

**PHÄNO- UND GENOTYPISIERUNG VON  
*Staphylococcus aureus*, ISOLIERT VON RINDERMASTITIDEN AUS  
DEM BUNDESSTAAT SÃO PAULO, BRASILIEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

KENIO DE GOUVÊA CABRAL

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
und dem Staatlichen Untersuchungsamt Hessen, Gießen

Betreuer: Prof. Dr. C. Lämmler

**PHÄNO- UND GENOTYPISIERUNG VON  
*Staphylococcus aureus*, ISOLIERT VON RINDERMASTITIDEN AUS  
DEM BUNDESSTAAT SÃO PAULO, BRASILIEN**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
KENIO DE GOUVÊA CABRAL  
Tierarzt aus Cuiabá - Brasilien

Gießen 2003

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Lämmler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2003

**Meiner Frau  
und dem Andenken meiner Eltern**

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> : Taxonomische Einordnung und einige Eigenschaften.....	3
2.2	<i>S. aureus</i> als Mastitiserreger des Rinds .....	3
2.3	Mutmaßliche Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> .....	5
2.3.1	Wechselwirkungen mit Fibrinogen.....	6
2.3.2	Wechselwirkungen mit Immunglobulinen .....	9
2.3.3	Wechselwirkungen mit Kollagen.....	10
2.3.4	Wechselwirkungen mit Fibronectin.....	11
2.3.5	Kapselsubstanzen von <i>S. aureus</i> .....	13
2.3.6	Thermonuclease und Hyaluronidase.....	14
2.3.7	Hämolysine und Toxine .....	15
2.3.7.1	Hämolysine .....	15
2.3.7.2	Enterotoxine .....	17
2.3.7.3	„Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin.....	23
2.3.7.4	Exfoliative Toxine A und B .....	24
2.3.7.5	„Exotoxin-like“-Proteine .....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
3.1	Bakterienkulturen.....	27
3.2	Anzüchtungsmedien und Konservierung der Kulturen.....	29
3.2.1	Anzüchtungsmedien.....	29
3.2.2	Subkultivierung der Kulturen.....	31
3.3	Identifizierung der <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	31
3.3.1	Nachweis der Katalase .....	31
3.3.2	Pigmentbildung .....	32
3.3.3	Nachweis der Koagulasereaktion .....	32
3.3.4	Hämolysiformen.....	32
3.3.5	Nachweis des Clumping-Factors .....	33
3.3.6	Identifizierung mit Hilfe des „Stapha urex-Plus“ Testsystems .....	33
3.3.7	Weitere Enzymnachweise .....	34
3.3.7.1	DNase und Thermonuclease .....	34
3.3.7.2	Hyaluronidase .....	35

3.3.8	Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten .....	36
3.4	Makrorestriktionanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese .....	37
3.4.1	Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA .....	37
3.4.2	PFGE .....	39
3.4.3	Etidiumbromidfärbung .....	39
3.4.4	Auswertung der PFGE-Muster .....	40
3.5	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Gene bzw. Genabschnitte und Nachweis von Toxingenen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
3.5.1	DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“ .....	40
3.5.2	Durchführung der PCR .....	41
3.5.3	Verwendete Oligonukleotidprimer und Thermocycler- Temperaturprogramme .....	42
3.5.4	Agarosegelelektrophorese .....	42
3.5.5	Etidiumbromidfärbung .....	43
3.5.6	„Multiplex-PCR“ .....	46
3.6	Statistische Methoden.....	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
4.1	Phänotypische Eigenschaften.....	49
4.2	Ergebnisse des „DNA-Fingerprinting“ .....	51
4.3	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Gene bzw. Genabschnitte mittels PCR .....	57
4.4	Statistische Auswertung .....	87
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
5.1	Phänotypische Eigenschaften.....	88
5.2	Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA .....	97
5.3	Nachweis <i>S. aureus</i> -spezifischer Gene bzw. Genabschnitte mittels PCR .....	104
5.4	Schlußfolgerungen .....	123
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>130</b>

**TABELLENVERZEICHNIS**

<u>Tab. 3-1:</u>	Herkunft der 87 untersuchten <i>S. aureus</i> -Kulturen, isoliert im Bundesstaat São Paulo, Brasilien.....	28
<u>Tab. 3-2:</u>	Übersicht über die verwendeten Antibiotikatestblättchen sowie die nach den DIN-Angaben erfolgte Bewertung der gemessenen Hemmhöfe in mm .....	37
<u>Tab. 3-3:</u>	Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotidprimer und die verwendeten Thermocyclertemperaturprogramme .....	44
<u>Tab. 3-4:</u>	Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer nach MONDAY und BOHACH (1999) .....	47
<u>Tab. 4-1:</u>	Verteilung der neun Abstammungslinien innerhalb der 87 <i>S. aureus</i> -Kulturen aus sechs verschiedenen Bezirken des Bundesstaats São Paulo, Brasilien. ....	55
<u>Tab. 4-2:</u>	Vorkommen von Virulenzgenen innerhalb vorherrschender und sporadischer Abstammungslinien.....	84
<u>Tab. 4-3:</u>	Beziehungen zwischen Abstammungslinie, PFGE-Muster und einigen phäno- sowie genotypischen Eigenschaften der 87 <i>S. aureus</i> -Kulturen .....	85
<u>Tab. 5-1:</u>	Schema zur Beurteilung von PFGE-Gelen nach TENNOVER et al. 1995.....	102

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<u>Abb. 4-1:</u>	Unterschiedliche <i>Sma</i> I-Makrorestriktionsmuster der chromosomalen DNA von neun <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	52
<u>Abb. 4-2:</u>	<i>Sma</i> I-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von acht <i>S. aureus</i> -Kulturen, isoliert aus dem Betrieb IB1 .....	53
<u>Abb. 4-3:</u>	Dendrogrammanalyse der 26 DNA- <i>Sma</i> I-Restriktionsmuster und Darstellung der neun abgrenzbaren Abstammungslinien .....	54
<u>Abb. 4-4:</u>	Verteilung der neun Abstammungslinien der 87 <i>S. aureus</i> - Kulturen innerhalb der sechs verschiedenen Bezirke aus den Regionen Bauru und Sorocaba im Bundesstaat São Paulo, Brasilien. ....	56
<u>Abb. 4-5:</u>	Typische Amplikons des 23S rRNA-Gens einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IB2.....	57
<u>Abb. 4-6:</u>	Amplikons der 16S-23S rDNA-ISR einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus den Betrieben IB1 (1), IIC1 (2), IIA1 (3) und IB1 (4) .....	58
<u>Abb. 4-7:</u>	Typische Amplikons des Thermonuclease-Gens <i>nuc</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IIC3.....	59
<u>Abb. 4-8:</u>	Amplikons des Clumping-Factor-Gens <i>clfA</i> von acht <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IIA1.....	60
<u>Abb. 4-9:</u>	Schematische Darstellung des Koagulase-kodierenden Gens <i>coa</i> nach Angaben von KAIDA et al. (1989) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer nach HOOKEY et al. (1998) .....	61
<u>Abb. 4-10:</u>	Typische Amplikons des Koaguase-Gens <i>coa</i> von fünf <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	62
<u>Abb. 4-11:</u>	Schematische Darstellung des Protein A-kodierenden Gens <i>spa</i> nach den Angaben von UHLÉN et al. (1984) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer <i>spa</i> I und II nach SEKI et al. (1998) und der Oligonukleotidprimer <i>spa</i> III und IV nach FRÉNAVY et al. (1996). ....	63
<u>Abb. 4-12:</u>	Typische Amplikons des die X-Region-kodierenden Teils des Gens <i>spa</i> von neun <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	65
<u>Abb. 4-13:</u>	Amplikons des die IgG-bindende-Region-kodierenden Teils des Gens <i>spa</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IIB3. ....	66



<u>Abb. 4-14:</u>	Schematische Darstellung des Gens <i>cna</i> nach den Angaben von PATTI et al. (1992) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer <i>cna</i> I, III, IV und V nach SWITALSKI et al. (1993). .....	67
<u>Abb. 4-15:</u>	Typische Amplikons des Abschnitts A des CNA-kodierenden Gens <i>cna</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	68
<u>Abb. 4-16:</u>	Typische Amplikons des Abschnitts B des CNA-kodierenden Gens <i>cna</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	69
<u>Abb. 4-17:</u>	Amplikons der FnBP-kodierenden Gene <i>fnbA</i> und <i>fnbB</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IA2 .....	70
<u>Abb. 4-18:</u>	Vergleich der Gene <i>cap5</i> und <i>cap8</i> nach Angaben von SAU et al. (1997), sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer nach MOORE und LINDSAY (2001). .....	72
<u>Abb. 4-19:</u>	Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 5-kodierenden Gens <i>cap5</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IB2 .....	73
<u>Abb. 4-20:</u>	Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 8-kodierenden Gens <i>cap8</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IB2 .....	74
<u>Abb. 4-21:</u>	Amplikons des <i>agrI</i> -Gens einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IIB3 .....	75
<u>Abb. 4-22:</u>	Amplikons des <i>agrII</i> -Gens einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IID2 .....	76
<u>Abb. 4-23:</u>	Amplikon des <i>agrIII</i> -Gens einer <i>S. aureus</i> -Kultur aus dem Betrieb IIC1 .. .....	76
<u>Abb. 4-24:</u>	Typische Amplikons des Gens <i>hla</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IB1 .....	77
<u>Abb. 4-25:</u>	Typische Amplikons des Gens <i>hIb</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IIC1 .....	78
<u>Abb. 4-26:</u>	Typische Amplikons des Enterotoxin G-kodierenden Gens <i>seg</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	79
<u>Abb. 4-27:</u>	Typische Amplikons des Enterotoxin H-kodierenden Gens <i>seh</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	80

---

<u>Abb. 4-28:</u>	Typische Amplikons des Enterotoxin I-kodierenden Gens <i>sei</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen.....	81
<u>Abb. 4-29:</u>	„Multiplex PCR“ für den gemeinsamen Nachweis der Gene <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> und <i>sej</i> und des 16S rRNA-Gens von <i>S. aureus</i> .....	82
<u>Abb. 4-30:</u>	Typische Amplikons des „Exotoxin-like“-Protein-kodierenden Gens <i>set1</i> einiger <i>S. aureus</i> -Kulturen aus dem Betrieb IB2 .....	83
<u>Abb. 5-1:</u>	Schema zur Funktionsweise der PFGE (CHEF-System) nach LAI et al. (1989).....	100
<u>Abb. 5-2:</u>	Schematische Darstellung eines typischen rRNA-Operons nach KING et al. (1986) .....	105
<u>Abb. 5-3:</u>	Schematische Darstellung des <i>agr</i> -Systems nach NOVICK und MUIR (1999).....	118

**Übersicht der häufig verwendeten Abkürzungen oder Einheiten**

A	Adenin
<i>agr</i>	accessory gene regulator
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
$a_w$	Wasseraktivität
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
<i>cap</i>	Polysaccharidkapsel-kodierendes Gen
Clf	Clumping-Factor
<i>clf</i>	Clf-kodierendes Gen
CNA	Kollagen-bindendes Protein
<i>cna</i>	CNA-kodierendes Gen
<i>coa</i>	Koagulase-kodierendes Gen
d.h.	das heißt
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
ET	Epidermolytisches Staphylokokkentoxin
<i>eta bis etd</i>	Epidermolytische Staphylokokkentoxin A bis D-kodierende Gene
FnBP	Fibronectin-bindendes Protein (e)
<i>Fnb</i>	FnBP-kodierendes Gen
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	hora (Stunde)
Ig	Immunglobuline
ISR	intergenic spacer region
Kb	1000 Basen
kDa	1000 Da
kg	Kilogramm
km	Kilometer
l	Liter
m	milli ( $10^{-3}$ )
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)

---

mm	Millimeter
Mol	absolute Menge einer Substanz
n	nano ( $10^{-9}$ )
nm	Nanometer
<i>nuc</i>	Thermonuclease-kodierendes Gen
p	pico ( $10^{-12}$ )
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PT	Pyrogenes Toxin
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
S	Svedberg
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	Staphylokokkenenterotoxine
<i>sea bis seq</i>	Staphylokokkenenterotoxin A bis Q-kodierende Gene
SET	Staphylokokken-„Exotoxin-like“-Protein (e)
<i>set</i>	SET-kodierendes Gen
<i>spa</i>	Protein A-kodierendes Gen
T	Thymin
TSS	„Toxic-Shock-Syndrom“
TSST	„Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin
<i>tst</i>	TSST-kodierendes Gen
U	Unit (Internationale Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
$\Sigma$	Summe
%	Prozent
<	kleiner als
$\leq$	kleiner als oder gleich
>	größer als
$\geq$	größer als oder gleich
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## 1 EINLEITUNG

Infektionen, die durch Bakterien der Gattung *Staphylococcus* hervorgerufen werden, sind durch meist eitrige Krankheitsprozesse charakterisiert. Die ubiquitäre Verbreitung dieser Bakterien, die sowohl die gesunde Haut als auch die Schleimhaut besiedeln können, führt zu zahlreichen Ansteckungsmöglichkeiten. Die größte Bedeutung innerhalb der bislang unter der Webadresse der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) beschriebenen 49 Staphylokokkenspezies und Subspezies besitzt *Staphylococcus aureus*, welcher neben lokalisierten und generalisierten pyogenen Erkrankungen auch toxinvermittelte Krankheitsprozesse hervorrufen kann.

In der Tiermedizin hat *S. aureus* als Erreger von klinischen und vor allem subklinischen Mastitiden des Rindes eine herausragende Bedeutung. Mastitiden können zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch, zu Leistungsrückgang bis hin zum vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Milchdrüse führen. Die Milch der erkrankten Kühe ist darüberhinaus für den menschlichen Genuss nicht geeignet und darf daher nicht zur Herstellung von Lebensmitteln genutzt werden. Aus diesem Grund stellen *S. aureus*-Mastitiden weltweit ein erhebliches wirtschaftliches Problem dar (BRÜCKLER et al., 1994). Nach Angaben verschiedener epidemiologischer Studien scheinen *S. aureus*-Mastitiden in Betrieben durch einzelne Bakterienstämme verursacht zu werden (FITZGERALD et al., 1997; ANNEMÜLLER et al., 1999; STEPHAN et al., 2000; AKINEDEN et al., 2001). Diese *S. aureus*-Stämme lassen sich durch zahlreiche extrazelluläre und zellwandgebundene Virulenzfaktoren, die mutmaßlich für den

Schweregrad der Infektion verantwortlich zu sein scheinen und durch „DNA-Fingerprinting“ charakterisieren.

Über epidemiologische Zusammenhänge bei *S. aureus*-Mastitiden in Brasilien und über Virulenzfaktoren dieser Bakterienstämme ist bislang wenig bekannt (CARDOSO et al., 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Identifizierung von *S. aureus*, isoliert aus Milchproben von Kühen mit subklinischer Mastitis aus dem Bundesstaat São Paulo, Brasilien, mittels konventioneller und molekularer Untersuchungsverfahren. Letzteres erfolgte durch den Nachweis speziesspezifischer Gene bzw. Genabschnitte. Der Nachweis epidemiologischer Zusammenhänge der Kulturen untereinander erfolgte durch Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA. Im weiteren wurden durch PCR-vermittelte Analysen das Toxinbildungsvermögen bzw. das Toxingenmuster der Kulturen untersucht.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 *Staphylococcus aureus*: Taxonomische Einordnung und einige Eigenschaften**

*Staphylococcus aureus* wird der Gattung *Staphylococcus* und der Familie *Micrococcaceae* zugeordnet. Bei Staphylokokken handelt es sich um Gram-positive, unbewegliche, fakultativ anaerobe Kokken mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Sie bilden keine Sporen und ordnen sich in unregelmäßigen, traubenförmigen Haufen an. Der Name *S. aureus* leitet sich von der oft goldfarbenen Pigmentierung der Kolonien ab. Fehlende Pigmentierungen oder Pigmentierungen von grauweiß, gelb bis gelborange wurden ebenso beschrieben. Staphylokokken stellen kaum kulturelle Ansprüche und wachsen auf fast allen Nährböden (KLOOS und SCHLEIFER, 1986; BRÜCKLER et al., 1994). Neben *S. aureus* sind bislang 49 Staphylokokkenspezies und Subspezies bekannt, deren Differenzierung unter anderem anhand struktureller Merkmale der Zellwand sowie kultureller, biochemischer und molekularer Eigenschaften möglich ist (BRÜCKLER et al., 1994).

### **2.2 *S. aureus* als Mastitiserreger des Rinds**

Die Mastitis des Rindes ist eine weltweit verbreitete Erkrankung und wird in hohem Maße von *S. aureus* verursacht (WATTS et al., 1984; BRÜCKLER et al., 1994; LANGONI et al., 1998). Als begünstigend für eine Infektion erwies sich eine Reihe von Faktoren, wie z.B. mangelnde Stallhygiene, unsachgemäßes Melken und Euterverletzungen (BRÜCKLER et al., 1994). FROST (1975) und FROST et al. (1977) stellten fest, dass sich *S. aureus* bevorzugt an die Epithelzellen des Strichkanals und in noch stärkerem Maße an die Epithelzellen der Milchzisterne und

der großen Milchgänge anlagert. Diese „selektive Adhärenz“ der Krankheitserreger soll nach FROST et al. (1977) ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Staphylokokkenmastitis des Rindes sein. Die Staphylokokkeninfektionen des Euters kommen gehäuft am Ende einer Laktationsperiode und am Beginn der folgenden Laktationsperiode vor. Die sich anschließende Vermehrung der Staphylokokken kann mit einer katarrhalisch-eitrigen Mastitis und Galaktophoritis, mit Nekrosen sowie Abszessbildungen einhergehen. Dabei hängt das Ausmaß dieser Veränderungen mit der Virulenz der ursächlich beteiligten Staphylokokken und von der Abwehrkraft des Wirtsorganismus ab (BRÜCKLER et al., 1994). Die Abwehrkräfte des Wirtsorganismus werden in erster Linie vom Gesundheits- und Ernährungszustand, aber auch von Umweltfaktoren bestimmt. Letztere spielen bei der Prophylaxe der Rindermastitis eine entscheidende Rolle (SCHALM et al., 1971).

Die überwiegend vorkommenden chronisch-katarrhalischen Staphylokokkenmastitiden verlaufen oft subklinisch, unterbrochen durch gelegentliches akutes Aufflackern der Infektion, besonders nach dem Kalben. Das bedeutet, dass sie klinisch nicht immer ohne weiteres erkennbar sind. Die Produktion der Milch ist vermindert und ihre Qualität herabgesetzt. Die akute katarrhalische Staphylokokkenmastitis ist meistens durch eine schmerzhaftige Schwellung der erkrankten Eutervierviertel und deutliche Veränderungen in der Milch gekennzeichnet. Das Eutersekret kann rötlich verfärbt sein, enthält Eiterflocken und die Milchproduktion ist stark reduziert (BRÜCKLER et al., 1994).

Rindermastitiden stellen in Brasilien ebenfalls den Hauptfaktor für Verluste in der Milchproduktion dar (COSTA et al., 1991). Studien zur Erregerverteilung bei der Mastitis im Bundesstaat São Paulo, Brasilien, zeigten eine eindeutige Dominanz von Staphylokokken, insbesondere von *S. aureus* (NADER-FILHO et al., 1985; LANGONI



et al., 1991; LANGONI et al., 1998). NADER-FILHO et al. (1985) untersuchten 497 Milchproben aus dem Bezirk Ribeirão Preto und konnten bei 52,1% der Proben *S. aureus* isolieren. LANGONI et al. (1991) wiesen bei 33,9% von 8752 untersuchten Milchproben, bzw. bei 35,5% von 702 untersuchten Milchproben (LANGONI et al., 1998) aus mehreren Bezirken des Bundesstaats São Paulo, *S. aureus* nach.

### 2.3 Mutmaßliche Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Pathogene Staphylokokken sind in der Lage zellwandgebundene und extrazelluläre Virulenzfaktoren, wie z.B. Enzyme und Toxine, zu bilden. Das Vorkommen dieser Virulenzfaktoren variiert, so dass verschiedene Stämme unterschiedlich virulent sein können (BOOTH et al., 2001; MOORE und LINDSAY, 2001).

Zu den zellwandgebundenen Virulenzfaktoren gehören Plasmaproteinrezeptoren (LÄMMLER und BLOBEL, 1985), welche sich an der Bakterienoberfläche befinden und zur Bindung von Fibrinogen (DUTHIE, 1954; LÄMMLER, 1983), Immunglobulin (Ig) G (BOYLE, 1990; ZHANG et al., 1998b), Fibronectin (RYDEN et al., 1983), Kollagen, Vitronectin, Laminin (PAULSSON et al., 1992a, b), Lactoferrin (NAIDU et al., 1990), Elastin (PARK et al., 1991), Sialoprotein (YACOUB et al., 1994), und von extrazellulären Matrixproteinen (HUSSAIN et al., 2001) fähig sind. Dies beinhaltet den Oberflächenrezeptor Protein A, welcher zu einer Wechselwirkung mit Immunglobulinen führt (KRONVALL et al., 1970), sowie den Clumping-Factor, welcher Fibrinogen bindet (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Weitere Eigenschaften der bakteriellen Zellwand mit Bedeutung für die Virulenz sind die Bekapselung und die Schleimproduktion der Bakterien (WILKINSON, 1983).

Zu den extrazellulären Enzymen und Toxinen gehören unter anderem die Koagulase (LOEB et al., 1903; KLOOS und SCHLEIFER, 1986), die Thermonuclease (KLOOS und SCHLEIFER, 1986), Hämolyse (ELEK und LEVY, 1950), Enterotoxine (BALABAN und RASOOLY, 2000), Epidermolytische Toxine (PARKER, 1958), das „Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin (TSST-1) (ARBUTHNOTT et al., 1990), „Exotoxin-like“-Proteine (WILLIAMS et al., 2000), Leukozidine (WENK und BLOBEL, 1970), Lipasen (BRUNNER et al., 1981), die Staphylokinase und die Hyaluronidase (ABRAMSON, 1972), Metalloproteasen (TAKEUSHI et al., 2002), Desoxyribonucleasen, Phosphatasen und Gelatinasen (KAPLAN und TENENBAUM, 1982).

### 2.3.1 Wechselwirkungen mit Fibrinogen

*S. aureus*-Kulturen sind in der Lage, Oberflächenproteine und extrazelluläre Proteine zu bilden, die mit Fibrinogen wechselwirken. Dabei wurden bislang sechs unterschiedliche fibrinogenbindende Proteine beschrieben (PALMA et al., 1998; NI EIDHIN et al., 1998). Drei davon erwiesen sich als extrazelluläre Substanzen, wie die Koagulase, ein extrazelluläres fibrinogenbindendes Protein (Efb) (BÓDEN und FLOCK, 1992) und ein extrazelluläres matrixbindendes Protein (Map) (McGAVIN et al., 1993). Die drei weiteren Proteine waren an der Zelloberfläche lokalisiert. Diese beinhalteten den Clumping-Factor A und B (ClfA und ClfB) (NI EIDHIN et al., 1998) und das an der Zelloberfläche lokalisierte fibrinogenbindende Protein FbpA (CHEUNG et al., 1995).

Die extrazelluläre Koagulase wird von allen *S. aureus*-Kulturen produziert und dient in mikrobiologischen Labors als Hauptkriterium zur Identifizierung dieser Spezies (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). BRÜCKLER et al. (1994) beschrieben die

Koagulase als extrazelluläres Protein ohne Enzymcharakter. 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 zum Schutz der Staphylokokken vor den Abwehrmechanismen des Wirts, z.B. durch Phagozytose. Laut McDEVITT et al. (1992) kann die Koagulase sowohl Fibrinogen als auch Prothrombin binden, wobei die fibrinogenbindende Domäne der zellgebundenen Koagulase im C-terminalen Bereich, die prothrombinbindende Region im Bereich des N-Terminus zu finden ist.

BRÜCKLER et al. (1994) beschrieben Koagulasen mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 90000 Da. USHIODA et al. (1981) konnten acht serologisch abgrenzbare Koagulasen nachweisen und bezeichneten diese mit Koagulase I-VIII.

Das Koagulase-Gen *coa* kodiert ein Protein, welches am N-terminalen Ende aus einem die prothrombinbindende Region beinhaltenden und als „Chymotryptic“-43 kDa-Fragment bezeichneten Abschnitt besteht. Das C-terminale Ende besitzt einen konstanten Anteil sowie eine variable Region, die für die Prothrombinbindung nicht benötigt zu werden scheint. Diese variable Region besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl sich wiederholender Einheiten („Repeats“) (KAIDA et al., 1989).

BODEN und FLOCK (1994) beschrieben erstmals das extrazellulär auftretende fibrinogenbindende Protein Efb mit einem Molekulargewicht von 15,6 kDa. Dieses Protein wird durch das Gen *efb* kodiert und bindet an die  $\alpha$ -Kette des Fibrinogens.

Das ebenso extrazellulär auftretende matrixbindende Protein Map wurde erstmals von McGAVIN et al. (1993) beschrieben. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von 72 kDa und kann Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Sialoprotein und Thrombospondin binden.

