(Merck, 1.05406)
BHI-Puffer:	
-47 g/l Brain Heart Infusion Agar	(Oxoid, Wesel, B. 292495)
-1000 ml	Aqua.dest
Blutagar-Basis	(Merck, 1. 10886)
Columbia Agar	(Merck, 110455)
DNase Testagar	(Merck, 1. 10449)
Eigelb-Tellurit-Emulsion 20%	(Merck, 1.03785)
Nährbouillon	(Merck, 1.07882)
Rinderserum	(Fiebig, 64000100)
Rinderblut	(Fiebig, 65510)
Schafblut	(Fiebig, Idstein, 65510)

Staphylokokken-Anreicherungsbouillon (Merck, 1.07899)

Todd-Hewitt Bouillon:

-6,4 g/l Todd-Hewitt Medium (Oxoid, CM 189)

-1000 ml Aqua dest

Tryptose Agar (Merck, 1.10237)

### Marker

DNA-Längenstandard IV (Roche, Mannheim )

Lambda Ladder PFGE Marker (Bio-Rad, 170-3635)

Simplyload™ 100 Bp DNA Ladder (Biozym, 850327)

### Kits

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, 69506)

MASTASTAPH-Kit (Mast Diagnostics, 199139)

Omniscript RT Kit (10) (Qiagen, 205110)

QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, 51306)

RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen, 74104)

### Geräte

BIO Photometer (Eppendorf, Hamburg)

Chef DR II-Elektrophoresegerät (Bio-Rad)

Elektrophoresekammer Blue Marine 200 BM (Bio-Rad)

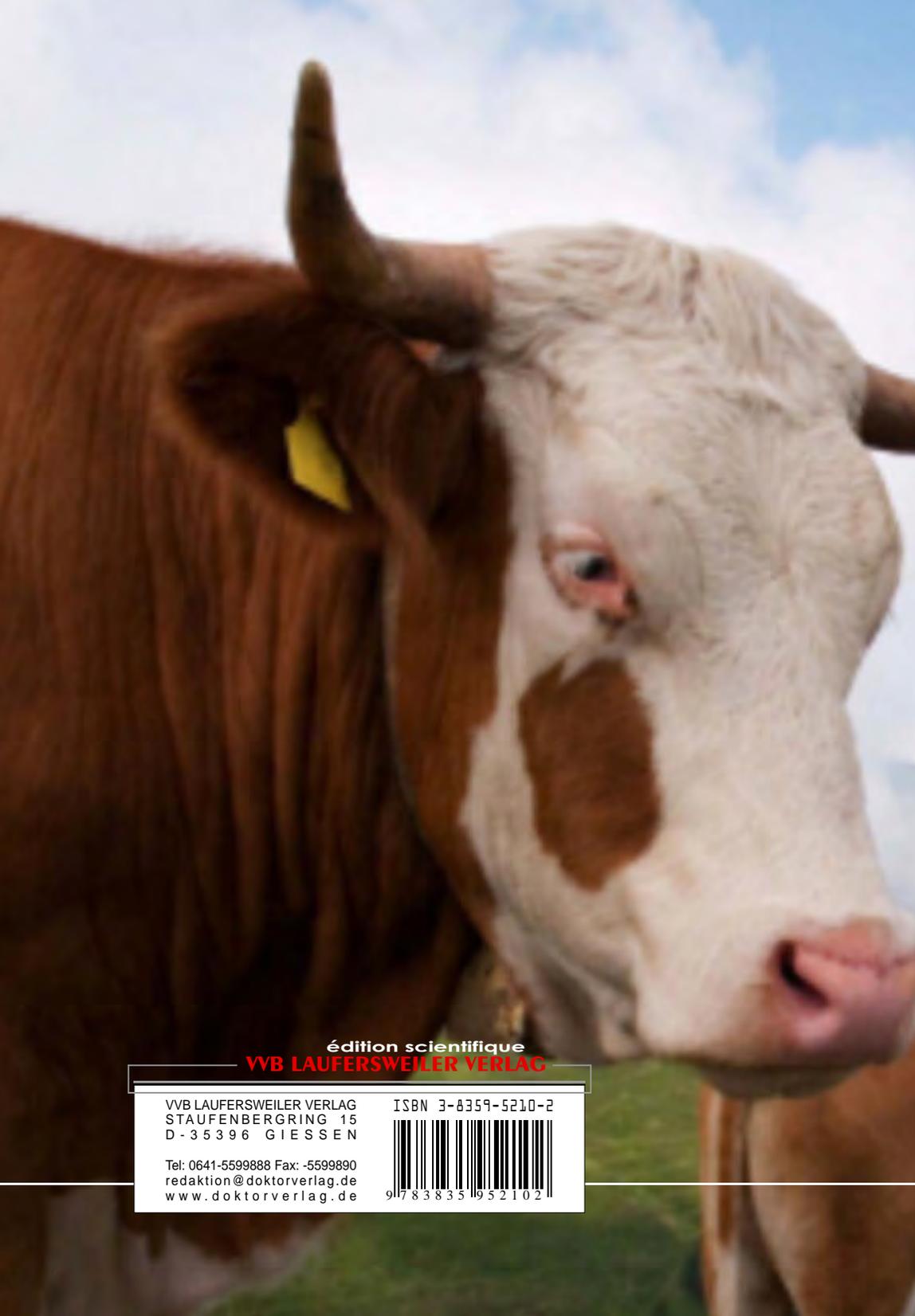
Elektrophoresekammer BM 100 (Boehringer, Mannheim)

Fossomatic 5000 (Foss Electric, Dänemark; IDF, 1995)

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

UV-Licht Gel-Videodokumentationssystem-  
Image Master, VDS (Pharmacia Biotech)

Zentrifuge 5417 C (Eppendorf)



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5210-2



9 783835 952102