Wie erstmals 1908 von MUCH beschrieben, reagiert der Clumping-Factor im Gegensatz zur Koagulase direkt mit dem Fibrinogen des Plasmas ohne die Vermittlung eines Plasmafaktors und führt so zu einer Verklumpung der Staphylokokken. DUTHIE (1954) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass es sich bei dem auch als „gebundene Koagulase“ bezeichneten Clumping-Factor und der eigentlichen „freien Koagulase“ um zwei verschiedene Substanzen handelt. Laut MOREILLON et al. (1995) ist der Clumping-Factor an der Bakterienoberfläche lokalisiert und vermittelt direkt die Bindung an Fibrinogen oder Fibrin. Bei dem Clumping-Factor handelt es sich um ein Protein, das bis zu einer Temperatur von 100°C stabil und bei pH-Werten von 2-11 wirksam ist (USUI et al., 1985). Proteolytische Enzyme, wie Trypsin, Papain und Pepsin zerstörten nach ROTTER und KELLY (1966) seine Aktivität. Clumping-Factor-positive Staphylokokken können sich durch die Bindung von Fibrinogen mit dieser körpereigenen Substanz umhüllen und so als körperfremde Eindringlinge unerkant bleiben (BRÜCKLER et al., 1994).

NI EIDHIN et al. (1998) beschrieben neben dem als Clumping-Factor bekannten fibrinogenbindenden Protein ClfA, welches ausschließlich mit den  $\gamma$ -Ketten des Fibrinogenmoleküls reagiert, ein weiteres, als ClfB bezeichnetes Protein. ClfB erwies sich ebenfalls als ein an der Oberfläche von *S. aureus* lokalisiertes Protein, welches an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Fibrinogens bindet. Beide Proteine haben Sequenzähnlichkeiten bezüglich ihrer Signalsequenz und den zellwandgebundenen Bereichen. ClfB konnte bislang, nach NI EIDHIN et al. (1998), nur bei *S. aureus*

innerhalb der frühen exponentiellen Phase nachgewiesen werden, nicht jedoch während der späten exponentiellen oder der stationären Phase.

Das an der Zelloberfläche lokalisierte fibrinogenbindende Protein FbpA hat ein Molekulargewicht von 34 kDa und wird durch das Gen *fbpA* kodiert. Die Aminosäuresequenz von FbpA weist eine hohe Übereinstimmung mit den drei publizierten Aminosäuresequenzen der Koagulasen auf (CHEUNG et al., 1995).

### 2.3.2 Wechselwirkungen mit Immunglobulinen

JENSEN (1958), der an einem serologischen Typisierungssystem für Staphylokokken arbeitete, fand bei der Untersuchung von *S. aureus* drei unterschiedliche Antigenreaktionen, wobei mit Antigen A die stärkste Reaktion nachzuweisen war. Durch Agargelpräzipitation war auch bei Verwendung von Normalseren vom Menschen eine deutliche Reaktion mit Antigen A feststellbar (JENSEN, 1958). Der Autor vermutete, dass es sich um ein Staphylokokken-Oberflächenantigen handelte, klassifizierte es aber als Polysaccharid. Im Gegensatz dazu wiesen LÖKVIST und SJÖQUIST (1962) den auch bereits von VERWEY (1940) erkannten Proteincharakter dieses Antigens nach und GROV et al. (1964) schlugen hierfür den Namen Protein A vor.

FORSGREN und SJÖQUIST (1966) zeigten, dass es sich bei der Reaktion von Protein A mit Immunglobulinen, nicht wie angenommen, um eine normale Antigen-Antikörper-Reaktion handelte, sondern dass das Protein A mit dem Fc-Stück des IgG reagierte. Hierbei konnten, wie bereits in den Untersuchungen von JENSEN (1958) beschrieben, bei Verwendung von IgG des Menschen die stärkste Reaktion nachgewiesen werden, wobei überwiegend eine Bindung der IgG Subgruppen IgG1,

IgG2 und IgG4 vorlag (KRONVALL und WILLIAMS, 1969; KRONVALL et al., 1970; BJÖRCK und KRONVALL, 1984).

BRÜCKLER et al. (1994) beschrieben das Protein A als eine Substanz, die von fast allen *S. aureus*-Kulturen gebildet und zur Differenzierung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokkenarten genutzt werden kann. Durch Blockierung des Fc-Stücks hemmt das Protein A indirekt die Phagozytose (SJÖQUIST et al., 1972). Weiterhin wirkt das Protein A chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten und fördert die Eiterbildung (HARVEY et al., 1970; KLEICKMANN et al., 1975). Laut JONSSON et al. (1985) und PATEL et al. (1987) scheinen Protein A-negative *S. aureus*-Mutanten im Vergleich zu positiven Bakterien etwas weniger virulent zu sein.

Nach UHLÉN et al. (1984) besteht das chromosomal kodierte Protein A am aminoterminalen Ende aus einer Signalsequenz, fünf IgG-bindenden Einheiten (E, D, A, B und C) sowie der zellwandassoziierten X-Region. Diese X-Region setzt sich aus einer unterschiedlichen Zahl von sich wiederholenden Einheiten („Repeats“) und einem funktionell als Membrananker bezeichneten konstanten Anteil am C-terminalen Ende zusammen.

ZHANG et al. (1998b) beschrieben bei *S. aureus* ein weiteres nicht in der Zellwand lokalisiertes Protein, das Protein Sbi, welches eine aus 436 Aminosäuren bestehende IgG-bindende Domäne aufwies.

### **2.3.3 Wechselwirkungen mit Kollagen**

*S. aureus* ist bei Infektionen des Menschen der Haupterreger, der mit Arthritiden und Osteomyelitiden assoziiert zu sein scheint. (GRISTINA, 1987; VOYTEK et al., 1988). Solche Infektionen kommen unter anderem durch die Bindung

dieses Bakteriums an Kollagenstrukturen von knorpeligem Gewebe zustande. Bindungsaktivitäten von *S. aureus* für Kollagen Typ I und II wurden beschrieben (BUXTON, 1990; SPEZIALE et al., 1986). Vergleichbares wurde auch für *S. aureus*, isoliert aus Rindermastitiden, beobachtet (MAMO et al., 1988; MIEDZOBRODZKI et al., 1989). Die Rezeptoren für diese adhäsiven Eigenschaften konnten isoliert und molekulargenetisch charakterisiert werden (SWITALSKI et al., 1993).

Strukturell besteht das *cna*-Gen aus verschiedenen Einheiten. So 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 Wechselwirkungen mit Fibronectin

Fibronectin kommt in gelöster Form im Plasma, in der Zerebrospinalflüssigkeit oder der Synovialflüssigkeit vor und in gebundener Form als Zelloberflächenprotein z.B. bei Fibroblasten. Es ist ein dimeres Glycoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von 5%. Die beiden Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je etwa 450 kDa werden durch eine Disulfidbrücke nahe dem C-terminalen Ende verbunden (SIGNÄS et al. 1989). Plasma-Fibronectin und zellmembranständiges Fibronectin sind nahezu identisch (BRÜCKLER et al., 1994).

Fibronectin dient der Zelladhäsion, der Zellmigration (Chemotaxis), der Hämostase sowie der Opsonierung. Es trägt zur normalen Wundheilung bei, indem es die Adhärenz zu Fibroblasten, Epithelzellen oder Monozyten herstellt

(BRÜCKLER et al., 1994). Die Phagozytose wurde allerdings durch Bindung von Fibronectin an *S. aureus* nicht erhöht (VAN DE WATER et al., 1983).

*S. aureus* hat spezifische Fibronectinrezeptoren, d.h. fibronectinbindende Proteine an seiner Oberfläche (KUUSELA 1978; RYDEN et al., 1983), die es dem Bakterium ermöglichen, sich durch Vermittlung von Fibronectin an Epithelzellen, insbesondere im Bereich von Wunden, aber auch an Endothelzellen, anzuheften (KUUSELA et al., 1984; TOY et al., 1985; VALENTIN-WEIGAND, 1987; VANN et al., 1989). Nach ETESSE-CARSENTI et al. (1991) ist die Zahl der FnBP auf der Staphylokokkenoberfläche abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien und dem Medium.

Bei infektiösen Prozessen, wie z.B. infizierten Wunden oder Mastitiden, wirkt Fibronectin als Adhäsionsvermittler zu den Wirtszellen (Fibroblasten, Epithelzellen) (SWITALSKI et al., 1983; MAMO et al., 1988). Adhärerte Bakterien werden durch Abwehrmechanismen, wie z.B. Speichel oder Sekrete, nicht ohne weiteres fortgespült, können sich am Ort ihrer Anheftung vermehren und durch Bildung von Enzymen und Toxinen den Wirtsorganismus schädigen (YAMADA, 1983).

*S. aureus* bindet an ein aminoterminales 29-kDa-Fragment von Fibronectin, welches nach Plasminverdau freigesetzt wird (MOSHER und PROCTOR, 1980). Eine weitere Bindungsstelle für Staphylokokken liegt in der C-terminalen Region des Fibronectinmoleküls (KUUSELA et al., 1984). Sequenzdaten des chromosomal kodierten Gens *fnbA* für das zellwandassoziierte FnBP aus *S. aureus* 8325-4 wurden von SIGNÄS et al. (1989) veröffentlicht.

Etwa 680 Bp hinter dem Translationsstopcodon des *fnbA*-Gens befindet sich, nach JONSSON et al. (1991), ein zweites mit *fnbB* bezeichnetes Gen, dessen Genprodukt ebenfalls fibronectinbindende Aktivität aufwies. Das offene Leseraster



für *fnbB* kodiert ein Protein von 940 Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich der FnBPA- und FnBPB-Proteine zeigt 94% Aminosäureidentität in den carboxyterminalen Bereichen, die für die Fibronectinbindung und die Verankerung in der Zellwand und Zellmembran von Bedeutung sind (JONSSON et al., 1991).

### **2.3.5 Kapselsubstanzen von *S. aureus***

Das Vorkommen einer Bekapselung bei *S. aureus* geht bereits auf Beobachtungen von BIGGER et al. (1927) zurück. Stark bekapselte Stämme mit auffallend schleimigem Wachstum auf festen Medien sind allerdings selten. Die meisten klinischen Isolate sind mikrobekapselt, d.h. sie bilden keine auffallend schleimigen Kolonien (KARAKAWA und VANN, 1982; ARBEIT et al., 1984).

Die Kapseln haben eine Polysaccharidstruktur (SAU et al., 1997). Über diese Struktur gibt es unterschiedliche Angaben, die möglicherweise auch aus der Untersuchung verschiedener *S. aureus*-Stämme resultieren. Die meisten Autoren geben als Hauptbestandteile der Polysaccharidkapsel Aminoglucuronsäure und Fucosamin an (FOURNIER et al., 1987; VANN et al., 1988). Die Kapselmaterialien haben antigene Eigenschaften und lassen sich in 11 Serotypen differenzieren (KARAKAWA und VANN, 1982; SOMPOLINSKY et al., 1985). Stark bekapselte, mukoide Stämme scheinen den Serotypen 1 und 2 anzugehören (ARBEIT et al., 1984; SOMPOLINSKI et al., 1985). Kulturen mit geringerer Bekapselung lassen sich überwiegend den Serotypen 5 und 8 zuordnen (SOMPOLINSKI et al., 1985; HOCHKEPPEL et al., 1987). Auch in klinischen Untersuchungsmaterialien, sowohl vom Menschen als auch von Tieren, insbesondere Rindern, wurden bekapselte *S. aureus*-Kulturen isoliert (GUIDRY et al., 1997; TOLLERSRUD et al., 2000; MOORE und LINDSAY, 2001).

KARAKAWA et al. (1988) berichteten, dass *S. aureus*-Kulturen vom Kapselserotyp 5 oder 8 antiphagozytäre Eigenschaften besaßen und der Phagozytose durch polymorphkernige Humanleukozyten besser widerstanden als unbekapselte Kulturen. In Tierversuchen an Mäusen wurde von FATTOM et al. (1996) der aktive oder passive Schutz vor Infektionen gegen mikrobekapselte *S. aureus*-Kulturen vom Serotyp 5 oder 8 festgestellt. XU et al. (1992) konnten jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Phagozytose mikrobekapselter und unbekapselter *S. aureus*-Kulturen beobachten.

Die für die Typ 5- oder Typ 8-Kapselbildung verantwortlichen Gene *cap5* und *cap8* wurden von SAU et al. (1997) vergleichend untersucht. Strukturell bestehen die Gene *cap5* und *cap8* aus 16 offenen Leserahmen (ORF-A bis -P). Die spezifische Region jedes Gens liegt zwischen den ORF-H bis -K. Die Gene *cap5* und *cap8* sind auf einem 18,1 bzw. 18,5 Kb Fragmentgröße der chromosomalen DNA lokalisiert.

### **2.3.6 Thermonuclease und Hyaluronidase**

Thermonucleasen werden von allen *S. aureus*-Kulturen gebildet, so dass ihr Nachweis als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von *S. aureus* gegenüber anderen Staphylokokkenarten genutzt werden kann (KLOOS und SCHLEIFER, 1986). Bei den *S. aureus*-Nucleasen handelt es sich um Phosphodiesterasen, die an den Polynukleotidketten der DNA und der RNA angreifen und diese in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zu 3'-Phosphomononukleotiden hydrolysieren (HEINS et al., 1967; ANFINSEN et al., 1971). Dies können betroffenen Körperzellen die Zellfunktion stören (BRÜCKLER et al., 1994). Die hitzestabilen Nucleasen widerstehen, laut CUNNINGHAM et al. (1956), selbst minutenlanges Kochen ohne Aktivitätsverlust.

BRAKSTAD et al. (1992) konnten selbst nach einstündigem Kochen bei 100 °C keinen Aktivitätsverlust der Thermonuclease beobachten.

Die Hyaluronidase wird ebenfalls von nahezu allen koagulasepositiven, pathogenen Staphylokokken gebildet (ABRAMSON und FRIEDMAN, 1967; ABRAMSON, 1972; ARVIDSON, 1983). Laut ABRAMSON (1972) bewirkt die Hyaluronidase durch den Abbau saurer Mukopolysaccharide und der Auflösung der interzellulären Kittsubstanz eine Herabsetzung der Gewebeviskosität, wodurch die Ausbreitung der Staphylokokken in Gewebe erleichtert wird.

### **2.3.7 Hämolyse und Toxine**

#### **2.3.7.1 Hämolyse**

Bei Hämolyseinen handelt es sich um membranzerstörende Exotoxine („membrane-damaging-toxins“), die in der Literatur auch als Zytolysine bezeichnet werden (MCCARTNEY und ARBUTHNOTT, 1978). Diese Exosubstanzen schädigen Erythrozyten und andere Zellarten und bewirken bei der Anzucht der Bakterien auf Blutagarplatten unterschiedliche Hämolyse, d.h. unterschiedlich starke Zersetzungen von Erythrozyten. Die Unterscheidung der verschiedenen Hämolyse erfolgt neben der Beurteilung der Art ihrer Hämolyse nach Anzucht auf Blutagarplatten auch aufgrund synergistischer bzw. antagonistischer Wechselwirkungen mit Stoffwechselprodukten anderer Bakterienspezies (SKALKA et al., 1979; HÉBERT und HANCOCK, 1985).

Bei Staphylokokken werden fünf Hämolyse, bezeichnet als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\delta$ -like Hämolyse bzw. Toxin, unterschieden.

Das  $\alpha$ -Hämolyse vermag laut ROLLE und MAYR (1993) die Erythrozyten von Kaninchen, Schaf, Rind und Ziege aufzulösen. Es handelt sich funktionell um ein

hauptsächlich von *S. aureus* gebildetes wasserlösliches Polypeptid mit zytotoxischer Wirkung. Durch die Aneinanderlagerung von sechs Toxinmolekülen wird eine Ringstruktur ausgebildet, welche durch eine Einsenkung in die Zellmembran transmembranale Kanäle bildet und durch das Freisetzen von Ionen ein Platzen der Membran infolge osmotischer Lyse hervorruft (HARSHMAN et al., 1989; BHAKDI und TRANUM-JENSEN, 1991). Das  $\alpha$ -Hämolysin wirkt nicht nur hämolytisch, sondern auch dermonekrotisch und neurotoxisch (ROGOLSKY, 1979). Laut JONSSON et al. (1985) ist das  $\alpha$ -Hämolysin einer der bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus* und kommt bei Tieren häufig in Kombination mit dem  $\beta$ -Hämolysin vor. Für die Bildung des  $\alpha$ -Hämolytins sind das Vorhandensein von Glucose, der pH-Wert und der  $\text{CO}_2$ -Gehalt entscheidend.

Das  $\beta$ -Hämolysin ist das bei tierpathogenen *S. aureus* am häufigsten vorkommende Hämolysin und löst, laut ROLLE und MAYR (1993), die Erythrozyten von Rind, Schaf und Ziege auf. Das  $\beta$ -Hämolysin wird als Sphingomyelinase bezeichnet, da es sich bei diesem Toxin um eine Phospholipase C handelt. Das  $\beta$ -Hämolysin führt zu einer Membranschädigung durch Freisetzen von Phosphorylcholin aus dem Sphingomyelin der Erythrozytenmembran und wirkt somit als Membrangift (FRITSCHKE, 1970; THELESTAM, 1983).

Das  $\gamma$ -Hämolysin gehört zur Gruppe der synergohymenotropen Toxine und besitzt nach Untersuchungen von SUPERSAC et al. (1993) eine starke inflammatorische Wirkung. GUYONNET et al. konnten 1968 bei 23 von 43 *S. aureus*-Kulturen tierischer Herkunft  $\gamma$ -Hämolysin nachweisen. Wie MÖLLBY (1983) berichtete, wird das  $\gamma$ -Hämolysin durch sulfonierte Polymere (Agar, Heparin, Dextran-Sulfat) oder Lipide (Phospholipide, Fettsäuren, Cholesterol) gehemmt.

Bei dem  $\delta$ -Hämolyisin handelt es sich um ein aus 26 hydrophoben Aminosäuren bestehendes Polypeptid (FITTON et al., 1984), welches durch Bildung von Toxin-Hexameren zur Porenbildung in der Membran und somit zur Lyse der Erythrozyten, insbesondere von Mensch und Affe, infolge von Permeabilitätsstörungen führt (MELLOR et al., 1988). Neben seinen hämolytischen und leukozytenzerstörenden Eigenschaften besitzt das  $\delta$ -Hämolyisin, nach WADSTRÖM (1983), ebenfalls zellzerstörende Aktivität und wirkt für bakterielle Protoplasten, Lysosomen, Liposomen und Zellkulturen zytolytisch. MATTSON et al. (1996) und SCHMITZ et al. (1997) entdeckten, dass das  $\delta$ -Hämolyisin einen direkten Einfluss auf die Monozyten hat und die Produktion des „Tumor Necrosis Factor-alpha“ (TNF- $\alpha$ ) induziert. Bei TNF- $\alpha$  handelt es sich um ein Zytokin, welches eine Reihe entzündlicher Veränderungen bis hin zum Schock hervorrufen kann.

### **2.3.7.2 Enterotoxine**

Bei den Staphylokokkenenterotoxinen (SE) handelt es sich, gemeinsam mit dem „Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin (TSST) sowie einigen Streptokokkenexotoxinen, um eine Gruppe unterschiedlicher Stoffwechselprodukte, die Ähnlichkeiten in ihrer Struktur, Funktion und Sequenz aufweisen. Die SE gehören zu einer größeren Gruppe von pyrogenen Toxinen (PT) und können Lebensmittelintoxikationen, den toxischen Schock sowie verschiedene allergische und autoimmune Erkrankungen hervorrufen. Diese PT scheinen *in vivo* die Immunantwort des Wirtsorganismus gegen *S. aureus* zu hemmen. Allen Enterotoxinen gemeinsam ist ihre Manifestation im Verdauungstrakt und ihre Wirkung als Superantigen, d.h. sie führen zu einer unspezifischen T-Zell-Proliferation (BALABAN und RASOOLY, 2000; DINGES et al., 2000). Aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften und unterschiedlichen

Gensequenzen kennt man bislang die Toxine SEA bis SEE und SEG bis SEQ (KURODA et al., 2001; BABA et al., 2002; YARWOOD et al., 2002).

Die SE-Bildung findet überwiegend in der postexponentiellen Wachstumsphase statt, wobei sich ihre Expression durch drei unterschiedliche Regulationssysteme kontrolliert. Jedes Toxin wird als Vorläufer-Toxin in der Bakterienzelle gebildet und mit einer Signalsequenz ausgestattet, welche beim Transport aus der Zelle abgespaltet wird. Die eigentlichen Toxine sind einfache Proteine, die aus einer Polypeptidkette mit einem hohen Gehalt an Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin bestehen und ein Molekulargewicht von 20-30000 Da aufweisen (DINGES et al., 2000). Ein allen SE gemeinsames Strukturmerkmal ist die Schleife („Disulfid-Loop“ oder „Cystin-Loop“), welche durch eine Disulfidbrücke im Zentrum gebildet wird, und deren Aminosäureanzahl und Sequenz bei allen Enterotoxinen verschieden ist (BRÜCKLER et al., 1994).

Weiterhin zeichnen sie sich durch besondere Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Renin und Papain aus. Da die Enterotoxine sehr hitzestabil sind und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischen Enzymen besitzen, werden sie weder nach oraler Aufnahme beim Verdauungsprozess noch beim normalen Kochprozess zerstört. Selbst bei der Herstellung von Vollkonserven kann unter Umständen die biologische Aktivität der Enterotoxine erhalten bleiben. Exakte Voraussagen über die Thermostabilität der Enterotoxine in verschiedenen Lebensmitteln sind nur schwer möglich, da neben Temperaturhöhe und Zeit weitere Faktoren, wie pH-Wert,  $a_w$ -Wert und Zusammensetzung des Lebensmittels, einen wesentlichen Einfluss ausüben (BRÜCKLER et al., 1994).

Die Staphylokokensuperantigene werden durch akzessorische genetische Elemente kodiert, die als Plasmide, Transposons, Prophagen und Pathogenitätsinseln identifiziert wurden. Die Pathogenitätsinseln können ein oder mehrere Staphylokokensuperantigene kodieren (YARWOOD et al., 2002). Bei *S. aureus* wurden 10 Pathogenitätsinseln beschrieben, mit den Bezeichnungen SaPI1 bis 4, SaPI<sub>bov</sub>, SaPI<sub>n1</sub>/SaPI<sub>m1</sub>, SaGI<sub>m</sub>, SaPI<sub>n2</sub>, SaPI<sub>m2</sub>, SaPI<sub>n3</sub>/SaPI<sub>m3</sub> (KURODA et al., 2001; YARWOOD et al., 2002).

SEA stellt nach Untersuchungen von CASMAN (1965) mit 77% das im Rahmen von Lebensmittelvergiftungen in den USA am häufigsten nachgewiesene SE dar, gefolgt von SED (37,5%) und SEB (10%). Laut BALABAN und RASOOLY (2000) hat SEA eine Molekülmasse von 27100 Da und drei verschiedene isoelektrische Punkte (pI). Das Gen *sea* ist auf dem Genom eines temperenten Bakteriophagen lokalisiert, besteht aus 771 Bp und kodiert ein Protein mit 257 Aminosäuren (BETELEY und MEKALANOS, 1985; BETELEY und MEKALANOS, 1988). SEA bindet als Superantigen an MHC-Klasse II-Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen und führt so zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten und Ausschüttung der Zytokine Interleukin (IL1, IL2),  $\gamma$ -Interferon und „Tumor Necrosis Factor“-alpha (TNF- $\alpha$ ) (SVENSSON et al., 1997; BALABAN und RASOOLY, 2000).

SEB hat ein Molekulargewicht von 31400 Da mit 267 Aminosäuren und einen pI von 8,6 (SVENSSON et al., 1997). Das *seb*-Gen besteht aus ca. 900 Bp und ist chromosomalen Ursprungs (SHAFER und IANDOLO, 1978; BALABAN und RASOOLY, 2000). Ein *seb*-tragendes Plasmid wurde ebenso festgestellt (SHALITA et al., 1977). Das *seb*-Gen wurde als ein Element der Pathogenitätsinsel SaPI3 beschrieben (YARWOOD et al., 2002).

Bei den SEC handelt es sich um eine Gruppe von hochkonservierten Proteinen, die immunologische Kreuzreaktionen aufweisen (BERGDOLL et al., 1965; BALABAN und RASOOLY, 2000). BOHACH und SCHLIEVERT (1987), MARR et al. (1993), EDWARDS et al. (1997) sowie SCHAD et al. (1997) beschrieben die SEC Varianten SEC1, SEC2, SEC3, SEC-bovine, SEC-ovine und SEC-canine, die sich in ihrem Molekulargewicht und pI unterschieden. MARR et al. (1993) konnten immunologische Kreuzreaktionen zwischen den drei SEC-Subtypen SEC1, SEC2 und SEC3 aufzeigen und vermuteten die Existenz von fünf weiteren Subtypen mit unterschiedlichen pI. Laut MARR et al. (1993) haben die SEC-Subtypen ein Molekulargewicht von ca. 27500 Da, ihre pI liegen zwischen 7,0 und 8,7. Alle SEC-Subtypen verursachen Lymphozytenproliferationen, stimulieren jedoch unterschiedliche Zellen (MARR et al., 1993). BALABAN und RASOOLY (2000) stellten fest, dass das *sec3*-kodierende Gen aus 801 Bp besteht und ein Protein kodiert, das aus 267 Aminosäuren aufgebaut ist. SEC3 und SEC2 unterscheiden sich in vier Aminosäuren, SEC3 und SEC1 in neun Aminosäuren (BALABAN und RASOOLY, 2000). Das Gen eines neuen Subtyp von SEC, kodiert durch *sec4*, wurde von BABA et al. (2002) als Element der Genominsel vSa3 beschrieben.

SED besteht aus 228 Aminosäuren und hat einen pI bei 7,4 (SVENSSON et al., 1997). BALABAN und RASOOLY (2000) beschrieben für SED eine dreidimensionale Struktur, welche der Struktur der anderen Superantigene ähnelte. Dieses Enterotoxin hat die Fähigkeit, in Anwesenheit von Zinkionen Dimere zu bilden, welche eine große Affinität zur Interaktion mit MHC-Klasse-II Molekülen aufweisen. SED-bildende *S. aureus* besitzen alle ein relativ großes, *sed*-tragendes, penicillinasekodierendes Plasmid. Durch Sequenzierung des Plasmids pIB485 konnte die Sequenz von *sed* ermittelt werden (BAYLES und IANDOLO, 1989), wobei



ein weiteres, erstmalig von ZHANG et al. (1998a) beschriebenes, Enterotoxin-Gen *sej* entdeckt wurde.

SEE hat ein Molekulargewicht von 26425 Da und einen pI bei 8,5. Sequenzanalysen zeigten eine nahe Verwandtschaft zu SED und SEA (VAN DEN BUSSCHE et al., 1993; BALABAN und RASOOL Y, 2000).

Wie in der Arbeit von MUNSON et al. (1998) erstmalig beschrieben, weist SEG ein Molekulargewicht von 27043 Da und SEI ein Molekulargewicht von 24928 Da auf. Dabei ergaben Nukleotidsequenzanalysen für das *seg*-kodierende Gen eine Größe von 777 Bp. Das SEG-Toxin besteht aus 233 Aminosäuren. Das *sei*-kodierende Gen hat eine Größe von 729 Bp. Das SEI-Toxin besteht aus 218 Aminosäuren. Sequenzanalysen ergaben im weiteren Ähnlichkeiten zwischen SEG, SEB und SEC (38 bis 42% Aminosäureähnlichkeit) sowie zwischen SEI, SEA, SEE und SED (26 bis 28% Aminosäureähnlichkeit). ABE et al. beschrieben 2000 das Gen *segv*. Bei diesem Gen handelte es sich um eine *seg*-Variante, welche ein Protein (SEGV) mit 233 Aminosäuren kodiert und 97,7% Ähnlichkeit zu *seg* aufwies.

Das Enterotoxin H (SEH) wurde von SU und WONG (1995) identifiziert und weitergehend charakterisiert. SEH hat ein Molekulargewicht von 27300 Da und einen pI von 5,7. Im Affenversuch hatte das gereinigte SEH in einem Zeitraum von 1,5 bis 3 h nach der Aufnahme eine emetische Wirkung. Dies konnte durch spezifische Antiseren neutralisiert werden. REN et al. (1994) isolierten und charakterisierten SEH aus dem Kulturüberstand einer TSST-1-negativen *S. aureus*-Kultur, welche von einem Patienten mit Toxischem Schock Syndrom gewonnen werden konnte. Das SEH-Antiserum wies keine Reaktion mit SEA, B, C, D, E oder TSST-1 auf. Die Basen- bzw. Aminosäuresequenz des Toxins konnten nach Klonierung und Sequenzierung bestimmt werden. Das *seh*-Gen besteht aus 654 Bp, kodiert ein

Protein mit 218 Aminosäuren und zeigt mit SEE (38%), SEA (37%), SED (37%), SEB (33%) und SEC (27%) Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Eine weitere Charakterisierung der superantigenen Eigenschaften von SEH erfolgte durch NILSSON et al. (1999), HAKANSSON et al. (2000) und PETERSSON et al. (2001). Diese Autoren beschrieben SEH als ein T-Zellmitogen, welches, verglichen mit allen beschriebenen Enterotoxinen, die höchste Affinität zu MHC Klasse II Molekülen besaß. Die Bindung erwies sich als abhängig von der Anwesenheit von Zinkionen.

Bei SEJ handelt es sich um ein aus 269 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 31210 Da mit Ähnlichkeiten zu SEA, E und D. Dieses Toxin wird ebenso wie SED durch ein Plasmid kodiert, auf dem *sed* und *sej* durch eine 895 Bp große Region getrennt sind. 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., 1998a; AKINEDEN et al., 2001).

Die Gen- und Proteinsequenz von *sek* wurde erstmals von LINDSAY et al. (1998) im Rahmen von Untersuchungen der TSST-1-Pathogenitätsinsel SaPI1 veröffentlicht. Dieses Gen wurde auch gemeinsam mit den Genen *sel* und *tst* als Element der Pathogenitätsinsel SaPIbov dargestellt (KURODA et al. 2001). Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch ORWIN et al. (2001). SEK hat ein Molekulargewicht von 25539 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. SEK hatte ähnliche Eigenschaften wie die übrigen SE, erwies sich ebenso als Superantigen und konnte den letalen Effekt von Endotoxin 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 die 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> dargestellt.

SEM wurde 2001 von JARRAUD et al. beschrieben. Im Gegensatz zu SEN und SEO (ehemals SEL und SEK) ist seine Benennung in der Publikation und der Gendatenbank einheitlich. SEM zeigt, im Gegensatz zu SEN und SEO, Ähnlichkeiten in der Basen- und Aminosäuresequenz mit SEI. SEN entspricht dem von JARRAUD et al. (2001) beschriebenen SEK und zeigt Übereinstimmungen in der Basen- und Aminosäuresequenz mit SEA, E, J, D und O (ehemals SEL). SEO entspricht dem von JARRAUD et al. (2001) beschriebenen SEL. Die Basen- und Aminosäuresequenz von SEO (ehemals SEL) zeigt Ähnlichkeiten mit SEA, E, J, D und N (ehemals SEK). KURODA et al. (2001) stellten nach der Sequenzierung des *S. aureus*-Genoms das Gen *sep* als Element der Pathogenitätsinsel SaPI<sub>n2</sub> dar. Das Gen *seq* wurde als Element der Pathogenitätsinsel SaPI<sub>3</sub> beschrieben (YARWOOD et al., 2002).

### **2.3.7.3 „Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin**

Wie die oben erwähnten SE gehört auch das TSST zur Gruppe der pyrogenen Superantigene. Laut BRÜCKLER et al. (1994) ist TSST-1 ein pyrogenes Toxin, welches von 10-29% der untersuchten, vom Menschen isolierten *S. aureus*-Kulturen, gebildet wurde. Über *S. aureus* im Zusammenhang mit dem „Toxic-Shock-Syndrom“ (TSS) wurde erstmals von TODD et al. (1978) berichtet. Unter TSS versteht man

eine akute Krankheit, die verschiedene Organsysteme beeinflussen kann und beim Menschen mit hohem Fieber sowie Haut- und Schleimhautsymptomen (Konjunktivitis, scarlatiniformes Exanthem und später Desquamation) einhergeht. Im weiteren Verlauf kann es zu Bewusstseinstörung, Erbrechen und Diarrhöe sowie zum hypovolämischen Schock kommen. Die Folgen sind Leber- und Nierenschäden bis hin zum Tod. Das erste Auftreten von TSS wurde in den USA bei Frauen im Zusammenhang mit der Menstruation, bzw. hier in Verbindung mit der Benutzung von Tampons beobachtet. Später trat TSS wesentlich häufiger im Rahmen von Infektionskrankheiten und insbesondere nach Wundinfektionen auf. McCORMICK et al. beschrieben 2001 die Pathogenitätsinseln SaPI<sub>bov</sub>, SaPI<sub>1</sub> und SaPI<sub>2</sub>, welche das Gen *tst* beinhalten.

### 2.3.7.4 Exfoliative Toxine A und B

Laut 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. Bisher wurden vier Serotypen beschrieben: ETA, ETB, ETC und ETD (SATO et al., 1994; YAMAGUCHI et al., 2002). Laut SATO et al. (1994) und LADHANI et al. (1999) haben diese vier Toxine ähnliche Molekulargewichte.

ETA und ETB stehen im Zusammenhang mit einer Erkrankung, die als „staphylococcal scaled skin syndrom“ (SSSS) bezeichnet wird. Diese Erkrankung betrifft besonders die Haut von Neugeborenen (exfoliative Dermatitis der Neugeborenen), Kindern oder Patienten mit Immunsuppression oder mit hochgradiger Niereninsuffizienz und hat eine generalisierte Trennung des *Stratum*

*corneum* vom *Stratum spinosum* zur Folge. Das klinische Bild beinhaltet eine Blasenbildung der geröteten Haut, ähnlich einer Verbrühung durch kochendes Wasser und geht mit Fieber einher. Diese Blasen sind mit erregerefreier Flüssigkeit gefüllt und heilen innerhalb von sieben bis 10 Tagen meist narbenfrei ab (PIÉMONT et al., 1988). Untersuchungen von PIÉMONT et al. (1988) ergaben, dass der äußere Anteil der Epidermis bei diesen Läsionen zunächst teilweise noch intakt ist. Nach Berührung zeigte sich jedoch, dass zwischen der Epidermis und den tiefer liegenden elastischen Fasern keine Verbindung mehr besteht. Diese Eigenschaft trägt den Namen „Nikolsky-Zeichen“.

ETA und ETB haben identische biologische Eigenschaften sowie Ähnlichkeiten in den Gensequenzen, unterscheiden sich aber in der Hitzeresistenz. Nach SATO et al. (1994) bleibt ETA bei 100° C für 20 Minuten und ETB bei 60° C für 15 Minuten ohne Aktivitätsverlust. Das *eta*-kodierende Gen ist chromosomal Ursprungs, das *etb*-kodierende Gen dagegen ist an ein Plasmid gebunden. Die Gene *eta* und *etb* zeigen eine Übereinstimmung von 41%. Die genaue Wirkungsweise der ET ist derzeit noch nicht geklärt. Sie gelten als sehr spezie- und gewebespezifisch und reagieren ausschließlich mit keratinisierten Epithelien, die vorzugsweise von neugeborenen Tieren bzw. Menschen stammen. Möglicherweise spalten die ET's die Desmosomen, die normalerweise die Zellen des *Stratum spinosum* der Haut verbinden und vergrößern somit die interzellulären Zwischenräume. Zellläsionen sowie enzymatische oder metabolische Aktivitäten konnten bislang nicht beobachtet werden (JOHNSON et al., 1979; BAILEY et al., 1980; PIÉMONT et al., 1986).

ETC wurde erstmals nach 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 hitzempfindlich. Das *etc*-Gen hat

zu den Genen *eta* und *etb* eine Sequenzähnlichkeit von 12% (YAMAGUCHI et al., 2002).

ETD wurden erstmals nach YAMAGUCHI et al. (2002) als Element einer *S. aureus*-Pathogenitätsinsel beschrieben. 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).

### 2.3.7.5 „Exotoxin-like“-Proteine

Die Erstbeschreibung der SET erfolgte durch WILLIAMS et al. (2000), wobei fünf Gene (*set1-5*) nachweisbar waren. Die Gensequenzen der fünf SET waren nur teilweise ähnlich zu Gensequenzen anderer Staphylokokken- bzw. Streptokokken-Exotoxinen sowie zu TSST-1. KURODA et al. (2001) stellten nach der Sequenzierung des *S.aureus*-Genoms 10 neue SET-Gene vor, die weniger als 90% Aminosäureidentität mit den von WILLIAMS et al (2000) beschriebenen SET-Proteine zeigten.

Die SE und die pyrogenen Streptokokkenexotoxine wurden von WILLIAMS et al. (2000) aufgrund von Sequenzanalysen in drei Gruppen (A bis C) unterteilt. Dabei waren das pyrogene Streptokokkenexotoxin H und TSST-1 wegen geringer Sequenzähnlichkeiten im Vergleich mit den anderen Toxinen nicht in diese drei Gruppen einzuordnen. Die Familie der SET war aufgrund ihrer Gensequenzen ebenso nicht einzuordnen und wurde als Gruppe D klassifiziert (WILLIAMS et al., 2000).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bakterienkulturen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 87 *S. aureus*-Kulturen wurden zwischen Juli 1999 und Oktober 2000 im Rahmen der Routinediagnostik des Forschungszentrums für Mastitis (NUPEMAS-Universidade Estadual Paulista „Júlio de Mesquita Filho“, Campus de Botucatu) aus Proben subklinischer Mastitismilch isoliert. Sie wurden von 87 Kühen aus 23 verschiedenen Betrieben, aus sechs Bezirken der Regionen Bauru und Sorocaba, im Bundesstaat São Paulo, Brasilien, entnommen (Tab. 3-1).

Im weiteren wurden die toxinbildenden *S. aureus*-Referenzkulturen 619/93 (SEA), 62/92 (SEB), 1229/93 (SEC), 1644/93 (SED), FRI 918 (SEE), 161/93 (TSST-1), 114/98 (ETA, ETB) (freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. W. Witte, Robert Koch-Institut, Werningerode), Ly 990055 (SEG, SEI) und Ly 990552 (SEH) (freundlicherweise überlassen von Dr. G. Lina, Centre Nationale des Toxémies à Staphylococques, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, Frankreich), 2724 (SEJ) (freundlicherweise überlassen von Dr. M. Zschöck, Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Gießen), NCTC 6571 (SET1) (freundlicherweise überlassen von Dr. S. P. Nair, Cellular Microbiology Research Group, Division of Surgical Sciences, University College London, England) in die Untersuchung miteinbezogen. Ferner die Staphylokokkenkultur *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* COWAN I (ATCC 12598) sowie der  $\beta$ -hämolisierende *S. aureus*-Stamm PERTSCH (Stammsammlung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen).

Tab. 3-1: Herkunft der 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert im Bundesstaat São Paulo, Brasilien

<b>Region</b>	<b>Bezirk</b>	<b>Betrieb</b>	<b>n</b>
Bauru (I)	Lençóis Paulista (IA)	IA1	2
		IA2	3
		IA3	5
	Areópolis (IB)	IB1	8
		IB2	5
Sorocaba (II)	Pardinho (IIA)	IIA1	15
		IIA2	2
		IIA3	2
		IIA4	2
		IIA5	4
		IIA6	3
	Conchas (IIB)	IIB1	2
		IIB2	1
		IIB3	7
		IIB4	2
		IIB5	1
		IIB6	3
		IIB7	4
	Botucatu (IIC)	IIC1	3
		IIC2	2
IIC3		5	
Avaré (IID)	IID1	2	
	IID2	4	

n = Anzahl der Isolate



## 3.2 Anzüchtungsmedien und Konservierung der Kulturen

### 3.2.1 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte auf Schafblutagarplatten, zu deren Herstellung Blutagar-Basis (Merck, Darmstadt) mit folgender Zusammensetzung verwendet wurde:

Herzextrakt:	10,0 g
Tryptose:	10,0 g
NaCl:	5,0 g
Agar:	15,0 g
Aqua dest.:	1000 ml

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, 15 min bei 120 °C autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 5% aseptisch entnommenem, defibriniertem Schafblut. Die beimpften Nährböden wurden unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37° C inkubiert.

Die Anzüchtung der Bakterien in flüssigem Medium erfolgte in Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI, Oxoid, Wesel). Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Kalbshirninfusion:	12,5 g
Rinderherzinfusion:	5,0 g
Proteose-Pepton:	10,0 g
Glucose:	2,0 g
Natriumchlorid:	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat:	2,5 g
Aqua dest.:	1000 ml

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt, zu je 40 ml in 250 ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt und 15 min bei 121° C autoklaviert. Die

Inkubation der beimpften Kolben erfolgte unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C auf einem Rundschüttler.

Zum Nachweis der Eigenschaften Telluritreduktion, Lipolyse und Proteolyse erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf Baird-Parker Medium (Staphylokokken-Selektivagar nach Baird Parker, Merck) mit folgender Zusammensetzung:

Pepton aus Casein:	10,0 g
Fleischextrakt:	5,0 g
Hefeextrakt:	1,0 g
Natriumpyruvat:	2,0 g
Glycin:	5,0 g
Lithiumchlorid:	2,5 g
Aqua dest.:	1000 ml

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50-45 °C erfolgte die Zugabe von 50 ml Eigelb-Tellurit-Emulsion. 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 im weiteren bei einer positiven Eigelbreaktion, d.h. bei Lipolyse und Proteolyse von einem schmalen weißen Ring umgeben.

Zum Nachweis der Eigenschaften Kochsalztoleranz und Abbau von Mannit unter Säurebildung erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agar (Merck), der sich wie folgt zusammensetzte:

Pepton:	10,0 g
Fleischextrakt:	1,0 g
Natriumpyruvat:	75,0g

---

D(-)-Mannit:	10,0 g
Phenolrot:	2,5 g
Agar:	2,0 g
Aqua dest.:	1000 ml

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und autoklaviert. Die Eigenschaft der Kochsalztoleranz äußerte sich in einem deutlichen Wachstum der Kulturen. Der Abbau von Mannit unter Säurebildung zeigte sich durch einen Farbumschlag des rosafarbenen Nährbodens nach leuchtend gelb.

### 3.2.2 Subkultivierung der Kulturen

Die Bakterienkulturen wurden auf Schafblutagarplatten (3.2.1) angezüchtet, bei 4 °C aufbewahrt und in einem Zeitraum von 6-8 Wochen subkultiviert.

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

Die Beurteilung der Bakterienmorphologie erfolgte nach Gramfärbung lichtmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung.

#### 3.3.1 Nachweis der Katalase

Zum Nachweis des Enzyms Katalase kam der nach BRÜCKLER et al. (1994) beschriebene Objektträgertest zur Anwendung. Hierzu wurden einige Kolonien der zu prüfenden Kultur mit einer sterilen Öse aus dem Flüssigmedium (3.2.1) genommen und auf einem Objektträger mit einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung verrieben. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer deutlichen Bläschenbildung.

### 3.3.2 Pigmentbildung

Die Bildung von Pigment wurde nach Anzüchtung der Kulturen auf Nitrozellulosemembranen (LÄMMLER et al., 1986) überprüft. Dazu wurden die Nitrozellulosemembranen (0,4 µm, Schleicher und Schüll, Dassel) mit einer sterilen Pinzette auf eine Schafblutagarplatte (3.2.1) gelegt und strichförmig mit den zu untersuchenden Bakterien beimpft. Die Beurteilung der Pigmentbildung (weiß, hellgelb, gelb, orange) erfolgte nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37 °C.

### 3.3.3 Nachweis der Koagulasereaktion

Der Nachweis der Koagulasereaktion erfolgte mit Hilfe des Röhrchentests nach der von KLOOS und LAMBE (1991) beschriebenen Methode. Zu 250 µl zitriertem Kaninchenplasma, gewonnen aus sterilem Zitratblut (1 Vol. 4% Natriumzitat zu 9 Vol. Blut) in einer Verdünnung von 1:5 mit einer 0,14 mol/l Natriumchlorid-Lösung, wurden je drei Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen gegeben. Die Beurteilung erfolgte nach einer Bebrütung von vier bzw. 24 h bei 37 °C. Eine positive Reaktion lag vor, wenn ein vollständiges oder überwiegend zusammenhängendes Koagulum zu erkennen war. Als Positivkontrolle diente *S. aureus*-Cowan I, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.3.4 Hämolyseformen

Die unterschiedlichen Hämolyseformen konnten nach Ausstreichen der Kulturen auf Schafblutagarplatten (3.2.2) bzw. nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode untersucht werden. Zur Durchführung von Letzterem wurde eine nach 3.2.1 hergestellte Schafblutagarplatte strichförmig mit einer β-hämolisierenden *S. aureus*-Kultur (Stamm PERTSCH) beimpft. Senkrecht dazu erfolgte ein strichförmiger, bis ca. 5 mm an die Referenzkultur heranreichender

Ausstrich der zu untersuchenden Staphylokokken. Die Beurteilung der Hämolyse war nach einer Inkubation von 18-24 h bei 37° C, nach den von SKALKA et al. (1979) beschriebenen synergistischen und antagonistischen Effekten der Hämolyse zueinander, möglich.

### 3.3.5 Nachweis des Clumping-Factors

Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Factors erfolgte als Objektträgertest mit zitriertem Kaninchenplasma nach CADNESS-GRAVES et al. (1943). Dazu wurden 2-3 Kolonien der nach 3.2.1 angezüchteten Bakterien mittels einer sterilen Öse in einem Tropfen 0,14 mol/l Natriumchlorid-Lösung auf einem Objektträger suspendiert und dann mit einem Tropfen unverdünntem, zitriertem Kaninchenplasma vermischt. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens. Eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien im Plasmotropfen innerhalb von 1-2 min wurde als positive Reaktion gewertet. Als Positivkontrolle diente *S. aureus*-Cowan I, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.3.6 Identifizierung mit Hilfe des „Staphaurex-Plus“ Testsystems

Eine weitere Differenzierung der Kulturen erfolgte mit Hilfe des „Staphaurex-Plus“ Testsystems (Abbott, Wiesbaden). Auf einem Objektträger wurden 2-3 Kolonien der nach 3.2.2 angezüchteten Bakterien in einem Tropfen des Reagenzes, d.h. spezifische beladene Latexpartikel, suspendiert. Der Test dient zum Nachweis des Clumping-Factors, von Protein A und von spezifischen Kapselantigenen von *S. aureus*. Die Reaktion wurde bei indirekter Beleuchtung mit Hilfe eines Lichtkastens beurteilt, wobei eine deutlich erkennbare Agglutination der Bakterien

innerhalb von 1-2 min eine positive Reaktion anzeigte. Als Positivkontrolle diente der Stamm *S. aureus*-Cowan I, als Negativkontrolle *S. epidermidis* ATCC 14990.

### 3.3.7 Weitere Enzymnachweise

#### 3.3.7.1 DNase und Thermonuclease

Der Nachweis des Enzyms DNase erfolgte mit Hilfe des Fertignährmediums „DNase Testagar“ (Difco, Augsburg), der sich wie folgt zusammensetzte:

Tryptose:	20,0 g
Natriumchlorid:	5,0 g
DNA:	2,0g
Agar:	15,0 g
Phenolrot:	2,5 g
Aqua dest.:	1000 ml

Die Anfertigung des Mediums erfolgte nach Herstellerangaben unter Zusatz von 0,1 g Toluidinblau/l (Difco), die Inkubation nach Beimpfung unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C. Da die Staphylokokken-DNase, die im Nährboden enthaltene DNA hydrolytisch spaltet, kommt es zu einer metachromatischen Reaktion und Entfärbung des Toluidinblaus und somit zu einer Bildung von leuchtend rosafarbenen Höfen um die Kolonien des ansonsten blauen Nährmediums.

Der Nachweis der hitzestabilen DNase (Thermonuclease) erfolgte, wie von LACHICA (1976) beschrieben, nach Anzüchtung der Bakterienkulturen auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Difco), der sich wie folgt zusammensetzte:

Caseinpepton:	15,0 g
Sojamehlpepton:	5,0 g

---

Natriumchlorid:	5,0 g
Agar:	15,0 g
Aqua dest.:	1000 ml

Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers angefertigt und nach Inokulation unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei 70 °C folgte die Überschichtung des Nährmediums mit 10 ml durch Erhitzen verflüssigten Toluidinblau-DNA Agar und eine erneute Inkubation für 4 h bei 37 °C. Zum Lösen der DNA wurde das Medium im Dampftopf erhitzt. Der Toluidinblau-DNA Agar (Difco) setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan:	6,05 g
DNA:	0,3 g
Natriumchlorid:	10,0 g
Calciumchlorid-Lösung (0,01 mol/l):	1,0 ml
Toluidinblau-Lösung (0,1 mol/l):	6,0 ml
Agar:	20,0 g
Aqua dest.:	1000 ml

Eine positive Reaktion zeigte sich in der Bildung von leuchtend rosafarbenen Höfen um die Kolonien des ansonsten blauen Nährmediums.

### 3.3.7.2 Hyaluronidase

Die Überprüfung der Hyaluronidasebildung erfolgte mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests. Eine nach [3.2.1](#) hergestellte Schafblutagarplatte wurde S-förmig mit einer mucoid wachsenden Streptokokkenkultur (*S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60) 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 Streptokokkenkultur in der Nähe des Staphylokokken-Impfstrichs. Die in den Agar diffundierte Hyaluronidase hemmte das mucoide Wachstum der Streptokokken.

### 3.3.8 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Zur Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeit der Kulturen kam das vom Deutschen Institut für Normung (DIN 58940 und 58944, Berlin) empfohlene Verfahren zur Anwendung. Hierfür wurden 3-5 Kolonien der zu untersuchenden Kulturen in je 3 ml nach 3.2.1 hergestelltem BHI-Medium inokuliert und für 2 h bei 37 °C bebrütet. Nach Ausspateln von 0,1 ml der Bakteriensuspension auf Müller-Hinton Agar (Oxoid) mit Blutzusatz erfolgte das Auflegen der Antibiotikatestblättchen. Der Müller-Hinton Agar hatte folgende Zusammensetzung:

Fleischinfusion:	5,0 g
Caseinhydrolysat:	17,5 g
Stärke:	1,5 g
Agar:	12,5 g
Aqua dest.:	1000 ml
aseptisch entnommenes, defibriertes Schafblut:	50 ml

Das Nährmedium wurde nach den Angaben des Herstellers gefertigt und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Das Schafblut konnte nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C hinzugegeben werden. Eine Bewertung der in mm gemessenen Größen der Hemmhöfe erfolgte nach den Angaben in Tab. 3-2.



Tab. 3-2: Übersicht über die verwendeten Antibiotikatestblättchen sowie die nach den DIN-Angaben erfolgte Bewertung der gemessenen Hemmhöfe in mm

Antibiotikum	Bewertung		
	Resistent	Intermediär	Sensibel
Gentamicin <sup>1</sup>	≤14	15-20	≥21
Minocyclin <sup>2</sup>	≤14	15-18	≥19
Oxacillin <sup>3</sup>	≤15	-	≥16
Penicillin <sup>4</sup>	≤28	-	≥29
Tetracyclin <sup>5</sup>	≤16	17-21	≥22

<sup>1</sup>Gentamicin GM10 (10 µl), Oxoid; <sup>2</sup>Minocyclin-MH30 (30 µl), Oxoid; <sup>3</sup>Oxacillin-OXA5 (5 µl), Oxoid;

<sup>4</sup>Penicillin G-P10 (10 U), Oxoid; <sup>5</sup>Tetracyclin-TE30 (30 µl), Oxoid

### 3.4 Makrorestriktionanalyse der chromosomalen DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Erstellung eines „DNA-Fingerprinting“ erfolgte eine Präparation der bakteriellen DNA, der Restriktionsverdau und eine anschließende Auftrennung der Fragmente mittels PFGE.

#### 3.4.1 Präparation und Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA

Die Präparation und der anschließende Restriktionsverdau wurden nach einer modifizierten Methode von ANNEMÜLLER (1999) durchgeführt.

Nach Anzucht der zu untersuchenden Kulturen in BHI (3.2.1), anschließendem Abzentrifugieren für 10 min (9500 x g) und Waschen in TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl [pH 8,0], 1 mmol/l EDTA) erfolgte ein Resuspendieren der

Bakterien in TE-Puffer und ein photometrisches Einstellen bei 620 nm (Spectronic 20, Bausch und Lomb, New York) auf 5% Transmission.

Danach wurde die Bakteriensuspension mit 1 %iger „low melting, low gelling“ InCert-Agarose (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) bei 55 °C im gleichen Verhältnis gemischt, in eine Gießkammer (100 µl; BioRad, München) pipettiert und zum Erstarren für 10 min auf Eis inkubiert. Zum Aufschluß der Bakterien wurden die Blöckchen nach dem Erstarren in 200 µl Lysispuffer (6 mmol/l Tris [pH 7,6], 1 mol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA [pH 7,6], 0,5% Brij-58 [Polyoxyethylene-20-Cetyl-Ether; Sigma], 0,2% Natriumdodecylsulfat [Sigma], 0,5% Natriumlauroylsarcosin [Sigma]) unter Zusatz von 5 mg/ml Lysozym (Sigma) und 5 U/ml Lysostaphin (Sigma) für 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zufügen von Proteinase K (Endkonzentration 0,5 µg/ml; Boehringer, Mannheim) zur Deproteinisierung folgte eine Inkubation bei 56 °C im Wasserbad über Nacht. Die Agaroseblöckchen wurden anschließend gewaschen (2 x 30 min in 200 µl TE-Puffer / Blöckchen, inkubiert bei Raumtemperatur) sowie zur Inaktivierung der Proteinase K zweimal mit TE-Puffer unter Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma) in einer Endkonzentration von 1,0 mmol/l für 1 h bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl TE-Puffer pro Blöckchen und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min konnte die präparierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Sma*I für 5h bei 25° C verdaut werden. Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (1 Blöckchen) ca.:	1 µg
Puffer 3 (10x; New England Biolabs, Frankfurt am Main):	20 µl
<i>Sma</i> I (25 U; New England Biolabs):	2 µl
Aqua dest.:	178 µl

### 3.4.2 PFGE

Das Auftrennen der nach 3.4.1 präparierten DNA mittels PFGE erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Dazu wurden 1,1 g Agarose („Molecular Biology Certified“-Agarose, BioRad) in 110 ml 0,5 x TBE-Puffer (45 mmol/l Tris-Basis, 45 mmol/l Borat, 1,0 mmol/l EDTA [pH8,0]) aufgeschmolzen und in eine 13 x 14 x 0,55 mm Flachbettform (BioRad) gegossen. Nach Einsetzen der Blöckchen in die Vertiefungen des Agarosegels und Verschießen der Vertiefungen mit flüssigem 1 %igem Agarosegel (BioRad) in 0,5 x TBE-Puffer fand die Elektrophorese anschließend im CHEF-DR II „Pulsed Field Electrophoresis System“ (BioRad) mit 2 l zuvor auf 14°C gekühltem 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer unter den von SOEDARMANTO (1996) beschriebenen Konditionen statt:

	<u>Lauf I</u>	<u>Lauf II</u>
Spannung	5 V	6 V
Pulszeiten	0,1-11 s (linearer Gradient)	9-40 s (linearer Gradient)
Dauer	8 h	15 h
Temperatur	14 °C	14 °C

### 3.4.3 Etidiumbromidfärbung

Nach der Elektrophorese erfolgte die Dokumentation durch Färbung des Gels für 5 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml, Sigma), wobei sich das fluoreszierende Ethidiumbromid als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA einlagerte. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch 20 minütiges Schwenken in Aqua dest. bei Raumtemperatur entfernt. Die Auswertung und photographische Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht (Gel-Videodokumentationssystem Image Master, VDS, Pharmacia Biotech, Freiburg),

wobei sich die DNA Fragmente als helle Banden vor dunklem Hintergrund darstellten.

#### **3.4.4 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 TENNOVER et al. (1995). Die Restriktionsmuster, die keinen Unterschied zeigten, wurden als gleiche Muster beurteilt, solche mit zwei bis drei unterschiedlichen Fragmenten als Subtyp und Muster 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.

### **3.5 Nachweis *S. aureus*-spezifischer Gene bzw. Genabschnitte und Nachweis von Toxingenen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **3.5.1 DNA-Präparation mit dem „DNeasy Tissue-Kit“**

Zur Präparation der bakteriellen „DNA wurde das DNeasy Tissue-Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet: Die Anzucht der Kulturen erfolgte in BHI-Medium ([3.2.1](#)) für 24 h bei 37 °C auf einem Rundschtüttler. Je 1 ml des bebrüteten Nährmediums wurde in sterile Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und für 10 min (6000 x g) zentrifugiert (Zentrifuge-202MK, Sigma, Taufkirchen).

Das entstehende Sediment musste nun zur Zellwandlyse mit 180 µl TE-Puffer ([3.4.1](#)) unter Zusatz von 3 µl Lysostaphin (1,8 U/µl, Sigma) versetzt und anschließend für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert werden. Nach Zugabe von 25 µl Proteinase K (Qiagen) und 200 µl AL-Puffer (Qiagen) zur Deproteinisierung und guter Durchmischung des Reaktionsgemischs erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h

bei 56 °C im Wasserbad. Das anschließende Erhitzen für 10 min auf 100 °C führte zur Inaktivierung der Proteinase K.

Nach einer kurzen Abkühlphase und der Zugabe von 200 µl 96 %igem Ethanol sowie guter Durchmischung wurde das Reaktionsgemisch durch den DNeasy Filtereinsatz mit Silicamembran (Qiagen) mittels Zentrifugation für 1 min (6000 x *g*) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abfiltriert. Die an die Membran gebundene DNA konnte nun 2 x mit je 500 µl AW-Puffer (Qiagen) gewaschen und dann zunächst für 1 min (6000 x *g*) bzw. nach dem zweiten Waschen für 3 min zum Trocknen der Silicamembran zentrifugiert werden. Der jeweilige Überstand wurde verworfen und 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 (Qiagen) und anschließender Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Das DNA-haltige Eluat konnte nun abzentrifugiert (6000 x *g*) werden und der Elutionsschritt mit 100 µl AE-Puffer zum Gewinnen weiterer DNA wiederholt werden. Die so erhaltene DNA wurde direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20° C aufbewahrt.

### 3.5.2 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR erfolgte die Erstellung eines Mastermix mit folgender Zusammensetzung je Reaktionsansatz:

Primer 1 (10 pmol/l):	1,0 µl
Primer 2 (10 pmol/l):	1,0 µl
dNTP (10 mmol/l, Roth, Karlsruhe):	0,6 µl
Inkubationspuffer (10x, Promega, Mannheim):	3,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mmol/l, Promega):	1,8 µl

---

Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l, Promega):	0,1 $\mu$ l
Aqua bidest.:	20,0 $\mu$ l

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 27,5  $\mu$ l in ein 500  $\mu$ l Reaktionsgefäß überführt und mit je 2,5  $\mu$ l der nach [3.5.1](#) präparierten DNA vermischt. Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen bzw. Thermocycler Techne-Progene, Thermodux, Wertheim) konnten die in [Tab. 3-3](#) beschriebenen Temperaturprogramme gestartet werden.

### **3.5.3 Verwendete Oligonukleotidprimer und Thermocycler-Temperaturprogramme**

Die verwendeten Oligonukleotidprimer, einschließlich ihrer Erstbeschreibung, sind in [Tab. 3.3](#) dargestellt. Im Thermocycler erfolgte 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 4 min Extensionszyklus bei 72 °C, wonach die Proben bis zum Auftragen in ein Gel bei 4 °C aufbewahrt wurden.

### **3.5.4 Agarosegelelektrophorese**

Der Nachweis der Amplikons erfolgte mittels eines 2 %igen Agarosegels. Dazu wurden zunächst 2,4 g Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe) in 120 ml TAE-Puffer (40 mmol/l Tris, 1 % [v/v] Essigsäure, 1 mmol/l EDTA) unter Erhitzen gelöst und in eine Flachbettform gegossen. Nach dem Abkühlen konnte nun je 12  $\mu$ l des PCR-Produktes mit 3  $\mu$ l Probenpuffer (50% Glycerin, 50 mmol/l EDTA, 0,25% Bromphenolblau) vermischt und in das erstarrte Agarosegel pipettiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Horizontalgel für 2,5 h bei 120 mA, wobei als Laufpuffer ebenfalls TAE-Puffer diente. Eine Bestimmung der Größe der PCR-

Produkte ermöglichte ein ebenfalls in das Gel aufgetragener Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot; 100 Bp DNA Ladder, Gibco / BRL, Eggenstein; DNA-Längenstandard VIII, Roche, Mannheim; DNA-Längenstandard VI, Roche).

### **3.5.5 Etidiumbromidfärbung**

Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Darstellung der DNA-Fragmente durch Färbung des Gels nach 3.4.3.

Tab. 3-3: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotidprimer und die verwendeten Thermocyclertemperaturprogramme

Zielgen	Primersequenz (5'-3')	Referenz	Programme <sup>a</sup>
23S rDNA <sup>1</sup>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC / AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	STRAUB et al. (1999)	1
16S-23S rDNA <sup>3</sup>	TCTTCAGAAGATGCGGAATA / TAAGTCAAACGTTAACATACG	FORSMAN et al. (1997)	2
<i>nuc</i> <sup>2</sup>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT / AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	BRAKSTAD et al. (1992)	3
<i>clfA</i> <sup>2</sup>	GGC TTC AGT GCT TGT AGG / TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	STEPHAN et al. (2000)	4
<i>coa</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G / GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	HOOKEY et al. (1998)	5
<i>spa</i> (X-Region) <sup>1</sup>	CAA GCA CCA AAA GAG GAA / CAC CAG GTT TAA CGA CAT	FRÉNAVY et al. (1996)	6
<i>spa</i> (IgG-bindende-Region) <sup>1</sup>	CAC CTG CTG CAA ATG CTG CG / GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC	SEKI et al. (1998)	5
<i>cna</i> (Abschnitt A) <sup>2</sup>	ATA TGA ATT CGA GTA TAA GGA AGG GGT T / TTT GGA TCC CTT TTT CAG TAT TAG TAA CCA	SWITALSKI et al. (1993)	7
<i>cna</i> (Abschnitt B) <sup>2</sup>	AGT GGT TAC TAA TAC TG / CAG GAT AGT TGG TTT A	SWITALSKI et al. (1993)	7
<i>fnbA</i> <sup>2</sup>	GCG GAG ATC AAA GAC AA / CCA TCT ATA GCT GTG TGG	BOOTH et al. (2001)	7
<i>fnbB</i> <sup>2</sup>	GGA GAA GGA ATT AAG GCG / GGA GAA GGA ATT AAG GCG	BOOTH et al. (2001)	7
<i>cap5</i> <sup>2</sup>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG / CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	MOORE und LINDSAY et al. (2001)	8
<i>cap8</i> <sup>2</sup>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG / CAC CTA ACA TAA GGC AAG	MOORE und LINDSAY et al. (2001)	9
<i>agr I</i> <sup>2</sup>	CAC TTA TCA TCA AAG AGC C / CCA CTA ATT ATA GCT GG	MOORE und LINDSAY et al. (2001)	10
<i>agr II</i> <sup>2</sup>	GTA GAG CCG TAT TGA TTC C / GTA TTT CAT CTC TTT AAG G	MOORE und LINDSAY et al. (2001)	11
<i>agr III</i> <sup>2</sup>	CTG CAT TTA TTA GTG GAA TAC G / GTT TCA TTT CTT TAA GAG	MOORE und LINDSAY et al. (2001)	12

<sup>1</sup>Gibco; <sup>2</sup>MWG Biotech, Ebersberg; <sup>3</sup>Roth; <sup>a</sup>1: 37 Zyklen 94 °C - 40 s, 64 °C - 60 s, 72 °C - 75 s; 2: 30 Zyklen 94 °C - 30 s; 55 °C - 30 s; 72 °C - 30 s; 3: 37 Zyklen 94 °C - 60s, 55 °C - 30s, 72 °C - 30s; 4: 35 Zyklen 94 °C - 60 s; 57 °C - 60 s; 72 °C - 60 s; 5: 30 Zyklen 94 °C - 60 s, 58 °C - 60 s, 72 °C - 60 s; 6: 30 Zyklen 94 °C - 60 s, 60 °C - 60 s, 72 °C - 60 s; 7: 30 Zyklen 94 °C - 30 s, 50 °C - 30 s, 72 °C - 60 s; 8: 20 Zyklen 94 °C - 15 s, 57 °C - 15 s, 72 °C - 30 s; 9: 20 Zyklen 94 °C - 15 s, 52 °C - 15 s, 72 °C - 30 s; 10: 20 Zyklen 94 °C - 30 s, 57 °C - 30 s, 72 °C - 60 s; 11: 20 Zyklen 94 °C - 15 s, 60 °C - 15 s, 72 °C - 15 s; 12: 20 Zyklen 94 °C - 30 s, 55 °C - 45 s, 72 °C - 60 s



Fortsetzung Tab. 3-3:

Zielgen	Primersequenz (5'-3')	Referenz	Programme <sup>a</sup>
<i>hla</i> <sup>1</sup>	GGT TTA GCC TGG CCT TC / CAT CAC GAA CTC GTT CG	BOOTH et al. (2001)	13
<i>hlb</i> <sup>1</sup>	GCC AAA GCC GAA TCT AAG / CGC ATA TAC ATC CCA TGG C	BOOTH et al. (2001)	14
<i>sea</i> <sup>1</sup>	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA / GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	TSEN und CHEN (1992)	
<i>seb</i> <sup>1</sup>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG / GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	JOHNSON et al. (1991)	
<i>sec</i> <sup>1</sup>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT / AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	JOHNSON et al. (1991)	
<i>sed</i> <sup>1</sup>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT / TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	JOHNSON et al. (1991)	
<i>see</i> <sup>1</sup>	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC / TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	JOHNSON et al. (1991)	15
<i>seg</i> <sup>1</sup>	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C / AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	JARRAUD et al. (1999)	
<i>seh</i> <sup>1</sup>	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG / CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C	JARRAUD et al. (1999)	
<i>sei</i> <sup>1</sup>	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G / AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C	JARRAUD et al. (1999)	
<i>sej</i> <sup>2</sup>	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG / CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	MONDAY und BOHACH (1999)	16
<i>tst</i> <sup>1</sup>	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA / TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	JOHNSON et al. (1991)	
<i>eta</i> <sup>1</sup>	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA / TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT	JOHNSON et al. (1991)	15
<i>etb</i> <sup>3</sup>	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TT / TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA	JOHNSON et al. (1991)	
<i>set</i> <sup>13</sup>	GGT TAA TTC ATA GCG CAG TAT C / CAA CGT TTC ATC GTT AAG CTG C	vorliegende Arbeit <sup>b</sup>	17

<sup>1</sup>Gibco; <sup>2</sup>MWG Biotech, Ebersberg; <sup>3</sup>Roth; 13: 20 Zyklen 94 °C - 10 s, 53 °C - 10 s, 72 °C - 30 s; 14: 20 Zyklen 94 °C - 10 s, 62 °C - 10 s, 72 °C - 30 s; 15: 30 Zyklen 94 °C - 120 s, 55 °C - 120 s, 72 °C - 60 s; 16: 30 Zyklen 94 °C - 60 s, 62 °C - 60 s, 72 °C - 60 s; 17: 20 Zyklen 94 °C - 30 s, 56 °C - 30 s, 72 °C - 60 s; <sup>b</sup>Quelle der Sequenz: AF094826

### 3.5.6 „Multiplex-PCR“

Der gemeinsame Nachweis der Enterotoxin G-, H-, I und J-kodierenden Gene *seg*, *seh*, *sei* und *sej* und des 16S rRNA-Gens wurde nach MONDAY UND BOHACH (1999) mittels „Multiplex PCR“ durchgeführt.

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

seg-Primer 1 (10 pmol/l, MWG Biotech, Ebersberg):	0,6 µl
seg-Primer 2 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,6 µl
seh-Primer 1 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,8 µl
seh-Primer 2 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,8 µl
sei-Primer 1 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,6 µl
sei-Primer 2 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,6 µl
sej-Primer 1 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,6 µl
sej-Primer 2 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,6 µl
16S rDNA-Primer 1 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,8 µl
16S rDNA-Primer 2 (10 pmol/l, MWG Biotech):	0,8 µl
dNTP (10 mmol/l, Roth):	0,8 µl
Inkubationspuffer (10x, Sigma):	2,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl, Sigma):	0,2 µl
Aqua bidest.:	9,2 µl

Nach gründlicher Durchmischung des Mastermixes wurden 19 µl in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und mit je 1,0 µl der nach [3.5.1](#) präparierten DNA vermischt.

Die verwendeten Oligonukleotidprimer für die „Multiplex-PCR“ sind in Tab. 3.4 dargestellt. Nach Einsetzen der Proben in den Thermocycler erfolgte nach 3.5.3 eine initiale Denaturierung der DNA. Danach kam das folgende Temperaturprogramm zur Anwendung:

- 15 Zyklen: Denaturierungstemperatur: 95 °C, 60s

Anlagerungstemperatur der Primer: 68 °C, 45s

Verlängerungstemperatur der Primer: 72 °C, 60s

- 16 Zyklen: Denaturierungstemperatur: 95 °C, 60s

Anlagerungstemperatur der Primer: 64 °C, 45s

Verlängerungstemperatur der Primer: 72 °C, 60s

Tab. 3-4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer nach MONDAY und BOHACH (1999)

Zielgen	Primername	Primersequenz
16S rDNA	16S I	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC
	16S II	CGC ACA TCA GCG TCA G
<i>seg</i>	seg I	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G
	seg II	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG
<i>seh</i>	seh I	CAA CTC CTG ATT TAG CTC AG
	seh II	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG
<i>sei</i>	sei I	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT AC
	sei II	CAG GCA GTC CAT CTC CTG
<i>sej</i>	sej I	siehe <u>Tab. 3-3</u>
	sej II	

Der Nachweis der Amplikons erfolgte nach der unter 3.5.4 beschriebenen Methode. Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt und die Ergebnisse dokumentiert (3.4.3).

### **3.6 Statistische Methoden**

Die Signifikanz des Auftretens von Virulenzgenen, Exoproteingenen und der drei Klassen der *agr*-Gene wurde mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher geprüft. Die Zusammenhänge zwischen Abstammungslinien und den untersuchten Genen wurde mit der Methode der multiplen Regression durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung des Programmes GraphPad InStat Version 3.00 für Windows 95, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Ein Ergebnis mit einer statistischen Signifikanz von  $p < 0,001$  wurde als hochsignifikant, mit  $p < 0,01$  als signifikant, mit  $p < 0,05$  als schwach signifikant und mit  $p = 0.05$  als nicht signifikant bewertet.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Phänotypische Eigenschaften**

Bei allen 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen handelte es sich um Gram-positive, unregelmäßig angeordnete Kokken die sowohl auf Schafblutagar als auch auf Staphylokokken-Selektivnährmedien (3.2.1) wuchsen. Auf dem Staphylokokken-Selektivmedium nach Baird-Parker bildeten alle Isolate, aufgrund einer positiven Telluritreduktion, kleine, schwarze, glänzende, gewölbte Kolonien mit einem Durchmesser von 1-5 mm. Innerhalb der Isolate waren 16 (18,4%) Kulturen von einem klaren Hof umgeben, was auf das Lipolysevermögen der Kulturen hindeutete, 71 (81,6%) Kulturen wiesen keine vergleichbare Reaktion auf.

Desweiteren wurden die Eigenschaften Kochsalztoleranz und Mannitvergärung mit Hilfe des Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agars (3.2.1) geprüft. Alle 87 Kolonien wuchsen auf diesem Nährboden in Gegenwart von 7,5% Natriumchlorid, wobei sich der Abbau von Mannit unter Säurebildung durch eine deutliche Gelbfärbung des Anzuchtungsmediums zeigte. Alle untersuchten Isolate erwiesen sich dabei als mannitpositiv.

Der Nachweis des Enzyms Katalase erfolgte nach der unter 3.3.1 beschriebenen Methode. Alle 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen zeigten eine positive Reaktion mit einer deutlichen Bläschenbildung.

Die Bildung von Pigment wurde nach Anzuchtung der Bakterien auf Nitrozellulosemembranen (3.3.2) beurteilt. Dabei zeigten 20 (23,0%) Kulturen ein hellgelbes Pigment, 26 (29,9%) Kulturen ein gelbes Pigment, sechs (6,9%) Kulturen ein oranges Pigment und eine (1,2%) Kultur ein apricotfarbenes Pigment. Die verbleibenden 34 (39,0%) Kulturen waren unpigmentiert

Zur weiteren Charakterisierung der Isolate wurde die Koagulaseaktivität im Röhrchentest (3.3.3) untersucht. Alle 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen zeigten innerhalb von 24 h eine Koagulation des Plasmas und somit eine positive Reaktion.

Die Unterscheidung der Hämolyseformen erfolgte nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode. Dabei zeigten 13 (14,9%) Kulturen eine  $\alpha$ -Hämolyse, welche sich als breite, vollständige Hämolysezone um den Staphylokokken-Impfstrich darstellte und zwei (2,3%) Kulturen eine  $\beta$ -Hämolyse, welche sich als breite Zone einer unvollständigen Hämolyse um den Impfstrich darstellte. Das gemeinsame Auftreten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse konnte bei 71 (81,6%) *S. aureus*-Kulturen festgestellt werden. Eine (1,2%) Kultur wies eine  $\delta$ -like-Hämolyse auf, die sich nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode im Bereich des *S. aureus*- $\beta$ -Hämolysins als halbmondförmige Zone einer vollständigen Hämolyse darstellte.

Der Nachweis des zellgebundenen Clumping-Factors erfolgte nach 3.3.5 als Objektträgertest mit zitriertem Kaninchenplasma. Alle 87 Kulturen erwiesen sich als Clumping-Factor-positiv.

Im weiteren diente das „Staphaurex Plus“ Testsystem (3.3.6) zur Differenzierung der *S. aureus*-Isolate. Alle 87 Kulturen zeigten eine deutliche Agglutinationsreaktion mit den beladenen Latexpartikeln und somit eine positive Reaktion.

Mit dem nach 3.3.7.1 beschriebenen DNase-Testagar war der Nachweis des Enzyms DNase und nach Erhitzung des Anzuchtungsmediums der Nachweis der Staphylokokken-Thermonuclease möglich. Alle *S. aureus*-Kulturen erwiesen sich, vor und nach Erhitzung, als positiv, was sich als Rosafärbung um die Kolonien des

ansonsten blauen Nährmediums zeigte. Im weiteren war das Enzym Hyaluronidase (3.3.7.2) bei allen 87 Kulturen nachweisbar.

Alle 87 *S. aureus*-Kulturen wurden nach der unter 3.3.8 beschriebenen Agardiffusionsmethode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den unter 3.3.8 beschriebenen Antibiotika untersucht. Alle 87 *S. aureus*-Kulturen erwiesen sich als empfindlich gegenüber Minocyclin, Oxacillin und Tetracyclin und als intermediär gegenüber Gentamicin. Für Penicillin waren 11 (10,3%) Kulturen empfindlich und 76 (87,4%) Kulturen resistent.

#### **4.2 Ergebnisse des „DNA-Fingerprinting“**

Die Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA mittels PFGE erfolgte mit den unter 4.1 aufgeführten 87 *S. aureus*-Kulturen, die Präparation der DNA sowie der Restriktionsverdau wie unter 3.4 beschrieben.

Nach Auftrennung der Fragmente der 87 *S. aureus*-Kulturen durch PFGE konnten nach 3.4.4 26 DNA-Restriktionsmuster (MA1-MA7, MB1-MB4, MC1 und MC2, MD1 und MD2, ME1-ME6, MF, MG, MH, MI1 und MI2) unterschieden werden. Die 26 DNA-Restriktionsmuster ließen sich zu neun Abstammungslinien (LA-LI) zusammenfassen. Die vorherrschenden Abstammungslinien LA (Muster MA1-MA7) und LE (Muster ME1-ME6) waren mit 63 (72,2%) Kulturen in allen sechs Bezirken des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, nachweisbar. Die sporadischen Abstammungslinien LB (Muster MB1-MB4), LC (Muster MC1 und MC2), LD (Muster MD1 und MD2), LF (Muster MF), LG (Muster MG), LH (Muster MH) und LI (Muster MI1 und MI2) waren bei 24 (27,8%) Kulturen feststellbar.

Die Restriktionsmuster der neun Abstammungslinien (LA-LI) und die Restriktionsmuster von acht *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus dem Betrieb IB1, sind in Abb. 4-1 und 4-2 dargestellt. Eine Dendrogrammanalyse der 26 DNA-*Sma*I-

Restriktionsmuster bzw. der neun Abstammungslinien ist in Abb. 4-3 dargestellt. Die Verteilung der neun PFGE-Abstammungslinien innerhalb der 87 *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus sechs verschiedenen Bezirken, sind der Tab. 4-1 zu entnehmen. Eine Landkarte, die die Verteilung der neun Abstammungslinien der 87 *S. aureus*-Isolate innerhalb der sechs verschiedenen Bezirke der Regionen Bauru und Sorocaba des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, zeigt, ist in Abb. 4-4 dargestellt.

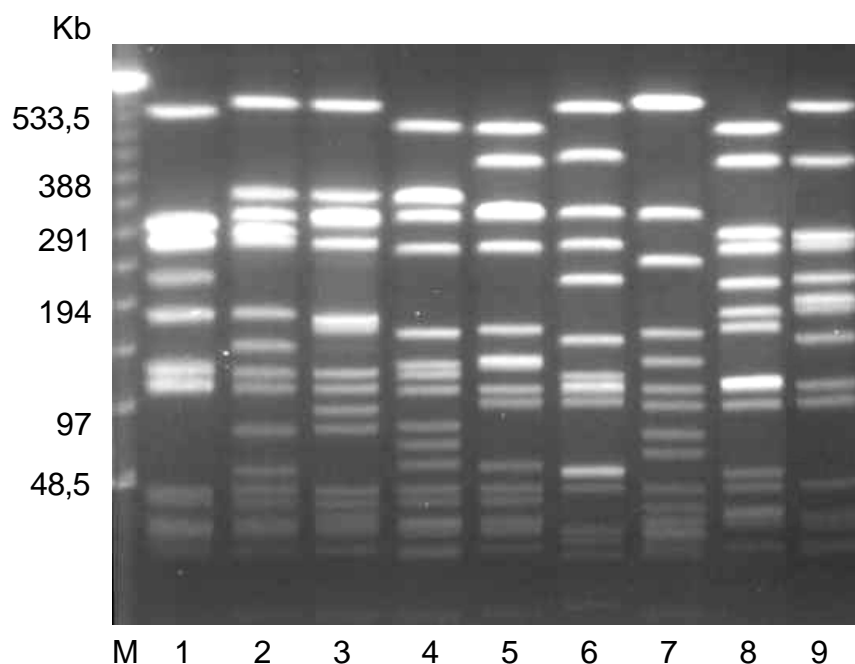


Abb. 4-1: Unterschiedliche *Sma*I-Makrorestriktionsmuster der chromosomalen DNA von neun *S. aureus*-Kulturen, mit den Abstammungslinien LA (1 = Muster MA1), LB (2 = Muster MB1), LC (3 = Muster MC1), LD (4 = Muster MD1), LE (5 = Muster ME1), LF (6 = Muster MF), LG (7 = Muster MG), LH (8 = Muster MH) und LI (9 = Muster MI1). Als Längenstandard dienten „low range“ PFGE Marker (0,1-200 Kb) und Lambda Ladder PFGE Marker (50-1000 Kb) (beide Sigma).



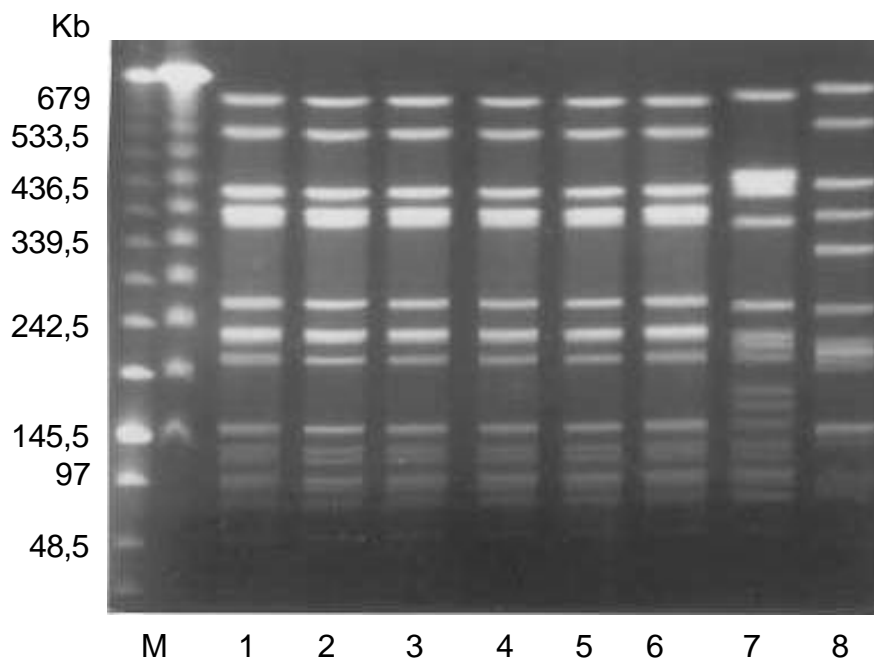
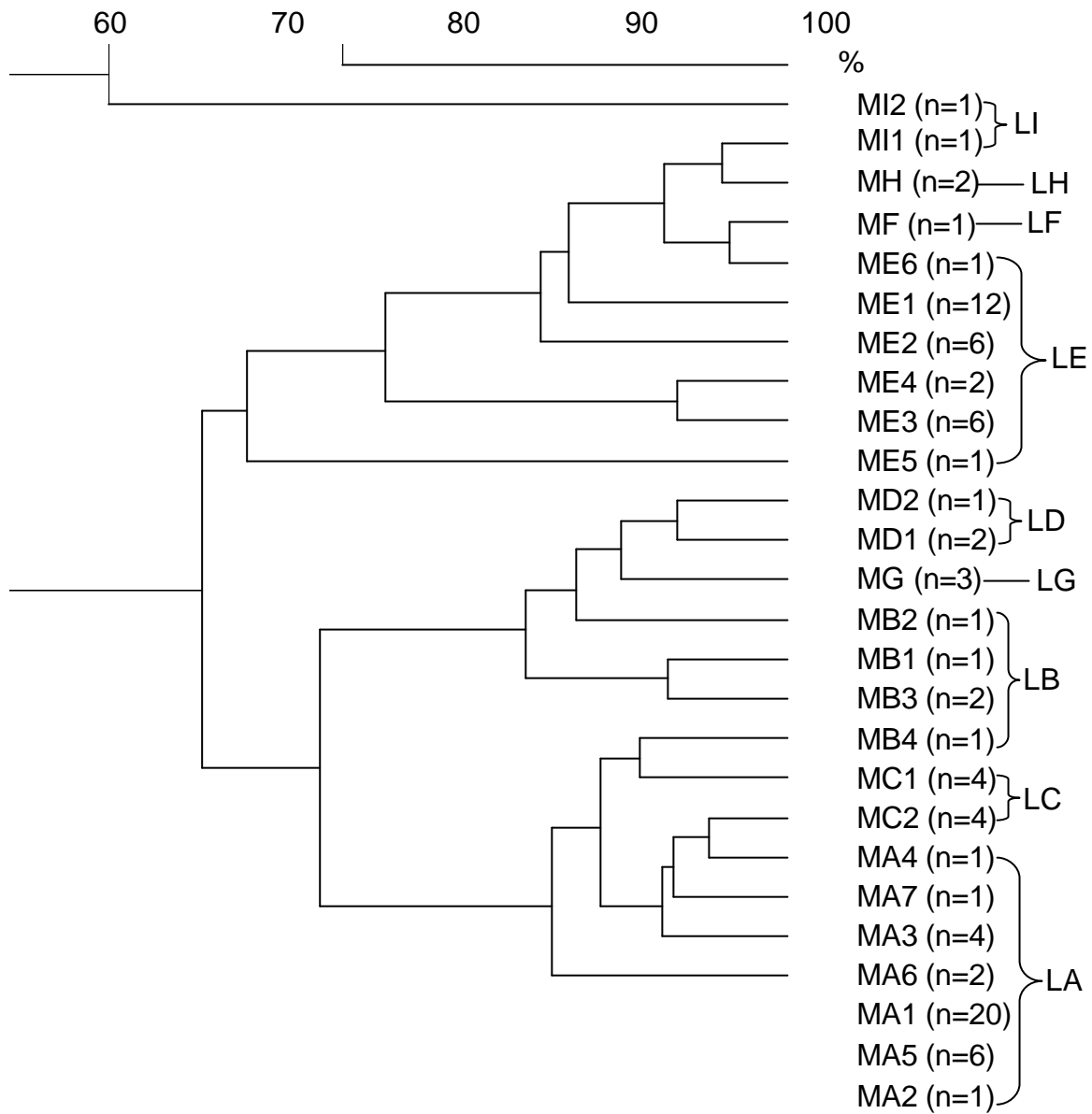


Abb. 4-2: *SmaI*-Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA von acht *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus dem Betrieb IB1, mit den Abstammungslinien LE (1 bis 6 = Muster ME3), LD (7 = Muster MD2) und LF (8 = Muster LF); Längenstandard: siehe Abb. 4-1



n = Anzahl der Isolate

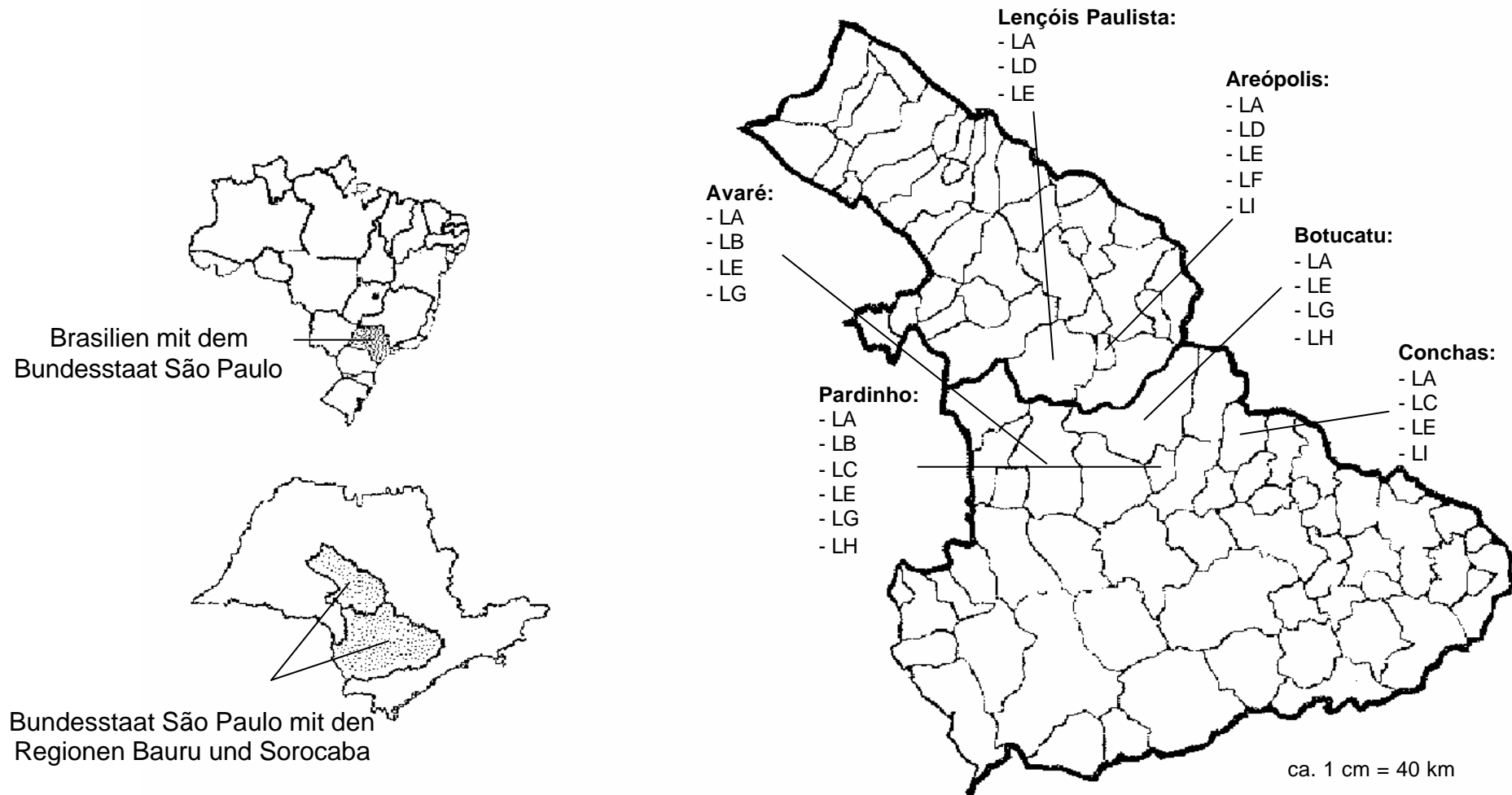
**Abb. 4-3:** Dendrogrammanalyse der 26 DNA-*SmaI*-Restriktionsmuster und Darstellung der neun abgrenzbaren Abstammungslinien

Tab. 4-1: Verteilung der neun Abstammungslinien innerhalb der 87 *S. aureus*-Kulturen aus sechs verschiedenen Bezirken des Bundesstaats São Paulo, Brasilien.

Bezirk	Abstammungslinien								
	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI
IA	3* (30,0 <sup>a</sup> ; 3,4 <sup>b</sup> )	-**	-	2 (20,0; 2,2)	5 (50,0; 5,7)	-	-	-	-
IB	3 (23,1; 3,4)	-	-	1 (7,7; 1,2)	6 (46,1; 6,9)	1 (7,7; 1,2)	-	-	2 (15,4; 2,3)
IIA	20 (71,4; 23,0)	1 (3,6; 1,2)	1 (3,6; 1,2)	-	4 (14,2; 4,6)	-	1 (3,6; 1,2)	1 (3,6; 1,2)	-
IIB	4 (20,0; 4,6)	3 (15,0; 3,4)	7 (35,0; 8,0)	-	6 (30,0; 6,9)	-	-	-	-
IIC	2 (20,0; 2,2)	-	-	-	6 (60,0; 6,9)	-	1 (10,0; 1,2)	1 (10,0; 1,2)	-
IID	3 (50,0; 3,4)	1 (16,7; 1,2)	-	-	1 (16,7; 1,2)	-	1 (16,7; 1,2)	-	-
Σ	35 (40,0 <sup>b</sup> )	5 (5,8)	8 (9,2)	3 (3,4)	28 (32,2)	1 (1,2)	3 (3,4)	2 (2,3)	2 (2,3)

\*Anzahl der Isolate; \*\*Kein Isolat; <sup>a</sup>% der Isolate innerhalb des jeweiligen Bezirks; <sup>b</sup>% der Isolate innerhalb der 87 untersuchten *S. aureus*

Abb. 4-4: Verteilung der neun Abstammungslinien der 87 *S. aureus*- Kulturen innerhalb der sechs verschiedenen Bezirke aus den Regionen Bauru und Sorocaba im Bundesstaat São Paulo, Brasilien.



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

Eine weitergehende Identifizierung und Charakterisierung der untersuchten Kulturen erfolgte durch PCR-vermittelte Nachweise speziesspezifischer Genabschnitte (3.5).

Die Amplifizierung eines *S. aureus*-spezifischen Abschnitts des 23S rRNA-Gens mit den unter 3.5.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab für alle 87 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1250 Bp (Abb. 4-5).

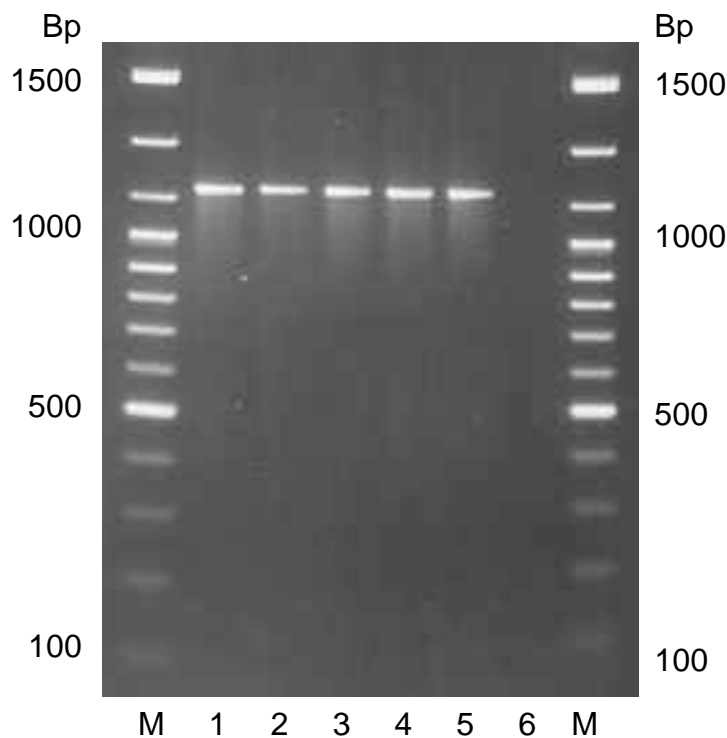


Abb. 4-5: Typische Amplikons des 23S rRNA-Gens einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IB2 mit einer Größe von 1250 Bp (1 bis 5); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas.

Die Amplifizierung der 16S-23S rDNA-„intergenic spacer region“ (ISR) (3.5.3) ergab für 40 (46,0%) der untersuchten Kulturen ein Amplikon mit der Größe von 520 Bp, für zwei (2,3%) Kulturen zwei Amplikons mit einer Größe von 520 und 380 Bp, für 15 Kulturen (17,2%) ein Amplikon mit einer Größe von 420 Bp und für zwei (2,3%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 380 Bp. Bei 28 (32,2%) Kulturen konnte mit den verwendeten Oligonukleotidprimern keine positive PCR-Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 4-6).

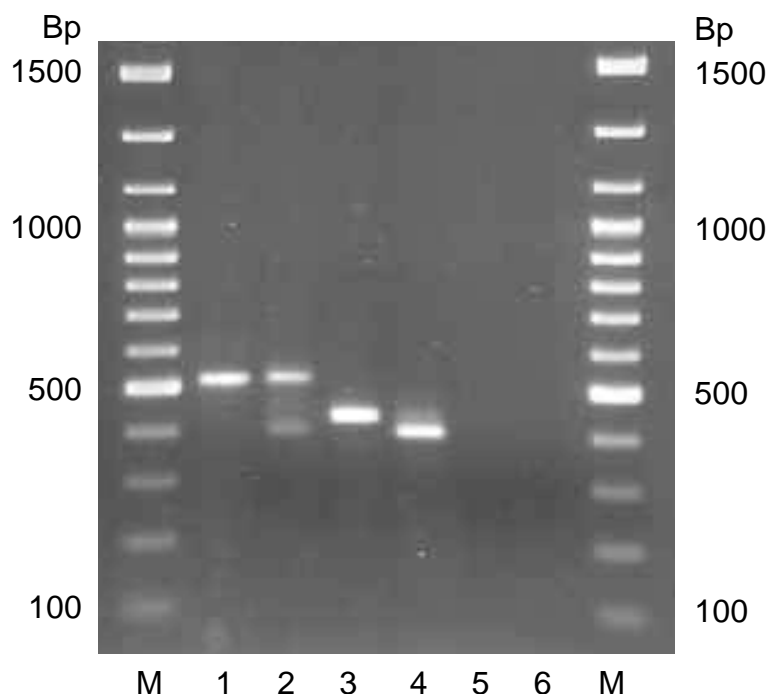


Abb. 4-6: Amplikons der 16S-23S rDNA-ISR einiger *S. aureus*-Kulturen aus den Betrieben IB1 (1), IIC1 (2), IIA1 (3) und IB1 (4), mit Größen von 520 Bp (1), 520 und 380 Bp (2), 420 Bp (3) und 380 Bp (4); fehlende Reaktion einer *S. aureus*-Kultur aus dem Betrieb IIA4 (5) und des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-5.

Im weiteren erfolgte die Amplifizierung des *S. aureus*-Thermonuclease-Gens *nuc* (3.5.3). Dies ergab bei alle 87 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 280 Bp.(Abb. 4-7).

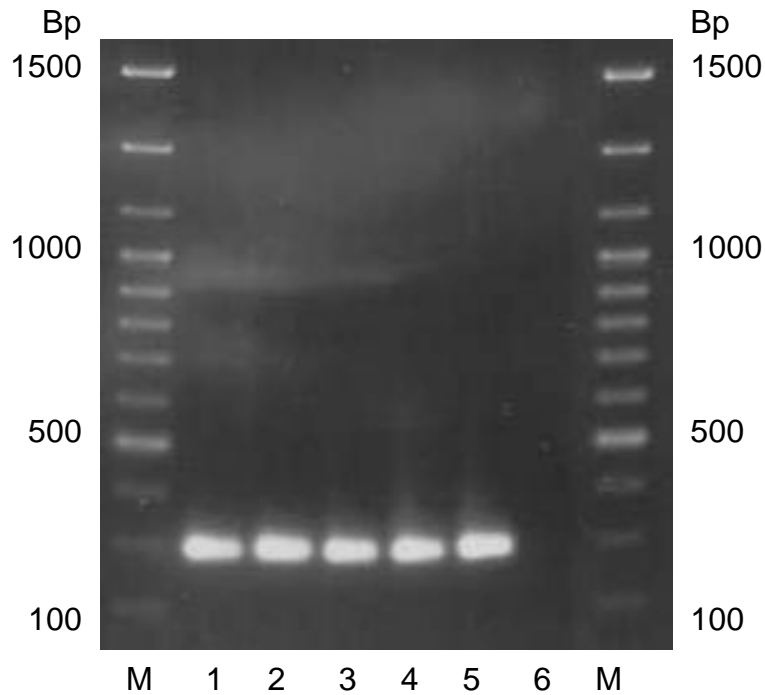


Abb. 4-7: Typische Amplikons des Thermonuclease-Gens *nuc* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IIC3 mit einer Größe von 280 Bp (1 bis 5); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-5.

Die Amplifizierung des Gens *clfA* mit den unter 3.5.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab bei 86 (98,9%) der untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 1000 Bp und bei einer (1,2%) Kultur eine Größe von 900 Bp (Abb. 4-8).

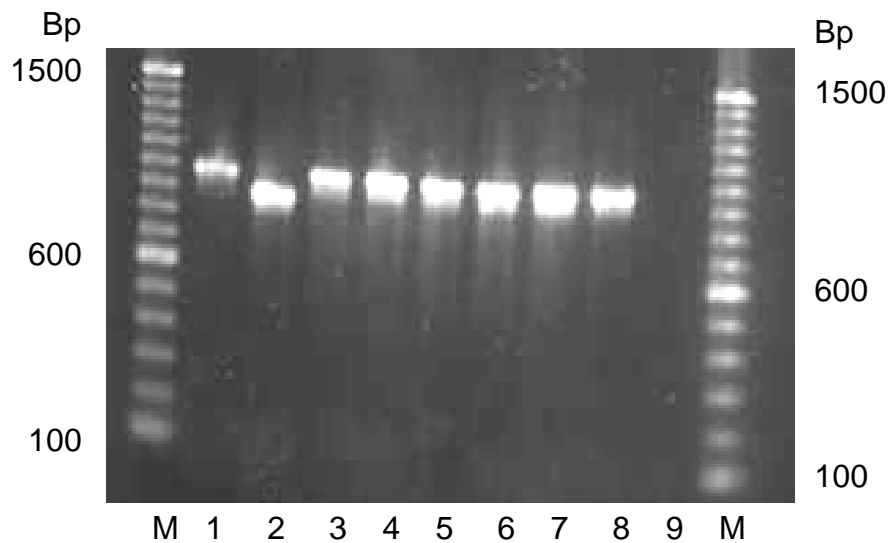


Abb. 4-8: Amplikons des Clumping-Factor-Gens *clfA* von acht *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IIA1 mit Größen von 1000 Bp (1 und 3 bis 8) und 900 Bp (2); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (9); M = 100 Bp DNA Ladder, Gibco BRL.



Bei allen 87 *S. aureus*-Isolaten der vorliegenden Untersuchungen war im weiteren nach 3.5.3 eine Amplifizierung des Gens *coa* möglich. Hierbei traten Genpolymorphismen auf. Die Abb. 4-9 zeigt in schematischer Darstellung den Aufbau des Gens *coa* und die Ansatzstellen der von HOOKEY et al. (1998) beschriebenen Oligonukleotidprimer *coa* 1 und *coa* 2.

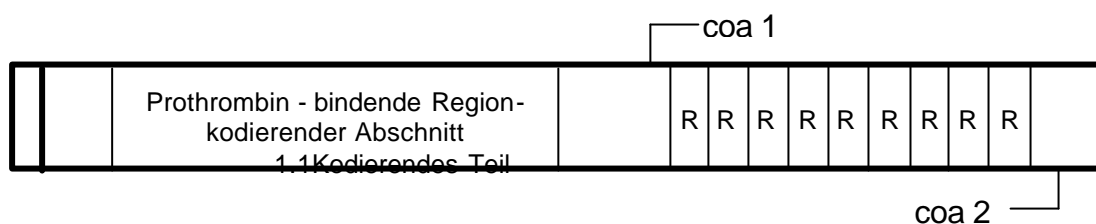


Abb. 4-9: Schematische Darstellung des Koagulase-kodierenden Gens *coa* nach Angaben von KAIDA et al. (1989) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer nach HOOKEY et al. (1998)

Wie aus Abb. 4-9 ersichtlich, ergibt sich bei Verwendung der Oligonukleotidprimer *coa* 1 und *coa* 2 ein Amplikon, das sich aus sich wiederholenden Einheiten (R), im folgenden als „Repeats“ bezeichnet, und einem konstanten Anteil des Gens *coa* zusammensetzt. Die Größe der einzelnen Anteile des amplifizierten Fragments konnte anhand der von KAIDA et al. (1989) veröffentlichten Sequenz der *S. aureus*-Kultur 213 (Genbanknummer X16457) ermittelt werden und ergibt eine Größe von 81 Bp für ein „Repeat“ und eine Größe von 150 Bp für den konstanten Anteil.

Bei der Amplifizierung des *coa*-Gens war bei zwei (2,3%) *S. aureus*-Isolaten ein Amplikon mit einer Größe von 500 Bp, entsprechend vier „Repeats“, bei 36 (41,3%) *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 590 Bp, entsprechend fünf „Repeats“, bei 34 (39,1%) *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 660 Bp, entsprechend sechs „Repeats“, bei 14 (16,1%) *S. aureus*-Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 820 Bp, entsprechend acht „Repeats“ und bei einer (1,2%) *S. aureus*-Kultur ein Amplikon mit einer Größe von 900 Bp, entsprechend neun „Repeats“, nachweisbar (Abb. 4-10).

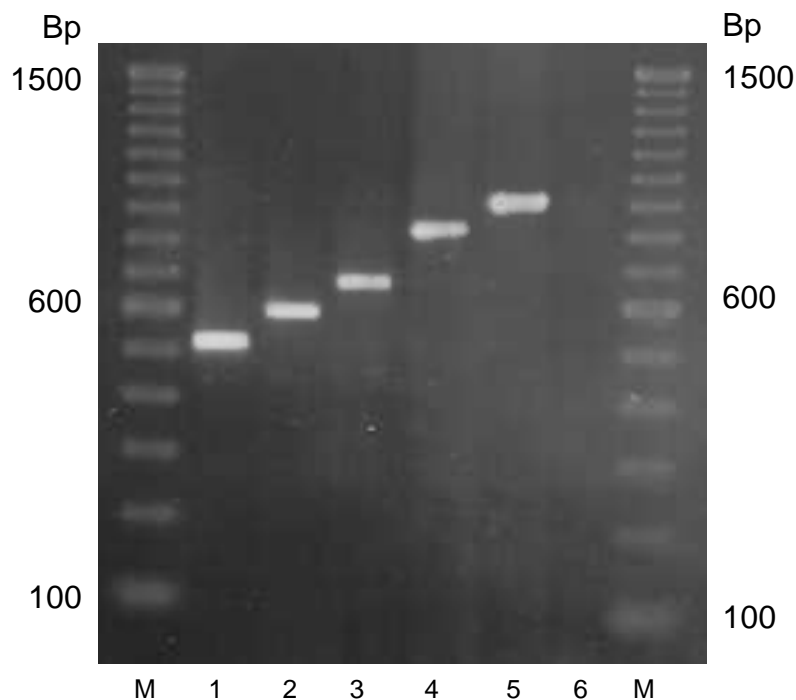


Abb. 4-10: Typische Amplikons des Koaguase-Gens *coa* von fünf *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 500 Bp (1), 590 Bp (2), 660 Bp (3), 820 Bp (4) und 900 Bp (5). Die Größe der Amplikons entspricht vier (1), fünf (2), sechs (3), acht (4) und neun „Repeats“ (5); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-8.

In weitergehenden Untersuchungen konnte bei allen 87 Kulturen der die X-Region und der die IgG-bindende Region-kodierenden Teil des Protein A-Gens *spa* (3.5.3) nachgewiesen werden. Diese Genabschnitte zeigten ebenfalls Genpolymorphismen. Strukturell besteht das Protein A-Gen *spa* aus verschiedenen Abschnitten. So werden nach UHLÉN et al. (1984) Genabschnitte unterschieden, die die Signal-Sequenz (S), die fünf IgG-bindenden Einheiten (E, D, A, B und C), mit Größen von 171 Bp (E), 183 Bp (D), 174 Bp (A), 174 Bp (B) und 174 Bp (C) sowie die X-Region, kodieren. Der den zellwandassoziierten Bereich des Protein-A kodierende Genabschnitt besteht aus einem Anteil (Xr) sich wiederholender Einheiten, der aus einer unterschiedlichen Anzahl (3 bis 15) 24 Bp großer Einheiten, im folgenden als „Repeats“ bezeichnet, besteht und einem als Xc bezeichneten Anteil, der das C-terminale Ende, funktionell den Membrananker des Protein A, kodiert (UHLÉN et al. 1984) (Abb. 4-11).

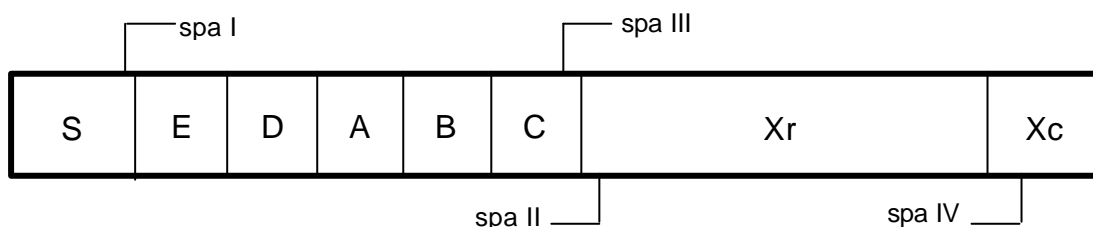


Abb. 4-11: Schematische Darstellung des Protein A-kodierenden Gens *spa* nach den Angaben von UHLÉN et al. (1984) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer *spa* I und II nach SEKI et al. (1998) und der Oligonukleotidprimer *spa* III und IV nach FRÉNEY et al. (1996). Kodierende Abschnitte für die Signal-Sequenz (S), die IgG-bindenden Einheiten (E, D, A, B, C), den sich wiederholenden Einheiten Anteil der X-Region (Xr) und des C-terminalen Endes der X-Region (Xc).

Bei der Amplifizierung des die X-Region-kodierenden Teils des Gens *spa* wiesen 35 (40,2%) der untersuchten Isolate ein Amplikon mit einer Größe von 100 Bp, entsprechend zwei „Repeats“, zwei (2,3%) Kulturen, ein Amplikon mit einer Größe von 130 Bp entsprechend drei „Repeats“, eine (1,2%) Kultur ein Amplikon mit einer Größe von 180 Bp, entsprechend fünf „Repeats“, vier (4,6%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 220 Bp, entsprechend sieben „Repeats“, drei (3,4%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 250 Bp, entsprechend acht „Repeats“, eine (1,2%) Kultur ein Amplikon mit einer Größe von 270 Bp, entsprechend neun „Repeats“, 36 (41,3%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 290 Bp, entsprechend 10 „Repeats“, vier (4,6%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 310 Bp, entsprechend 11 „Repeats“ und eine (1,2%) Kultur ein Amplikon mit einer Größe von 340 Bp, entsprechend 12 „Repeats“, auf (Abb. 4-12).

Bei der Amplifizierung des die IgG-bindende-Region-kodierenden Teils des Gens *spa* wiesen acht (9,2%) der untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 720 Bp, entsprechend vier IgG-bindenden Einheiten und 79 (90,8%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 920 Bp, entsprechend fünf IgG-bindenden Einheiten, auf (Abb. 4-13).

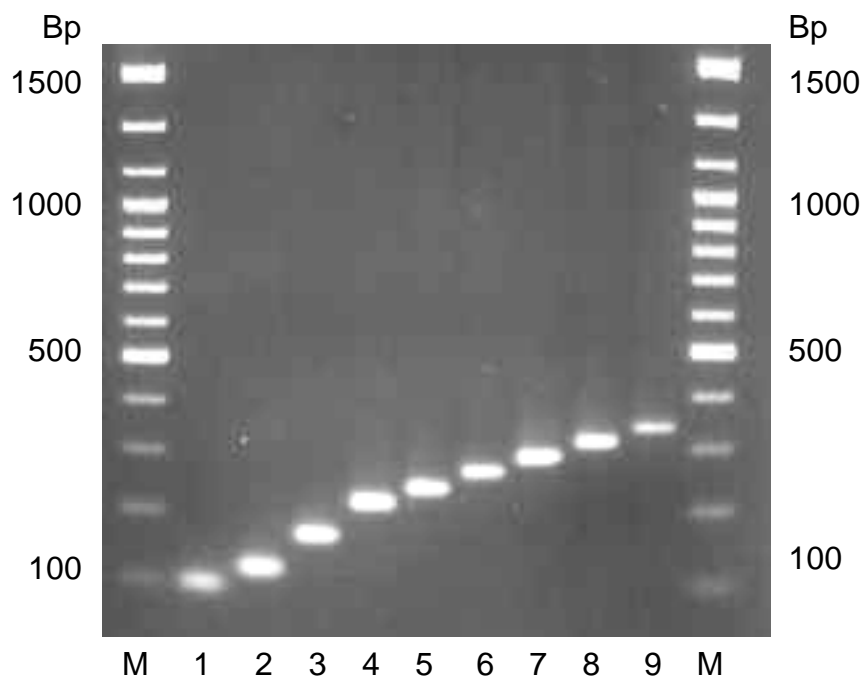


Abb. 4-12: Typische Amplikons des die X-Region-kodierenden Teils des Gens *spa* von neun *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 100 Bp (1), 130 Bp (2), 180 Bp (3), 220 Bp (4), 250 Bp (5), 270 Bp (6), 290 Bp (7), 310 Bp (8) und 340 Bp (9). Die Größe der Amplikons entspricht zwei (1), drei (2), fünf (3), sieben (4), acht (5), neun (6), 10 (7), 11 (8) und 12 „Repeats“ (9); M = siehe Abb. 4-5.

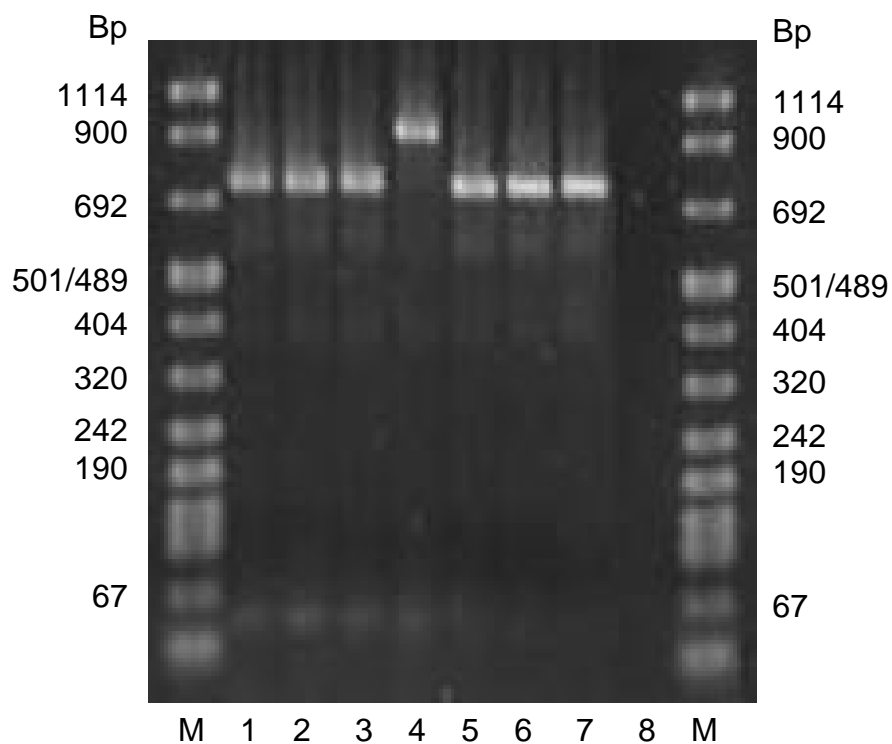


Abb. 4-13: Amplikons des die IgG-bindende-Region-kodierenden Teils des Gens *spa* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IIB3 mit Größen von 720 Bp (1 bis 3 und 5 bis 7) und 920 Bp (4). Die Größe der Amplikons entspricht vier IgG-bindenden Einheiten (1 bis 3 und 5 bis 7) und fünf IgG-bindenden Einheiten (4); fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (8); M = DNA-Längenstandard VIII, Roche.

Die Abb. 4-14 zeigt in schematischer Darstellung den Aufbau des CNA-kodierenden Gens *cna* und die Ansatzstellen der von SWITALSKI et al. (1993) beschriebenen Oligonukleotidprimer *cna* I, III, IV und V. Strukturell besteht das Gen *cna* aus verschiedenen Abschnitten. So werden nach den Angaben von PATTI et al. (1992) Genabschnitte unterschieden, die die Signal-Sequenz (S), einen konstanten Abschnitt (A), mit einer Größe von 1700 Bp, einen aus sich wiederholenden Einheiten bestehenden Abschnitt (B), mit einer Größe von 600 Bp je „Repeat“, sowie die Zellwanddomäne (W), Zellmembrandomäne (M) und das C-terminale Ende (C), kodieren.

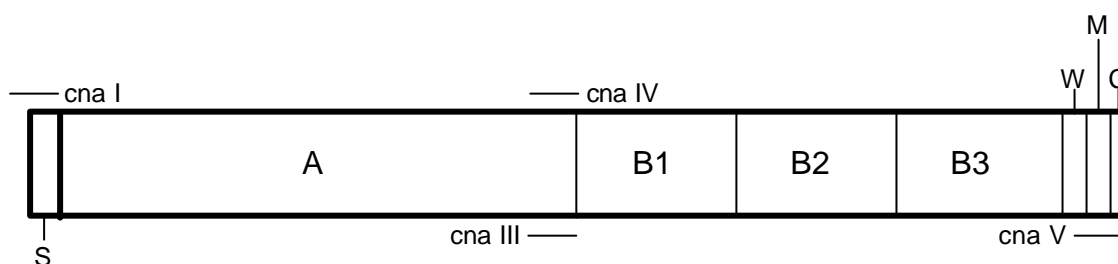


Abb. 4-14: Schematische Darstellung des Gens *cna* nach den Angaben von PATTI et al. (1992) sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer *cna* I, III, IV und V nach SWITALSKI et al. (1993). Kodierende Abschnitte für die Signal-Sequenz (S), einen konstanten Abschnitt (A), mit einer Größe von 1700 Bp, einen aus sich wiederholenden Einheiten bestehenden Abschnitt (B), mit einer Größe von 600 Bp je „Repeat“, sowie die Zellwanddomäne (W), Zellmembrandomäne (M) und das C-terminale Ende (C), kodieren.

Die unter (3.5.3) beschriebenen Oligonukleotidprimer ermöglichten eine Amplifizierung der Abschnitte A und B des CNA-kodierenden Gens *cna* bei neun (10,3%) Kulturen. Die Amplifizierung des Abschnitt A des Gens *cna* ergab eine einheitliche Größe von 1700 Bp (Abb. 4-15). Bei der Amplifizierung des Abschnitts B des Gens *cna* war bei sechs (6,9%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 1700 Bp, entsprechend drei „Repeats“, bei zwei (2,3%) Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 1200 Bp, entsprechend zwei „Repeats“ und bei einer (1,2%) Kultur ein Amplikon mit einer Größe von 600 Bp, entsprechend einem „Repeat“, nachweisbar (Abb. 4-16).

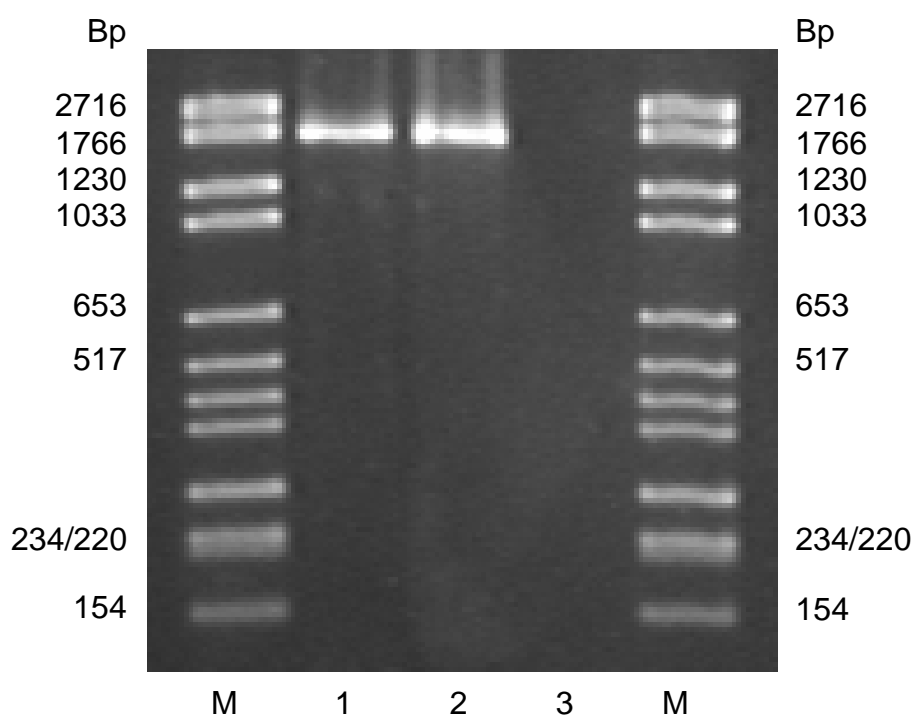


Abb. 4-15: Typische Amplikons des Abschnitts A des CNA-kodierenden Gens *cna* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 1700 Bp; 1 = Referenzstamm-Ly 990055; 2 und 3 = *cna*-positive und *cna*-negative *S. aureus*-Isolate aus dem Betrieb IID1; M = DNA-Längenstandard VI, Roche



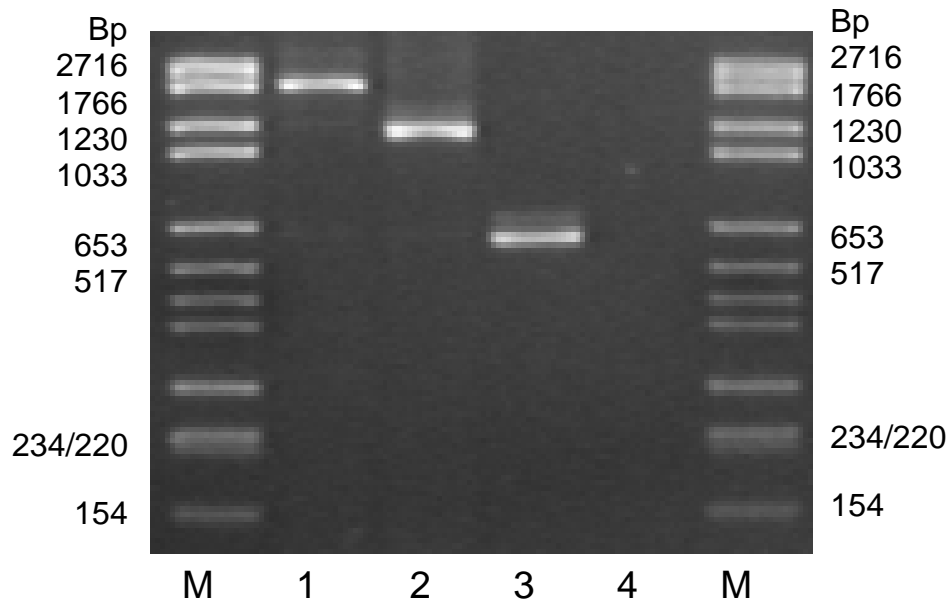


Abb. 4-16: Typische Amplikons des Abschnitts B des CNA-kodierenden Gens *cna* einiger *S. aureus*-Kulturen mit Größen von 1700 Bb (1), 1200 Bb (2) und 600 Bp (3). Die Größe der Amplikons entspricht drei (1), zwei und ein „Repeat“; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (4); M = siehe Abb. 4-15.

Die Amplifizierung des FnBPA-kodierenden Gens *fnbA* ergab für alle 87 untersuchten Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1280 BP. Bei der Amplifizierung des FnBPB-kodierenden Gens *fnbB* wiesen 37 (42,5%) isolate eine Größe von 820 Bp auf, 50 (57,5%) Kulturen waren negativ (Abb. 4-17).

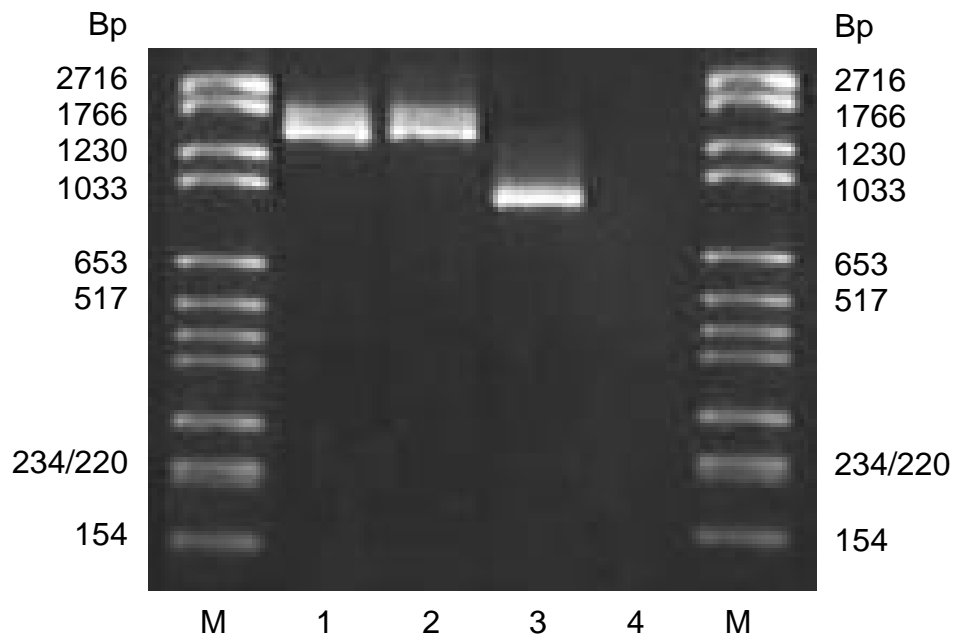
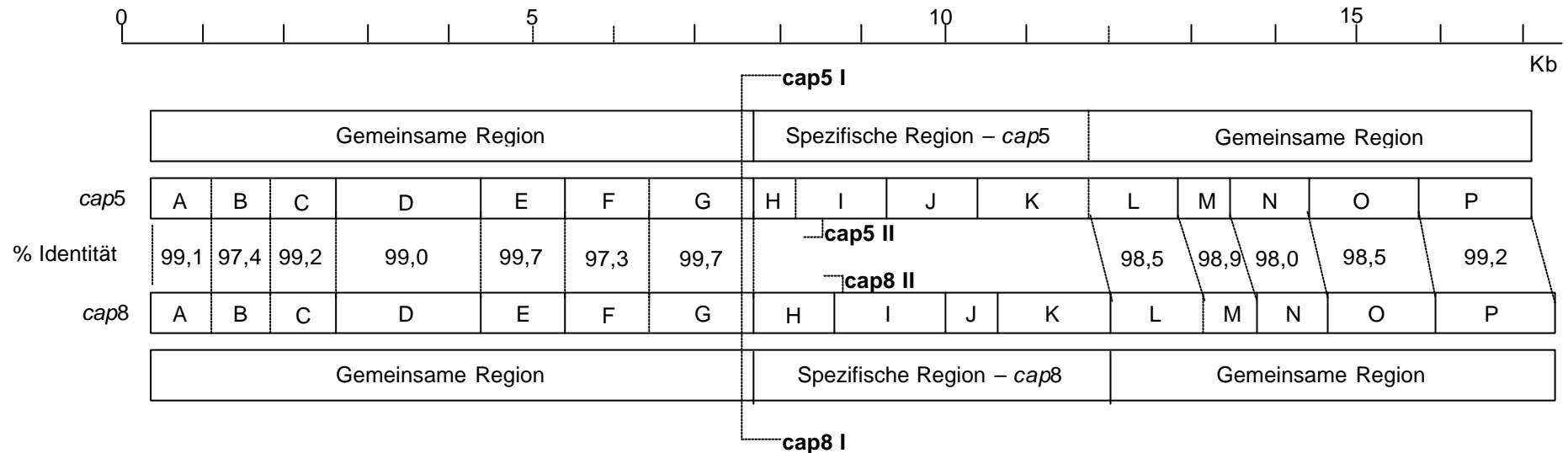


Abb. 4-17: Amplikons der FnBP-kodierenden Gene *fnbA* und *fnbB* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IA2 unter Verwendung der *fnbA*-Gen-spezifischen Primer *fnbA* 1 und 2 mit einer Größe von 1280 Bp (1 und 2) und der *fnbB*-Gen-spezifischen Primer *fnbB* 1 und 2 mit einer Größe von 820 Bp (3); 4 = *fnbB* negative Kultur desselben Betriebs; M = siehe Abb. 4-15.

Die Abb. 4-18 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus der Polysaccharidkapsel Typ 5- und Typ 8-kodierenden Gene *cap5* und *cap8* nach den Angaben von SAU et al. (1997) sowie Ansatzstellen der von MOORE und LINDSAY (2001) beschriebenen Oligonukleotidprimer *cap5* I und II und *cap8* I und II. Strukturell bestehen die *cap5* und *cap8*-Gene aus 16 ORF (A bis P). Die spezifische Region liegt in dem Bereich, der die ORF-H bis –K kodiert.

Der Nachweis der für die Polysaccharidkapsel Typ 5- und Typ 8-kodierenden Genabschnitte mit den unter 3.5.3 beschriebenen Oligonukleotidprimern zeigte für das *cap5*-Gen bei 11 (12,6%) Isolaten eine positive Reaktion (Abb. 4-19) und für das *cap8*-Gen bei 76 (87,4%) Isolaten eine positive Reaktion (Abb. 4-20).



**Abb. 4-18:** Vergleich der Gene *cap5* und *cap8* nach Angaben von SAU et al. (1997), sowie Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer nach MOORE und LINDSAY (2001). Beide Gene bestehen aus 16 ORF (A bis P), wobei 12 ORF (A bis G und L bis P) nahezu identisch sind. Innerhalb des Genabschnitts, der die ORF-H bis -K kodiert, sind die jeweils spezifischen Regionen beider Gene und die Ansatzstellen der Primer cap5 I und II und cap8 I und II, lokalisiert.

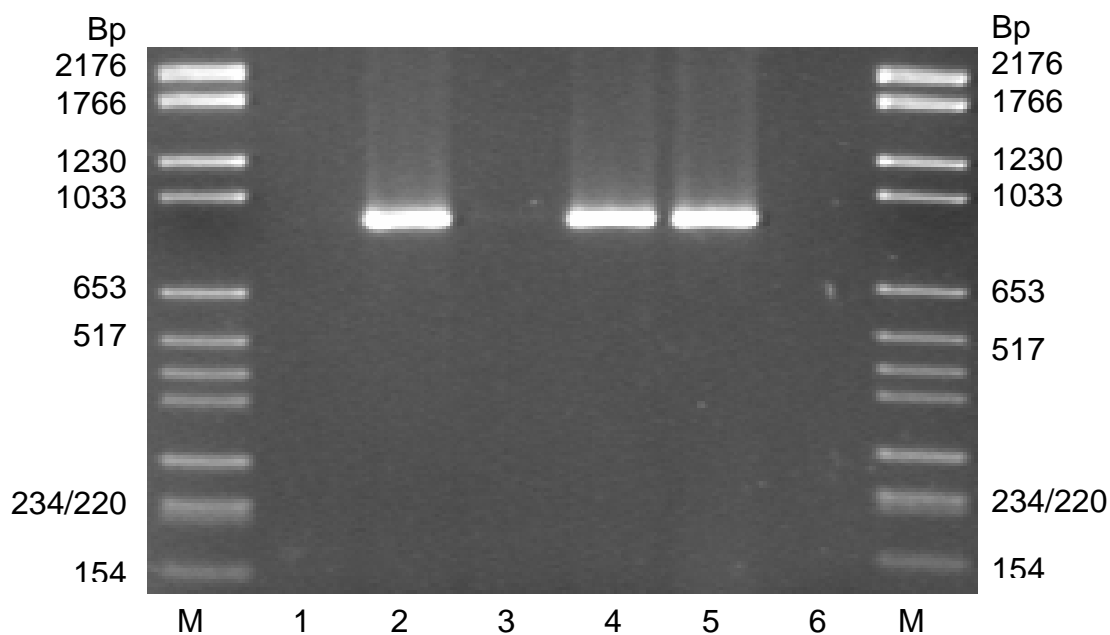


Abb. 4-19: Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 5-kodierenden Gens *cap5* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IB2 mit einer Größe von 900 Bp (2, 4 und 5); 1 und 3 = *cap5*-negative Kulturen desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-15

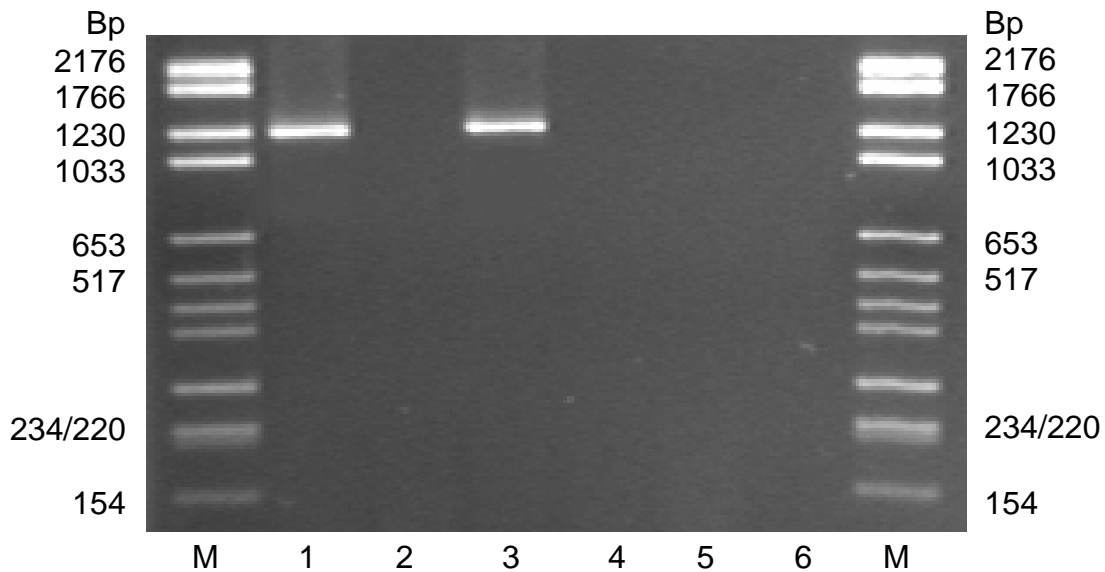
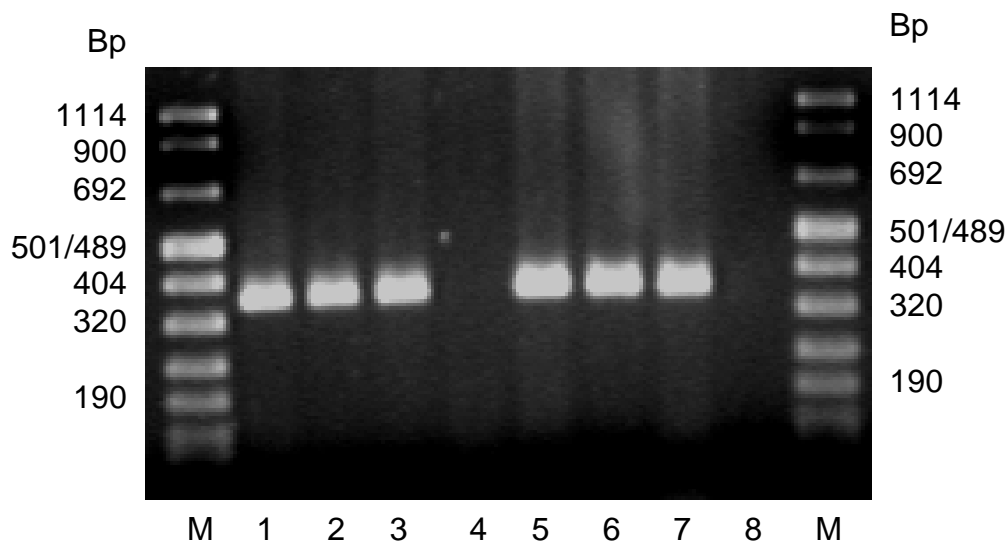


Abb. 4-20: Amplikons des Polysaccharidkapsel Typ 8-kodierenden Gens *cap8* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IB2 mit einer Größe von 1200 Bp (1 und 2); 2, 4 und 5 = *cap8*-negative Kulturen desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-15.

Mit den unter [3.5.3](#) beschriebenen *agrI* bis III-Gen spezifischen Oligonukleotidprimern war bei 13 (14,9%) Kulturen das Gen *agrI* mit einer Größe von 360 Bp, bei 63 (72,4%) Kulturen das Gen *agrII* mit einer Größe von 470 Bp und bei drei (3,5%) Kulturen das Gen *agrIII* mit einer Größe von 560 Bp nachweisbar ([Abb. 4-21](#), [4-22](#) und [4-23](#)). Acht (9,2%) Kulturen erwiesen sich mit allen drei Oligonukleotidprimerpaaren als negativ.



[Abb. 4-21](#): Amplikons des *agrI*-Gens einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IIB3 mit einer Größe von 360 Bp (1 bis 3 und 5 bis 7); 4 = *agrI*-negative Kultur desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (8); M = siehe [Abb. 4-13](#).

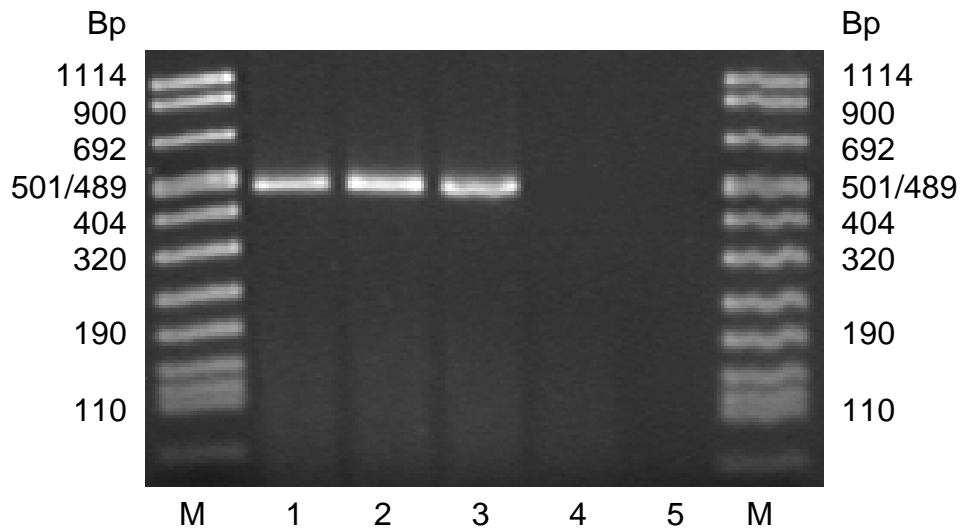


Abb. 4-22: Amplikons des *agrII*-Gens einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IID2 mit einer Größe von 470 Bp (1 bis 3); 4 = *agrII*-negative Kultur desselben Betriebs; negative Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (5); M = siehe Abb. 4-13

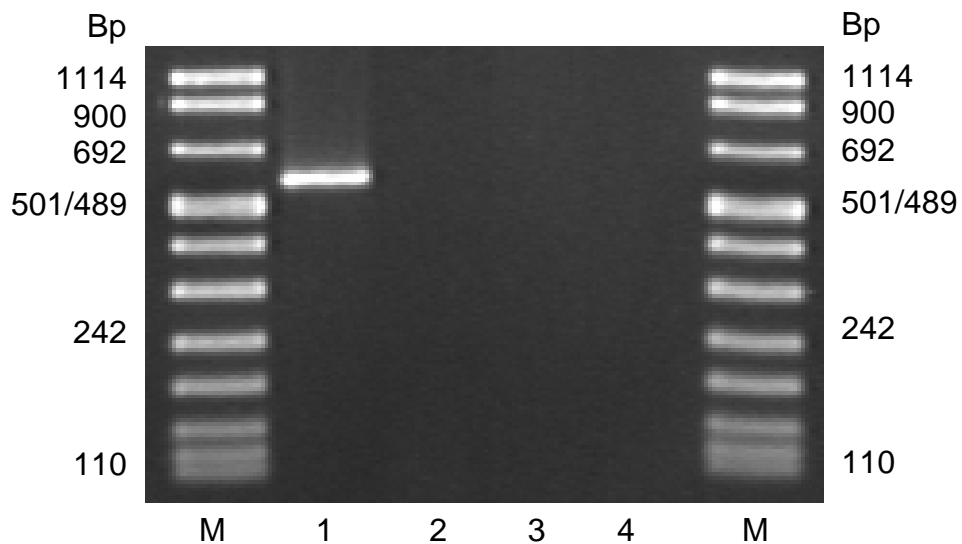


Abb. 4-23: Amplikon des *agrIII*-Gens einer *S. aureus*-Kultur aus dem Betrieb IIC1 mit einer Größe von 560 Bp (1); 2 und 3 = *agrIII*-negative Kulturen desselben Betriebs; 4 = Negative Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (4); M = siehe Abb. 4-13.



Die *S. aureus*-Kulturen wurden ferner hinsichtlich der Hämolysingene *hla* und *hlb*, der Enterotoxingene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* und *sej*, sowie hinsichtlich des Gens *tst*, das das „Toxic-Shock-Syndrom“ Toxin (TSST-1) kodiert, und der Gene *eta*, *etb*, die die Exfoliativen Toxine A und B (ETA und ETB) kodieren und des Gens *set1*, das ein SET kodiert, untersucht.

Der Nachweis der für das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysin verantwortlichen Gene ergab für *hla* bei 86 (98,9%) Kulturen und für *hlb* bei 84 (96,6%) Kulturen eine positive Reaktion (Abb. 4-24 und Abb. 4-25).

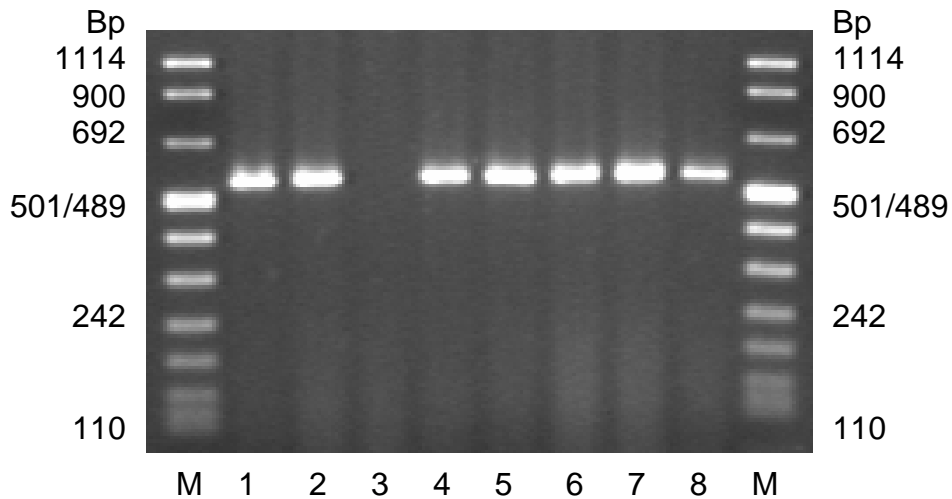


Abb. 4-24: Typische Amplikons des Gens *hla* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IB1 mit einer Größe von 550 Bp (1 und 2 und 4 bis 8); fehlende Reaktion einer *S. aureus*-Kultur desselben Betriebs (3); M = siehe Abb. 4-13.

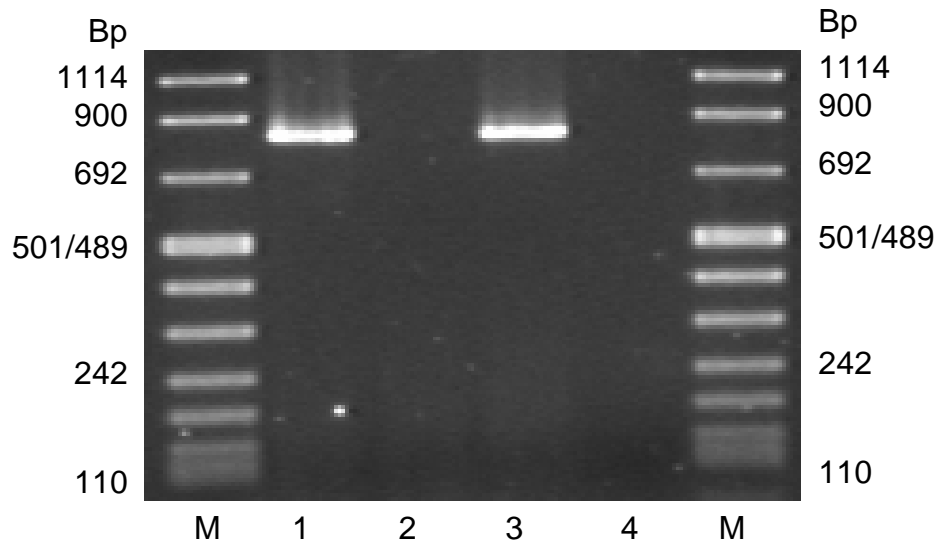


Abb. 4-25: Typische Amplikons des Gens *h1b* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IIC1 mit einer Größe von 840 Bp (1 und 3); fehlende Reaktion einer *S. aureus*-Kultur desselben Betriebs (2) und des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-13.

Innerhalb der 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnte im weiteren bei 37 (42,5%) Kulturen das Gen für ein oder mehrere Staphylokokken-Exotoxine nachgewiesen werden. Bei 33 (37,9%) Kulturen war das Gen *seg* mit einer Größe von 640 Bp (Abb. 4-26), bei drei (3,4%) Kulturen das Gen *seh* mit einer Größe von 370 Bp (Abb. 4-27) und bei 34 (39,1%) Kulturen das Gen *sei* mit einer Größe von 580 Bp nachweisbar (Abb. 4-28). Bis auf eine *sei*-positive Kultur waren alle *sei*-positiven Kulturen gleichzeitig *seg*-positiv. Bei keiner der untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnten die Gene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej* sowie *tst*, *eta* und *etb* nachgewiesen werden.

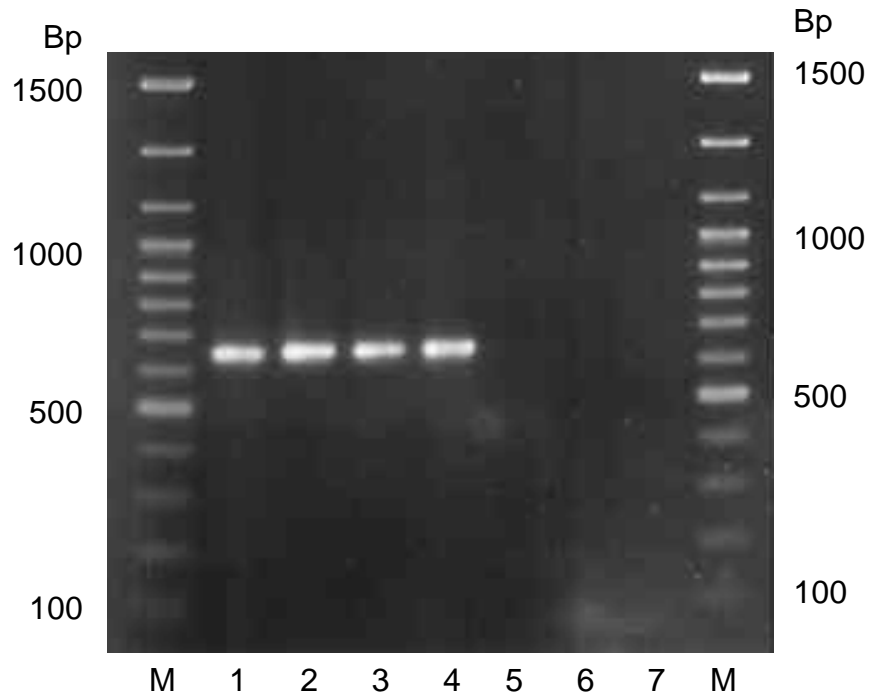


Abb. 4-26: Typische Amplikons des Enterotoxin G-kodierenden Gens *seg* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 640 Bp; 1 = *seg*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly 990055; 2 bis 4 = *S. aureus*-Isolate aus dem Betrieb IA3; 5 und 6 = fehlende Reaktion von *S. aureus*-Isolaten desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (7); M = siehe Abb. 4-5.

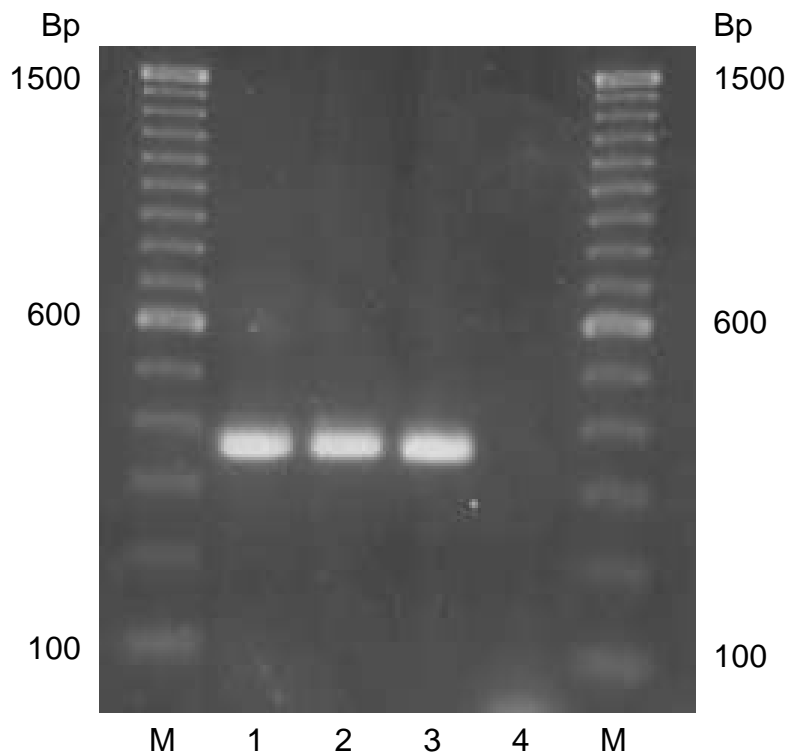


Abb. 4-27: Typische Amplikons des Enterotoxin Hkodierenden Gens *seh* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 370 Bp; 1 = *seh*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly 990552; 2 und 3 = *S. aureus*-Isolate aus Betrieb IA1; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (4); M = siehe Abb. 4-8.

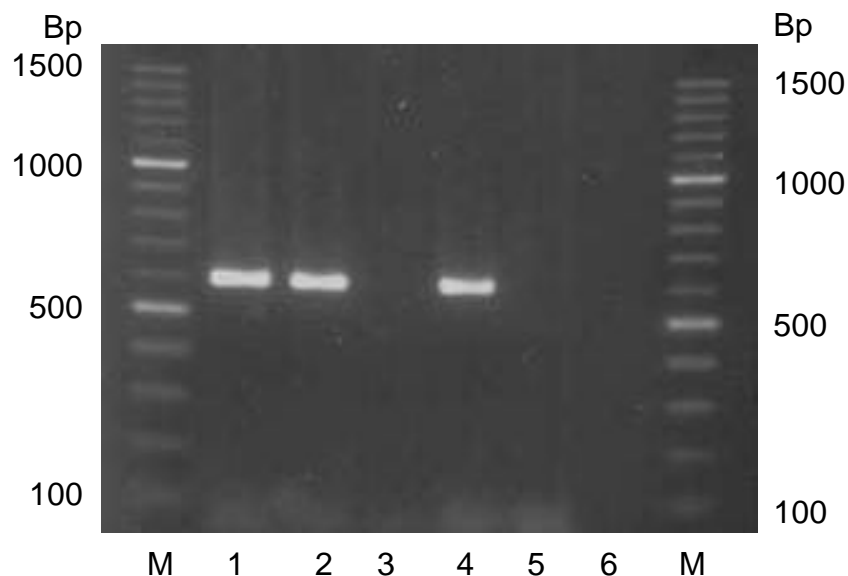


Abb. 4-28: Typische Amplikons des Enterotoxin I-kodierenden Gens *sei* einiger *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 580 Bp; 1 = *sei*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly 990055; 2 und 4 = *S. aureus*-Isolate aus Betrieb IB2; 3 und 5 = fehlende Reaktion von *S. aureus*-Isolaten desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-5.

Vergleichbar mit den zuvor beschriebenen PCR-Ergebnissen war mit Hilfe der „Multiplex-PCR“ ebenso der Nachweis von *seg* mit einer Größe von 330 Bp bei 33 (37,9%) Kulturen, von *seh* mit einer Größe von 360 Bp bei drei (3,5%) Kulturen und von *sei* mit einer Größe von 465 Bp bei 34 (39,1%) Kulturen, nachweisbar (Abb. 4-29). Wie bereits bei den zuvor beschriebenen PCR-Ergebnissen gezeigt, traten die Gene *seg* und *sei*, bis auf eine *sei*-positive Kultur, gemeinsam auf. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden wurde in die „Multiplex-PCR“ ein *S. aureus*-spezifischer 16S rRNA-Genachweis miteinbezogen, der bei allen 87 *S. aureus*-Kulturen mit einer Größe von 230 Bp positiv war.

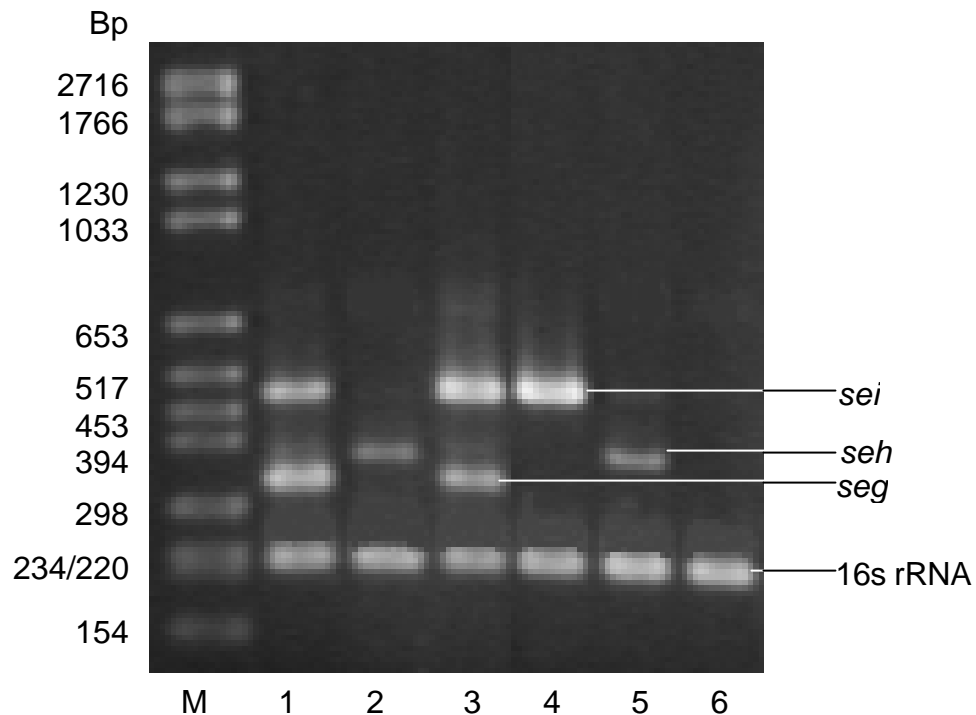


Abb. 4-29: „Multiplex PCR“ für den gemeinsamen Nachweis der Gene *seg*, *seh*, *sei* und *sej* und des 16S rRNA-Gens von *S. aureus*; 1 = *seg* und *sei*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly 990055; 2 = *seh*-positiver Referenzstamm *S. aureus* Ly 990552; 3 bis 6 = *S. aureus*-Isolate aus den Betrieben IIC1, IB1, IA1 und IIA2 mit den Enterotoxigenen *seg* und *sei* (3), *sei* (4) und *seh* (5); 6 = *S. aureus*-Isolat ohne Enterotoxingene *seg*, *seh*, *sei* und *sej*; ein 16S rRNA-Gen spezifisches Amplikon mit einer Größe von 230 Bp war bei allen sechs *S. aureus* nachweisbar; M = siehe Abb. 4-15

In weitergehenden Untersuchungen erwiesen sich 85 (97,7%) Kulturen als *set1* positiv, zwei (2,3%) Kulturen waren entsprechend negativ (Abb. 4-29).

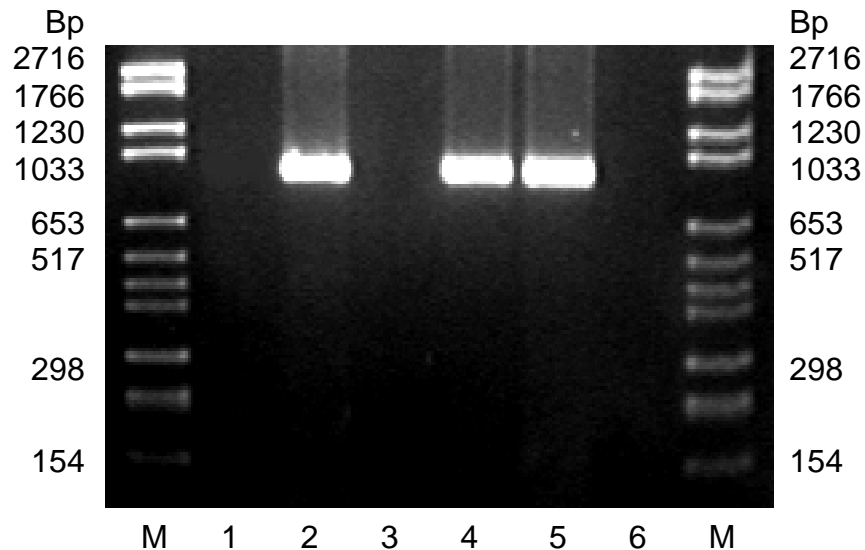


Abb. 4-30: Typische Amplikons des „Exotoxin-like“-Protein-kodierenden Gens *set1* einiger *S. aureus*-Kulturen aus dem Betrieb IB2 mit einer Größe von 880 Bp (2, 4 und 5); 1 und 3 = fehlende Reaktion von *S. aureus*-Isolaten desselben Betriebs; fehlende Reaktion des Kontrollstamms *S. epidermidis* ATCC 14990 (6); M = siehe Abb. 4-15.

Das Vorkommen der Virulenzgene innerhalb vorherrschender und sporadischer Abstammungslinien und die Beziehungen zwischen Abstammungslinien und einigen phäno- und genotypischen Eigenschaften der 87 *S. aureus*-Isolate sind Tab.4-2 und Tab.4-3 zu entnehmen.

Tab. 4-2: Vorkommen von Virulenzgenen innerhalb vorherrschender und sporadischer Abstammungslinien\*

Abstammungslinie	Positiv für die Gene									
	<i>cna</i>	<i>fnbB</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>set1</i>
LA	0	34	0	35	35	35	0	0	0	35
LB	0	1	0	5	5	5	0	0	0	5
LC	0	0	0	8	8	8	0	0	0	8
LD	3**	0	3	0	2	3	0	3	0	3
LE	0	0	0	28	28	28	28	0	28	28
LF	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
LG	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3
LH	0	2	2	0	2	2	0	0	0	2
LI	2	0	2	0	2	2	2	0	2	0
Vorherrschende Abstammungslinien <sup>d</sup>	0	34 (54.0 <sup>a</sup> )	0	63 (100)	63 (100)	63 (100)	28 (44.4)	0	28 (44.4)	63 (100)
Sporadische Abstammungslinien <sup>e</sup>	9 (37.5 <sup>b</sup> )	3 (12.5)	11 (45.8)	13 (54.2)	23 (95.8)	21 (87.5)	5 (20.8)	3 (12.5)	6 (25.0)	22 (91.7)
Alle Abstammungslinien	9 (10.4 <sup>c</sup> )	37 (42.5)	11 (12.6)	76 (87.4)	86 (98.9)	84 (96.6)	33 (37.9)	3 (3.5)	34 (39.1)	85 (97.7)

\*Alle 87 *S. aureus* – Kulturen waren positiv für die Gene *nuc*, *clfA*, *coa*, *spa*, *fnbA* und negativ für die Gene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *tst*, *eta* und *etb*;  
 \*\*Anzahl der positiven Stämme mit der jeweiligen Eigenschaft; <sup>a</sup>% innerhalb vorherrschender Abstammungslinien; <sup>b</sup>% innerhalb sporadischer Abstammungslinien; <sup>c</sup>% innerhalb aller untersuchten 87 *S. aureus* -Kulturen; <sup>d</sup>Abstammungslinien LA und LE; <sup>e</sup>Abstammungslinien LB, LC, LD, LF, LG, LH, LI



Tab. 4-3: Beziehungen zwischen Abstammungslinie, PFGE-Muster und einigen phäno- sowie genotypischen Eigenschaften der 87 *S. aureus*-Kulturen

Abstammungs-Linie	PFGE-Muster	n <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>	Penicillin resistenz	ISR <sup>3</sup>	coa	<i>spa</i>		<i>cna</i>		<i>fnbB</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agr</i>	Toxin PCR
							X Region	IgG-binding region	Abschnitt A	Abschnitt B					
LA	MA1	20	5	+	520 <sup>3</sup>	590 <sup>3</sup>	100 <sup>3</sup>	900 <sup>3</sup>	-	-	+ <sup>4</sup>	-	+ <sup>4</sup>	<i>agr</i> II	-
	MA2	1	1	+	520	590	100	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> II	-
	MA3	4	2	+	520	590	100	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> II	-
	MA4	1	1	+	520	590	100	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> II	-
	MA5	6	5	+	520	590	100	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> II	-
	MA6	2	2	+	520	590	100	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> II	-
	MA7	1	1	+	380/ 520	660	100	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	-
LB	MB1	1	1	+	420	820	310	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> I	-
	MB2	1	1	+	520	820	220	900	-	-	+	-	+	<i>agr</i> I	-
	MB3	2	1	+	420	820	310	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> I	-
	MB4	1	1	+	420	820	310	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> I	-
LC	MC1	4	2	+	420	820	290	720	-	-	-	-	+	<i>agr</i> I	-
	MC2	4	2	+	420	820	290	720	-	-	-	-	+	<i>agr</i> I	-
LD	MD1	2	1	-	520	500	220	900	+ <sup>4</sup>	1700 <sup>3</sup>	-	+ <sup>4</sup>	-	-	<i>seh</i>
	MD2	1	1	-	520	590	220	900	+	1200	-	+	-	-	<i>seh</i>
LE	ME1	12	6	+	-	660	290	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>
	ME2	6	4	+	-	660	290	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>

+ = positiv; - = negativ; <sup>1</sup> = Anzahl der Stämme; <sup>2</sup> = Anzahl der Betriebe; <sup>3</sup> = Größe (Bp); <sup>4</sup> = einheitliche Größen: *cna* – Abschnitt A (1700 bp), *fnbB* (820 Bp), *cap5* (880 bp) und *cap8* (1150 bp)

Fortsetzung Tab. 4-3:

Abstammungs- -Linie	PFGE- Muster	n <sup>1</sup>	n <sup>2</sup>	Penicillin resistenz	ISR	coa	<i>spa</i>		<i>cna</i>		<i>fnbB</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agr</i>	Toxin PCR
							X Region	IgG-binding region	Abschnitt A	Abschnitt B					
LE	ME3	6	1	+	-	660 <sup>3</sup>	290 <sup>3</sup>	900 <sup>3</sup>	-	-	-	-	+ <sup>4</sup>	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>
	ME4	2	1	+	-	660	290	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>
	ME5	1	1	+	-	660	290	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>
	ME6	1	1	+	-	660	290	900	-	-	-	-	+	<i>agr</i> II	<i>seg, sei</i>
LF	MF	1	1	-	380 <sup>3</sup>	590	270	900	+ <sup>4</sup>	1200 <sup>3</sup>	-	+ <sup>4</sup>	-	-	<i>sei</i>
LG	MG	3	3	-	420	660	250	900	+	1700	-	+	-	<i>agr</i> III	<i>seg, sei</i>
LH	MH	1	1	-	380	900	180	900	-	-	+ <sup>4</sup>	+	-	-	-
		1	1	-	380/ 520	820	340	900	-	-	+	+	-	-	-
LI	MI1	1	1	-	520	660	130	900	+	1700	-	+	-	-	<i>seg, sei</i>
	MI2	1	1	-	520	660	130	900	+	600	-	+	-	-	<i>seg, sei</i>

+ = positiv; - = negativ; <sup>1</sup> = Anzahl der Stämme; <sup>2</sup> = Anzahl der Betriebe; <sup>3</sup> = Größe (Bp); <sup>4</sup> = einheitliche Größen: *cna* – Abschnitt A (1700 bp), *fnbB* (820 Bp), *cap5* (880 bp) und *cap8* (1150 bp)

#### 4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Bewertung der Eigenschaften Penicillinresistenz bei den vorherrschenden Abstammungslinien LA und LE ergab eine hohe Signifikanz ( $P = 0,0002$ ), ebenso das Auftreten der Gene *fnbB* und *cap8* ( $P = 0,001$  und  $P < 0,0001$ ). Innerhalb der sporadischen Abstammungslinien zeigte sich eine hohe Signifikanz mit der Eigenschaft Penicillinempfindlichkeit sowie mit dem Auftreten des Gens *cap5* (beide  $P < 0.0001$ ). Die Penicillinresistenz war im weiteren hochsignifikant assoziiert mit dem Auftreten des Gens *cap8* ( $P < 0.0001$ ) und die Penicillinempfindlichkeit mit dem Auftreten der Gene *cna* und *cap5* (beide  $P < 0.0001$ ). Alle Stämme von vorherrschenden Abstammungslinien waren *agrII* positiv. Dies erwies sich als hochsignifikant ( $P < 0,0001$ ).

Eine hoch signifikante Beziehung war zwischen dem Auftreten des *agrII*-Gens und der Gene *fnbB* und *cap8* ( $P = 0.0005$  und  $P < 0.0001$ ) und zwischen den *agrI*-III negativen Kulturen und dem Auftreten von *cna*, *cap5* und *seh* ( $P = 0.0001$ ,  $P < 0.0001$  und  $P = 0.0005$ ) nachweisbar. Eine hoch signifikante Beziehung zwischen dem Auftreten der Gene *cap5* und *cna* ( $P < 0,001$ ) konnte ebenso beobachtet werden.

Die Gene *seg* und *sei* wurden gemeinsam ohne statistische Signifikanz bei vorherrschenden und sporadischen Abstammungslinien vorgefunden.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Phänotypische Eigenschaften**

Alle 87 untersuchten Kulturen der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund ihrer kulturellen, biochemischen und molekularen Eigenschaften als *Staphylococcus aureus* identifiziert werden.

Zum Nachweis der Eigenschaften Telluritreduktion und Lipolyse erfolgte die Anzüchtung der Kulturen auf dem Staphylokokken-Selektivnährmedium (3.2.1) nach Baird-Parker (BAIRD-PARKER, 1962). Das Baird-Parker-Medium enthält neben Tellurit und Lithiumchlorid zur Hemmung der Begleitflora 1,2% Glycin und 1% Natriumpyruvat zur Förderung des Wachstums der Staphylokokken und Eigelbsuspension zum Nachweis von Lipasen (BRÜCKLER et al., 1994). Alle 87 Kulturen reduzierten Tellurit zu schwarzem Tellur, bei 16 (18,4%) Kulturen konnte eine Lipolyse, d.h. ein Aufklaren dieses Mediums um die Kolonien beobachtet werden. Das Telluritmedium eignet sich zur selektiven Isolierung koagulasepositiver Staphylokokken, insbesondere aus Lebensmitteln und stark verunreinigten Proben. Auf diesem Medium wird das Wachstum koagulasenegativer Staphylokokken in geringem Maße und vieler anderer Bakterienarten deutlich gehemmt (LUDLAM, 1949).

Im weiteren konnten für alle 87 *S. aureus*-Kulturen die Eigenschaften Kochsalztoleranz und Mannitvergärung mit Hilfe des Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agars, einem nach CHAPMAN (1945) modifizierten Selektivagar für pathogene Staphylokokken, nachgewiesen werden. Der Mannit-Kochsalz-Phenolrot Agar eignet sich in der Routinediagnostik ebenso zur Isolierung von Staphylokokken aus

verunreinigten Proben, da er durch den Zusatz von Natriumchlorid das Wachstum von Begleitkeimen hemmt (CHAPMAN, 1945).

Das Enzym Katalase war bei allen 87 Kulturen der vorliegenden Untersuchung nachweisbar. Die Bildung des Enzyms Katalase gilt als eine typische Eigenschaft von Staphylokokken (BRÜCKLER et al., 1994). TU und PALUTKE (1976) beschrieben allerdings das Vorkommen von katalasenegativen *S. aureus*. Die Gattung *S. aureus* subsp. *anaerobius* ist stets katalasenegativ (KLOOS und LAMBE, 1991). Katalase zersetzt  $H_2O_2$  ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ). Dadurch schützen sich phagozytierte Staphylokokken gegen das in den Phagozyten gebildete  $H_2O_2$ . Stark katalasepositive Staphylokokken wurden, nach BRÜCKLER et al. (1994), langsamer abgetötet als schwache Katalasebildner. Die Ersteren haben auch eine höhere Virulenz im Mäuseversuch (MANDELL, 1975).

Zum Nachweis der Pigmentbildung wurden die Kulturen nach LÄMMLER et al. (1986) auf Nitrozellulosemembranen angezüchtet. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zu anderen Untersuchungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel dem Nachweis der Pigmentbildung nach Kultivierung auf Chapman-Agar, liegt darin, dass die Pigmentierung auf der einheitlich weißen Nitrozellulosemembran besser zu interpretieren ist als auf einem farbigen Nährboden. Die unterschiedliche Pigmentierung der Stämme ermöglichte eine phänotypische Differenzierung der Kulturen. Innerhalb der untersuchten *S. aureus*-Kulturen bildeten 61,0% der Kulturen ein Pigment, 39,0% der Kulturen wuchsen als weiße, unpigmentierte Kolonien. Eine vergleichbare Pigmentbildung wurde für unterschiedliche Staphylokokkenarten, wie z.B. *S. arlettae*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. caseolyticus* und *S. cohnii* subsp. *urealyticus* beschrieben (SCHLEIFER und KLOOS, 1975). Die Pigmentierung kann somit nur als zusätzliches Merkmal zur Identifizierung von *S. aureus* herangezogen werden (BRÜCKLER et al., 1994).

Alle Kulturen zeigten in dem nach BRÜCKLER et al. (1994) zum Nachweis der Koagulase durchgeführten Röhrchentest innerhalb von 24h eine Koagulation des Kaninchenplasmas. Die Fähigkeit, Koagulase zu bilden, ist eine charakteristische Eigenschaft von *S. aureus* und mit Einschränkungen von *S. hyicus*, *S. intermedius* sowie *S. delphini* und *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (BRÜCKLER et al., 1994). Die Kolonien von *S. aureus* sind nach DEVRIESE und HAJEK (1980) und KLOOS und SCHLEIFER (1986) als einzige Art innerhalb der koagulasepositiven Staphylokokken pigmentiert.

Zur Unterscheidung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Hämolyse beschrieben SKALKA et al. (1979) sowie HÉBERT 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  $\beta$ -Hämolysinproduzierenden Staphylokokkenkultur auf Schafblutagarplatten ausgestrichen und bebrütet. Eine  $\alpha$ -Hämolyse zeigte sich dabei als vollständige Hämolyse um den Staphylokokkenimpfstrich, die aber im Bereich des  $\beta$ -Hämolysins gehemmt wurde. Eine  $\beta$ -Hämolyse war durch eine unvollständige Hämolysezone um den Staphylokokkenimpfstrich gekennzeichnet. Eine  $\delta$ - oder  $\delta$ -like-Hämolyse zeigte sich als halbmondförmige Zone einer vollständigen Hämolyse in der Behrungsstelle des zu untersuchenden Stamms und des  $\beta$ -Hämolysin produzierenden *S. aureus*. Laut CLYNE et al. (1992) hemmen die in Blutagar möglicherweise enthaltenen sulfonierten Polymere (Agar, Heparin, Dextran- Sulfat) bzw. Lipide (Phospholipide, Fettsäuren und Cholesterol) das  $\gamma$ -Hämolysin, weshalb sein Vorkommen hier nicht überprüft werden konnte.

Die Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kulturen zeigten ein gemeinsames Auftreten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse (81,6%). Nach JONSSON et al.

(1985) gehört das  $\alpha$ -Hämolsin zu den bedeutendsten Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Das  $\alpha$ -Hämolsin kommt bei Tierisolaten häufig gemeinsam mit dem  $\beta$ -Hämolsin vor (JONSSON et al., 1985). Dies konnte bei den Kulturen der vorliegenden Untersuchungen ebenso beobachtet werden. Allein war eine  $\alpha$ -Hämolyse bei 14,9% und eine  $\beta$ -Hämolyse bei 2,3% der Kulturen nachweisbar. Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolsin sind die am besten charakterisiertesten Hämolsine. Das  $\alpha$ -Hämolsin wird von den meisten *S. aureus*-Stämmen exprimiert und scheint nach FREER und ARBUTHNOTT (1983) auch bei Rindermastitiden eine wichtige Rolle als nekrotisierender Faktor zu spielen. Das  $\beta$ -Hämolsin konnte, nach JONSSON und WADSTRÖM (1993), bei den meisten *S. aureus*-Stämmen, isoliert von Rindermastitiden, weniger bei *S. aureus*-Stämmen vom Menschen, nachgewiesen werden. Die Wirkung des  $\beta$ -Hämolsins *in vitro* wurde von CIFRIAN et al. (1996) geprüft. Diese Autoren zeigten, dass das  $\beta$ -Hämolsin nicht nur Drüsenzellen des Euters schädigt, sondern auch die schädigende Wirkung des  $\alpha$ -Hämolsins verstärkt, eine vermehrte Adhärenz an Drüsenzellen fördert und auch eine Proliferation von *S. aureus* begünstigt.

Die als  $\delta$ -like-Hämolyse bezeichnete Hämolyseform war nach Ausstreichen der Kulturen auf Schafblutagarplatten (3.2.1) nicht feststellbar. Diese  $\delta$ -like-Hämolyse wies, nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode, im Bereich der unvollständigen *S. aureus*- $\beta$ -Hämolyse eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse auf. Das Auftreten dieser Hämolyseform konnte nur bei einer (1,2%) Kultur beobachtet werden. Ein vergleichbares  $\delta$ -like-Hämolsin wurde sowohl bei koagulasepositiven als auch bei koagulasenegativen Staphylokokkenspezies beschrieben. SCHEIFELE et al. (1987) bezeichneten ein Hämolsin von *S. epidermidis* als  $\delta$ -like-Hämolsin. Auch VANDENESCH et al. (1991b) berichteten

von einem hitzstabilen Hämolyisin bei *S. lugdunensis* und wiesen dessen lytische Aktivität gegenüber Kaninchenerythrozyten nach. In beiden Fällen waren Homologien mit dem  $\delta$ -Hämolyisin von *S. aureus* nachweisbar. Die Aminosäuresequenz des *S. epidermidis*- $\delta$ -like-Hämolyisins weist 25 Aminosäuren auf und zeigt die eine hohe Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des  $\delta$ -Hämolyisins von *S. aureus* (McKEVITT et al., 1990).

Ein Nachweis des Clumping-Factors im Objektträgertest war bei allen 87 untersuchten Kulturen der vorliegenden Arbeit möglich. Der Clumping-Factor gilt als taxonomisches Kriterium für *S. aureus* (KLOOS und SCHLEIFER, 1986) und mit Einschränkung für *S. intermedius*, *S. hyicus* (DEVRIESE und HAJEK, 1980; LÄMMLER et al., 1985; LÄMMLER, 1991ab), *S. lugdunensis* und *S. schleiferi* (KLOOS und LAMBE, 1991). Nach HUMMEL et al. (1992) müssen nicht alle *S. aureus*-Kulturen Clumping-Factor-positiv sein. Bei bekapselten *S. aureus*-Stämmen können, nach BLACKSTOCK et al. (1968), z.B. überlagernde Polysaccharide den Clumping-Factor abdecken.

Mit dem kommerziellen Nachweisverfahren „Staphaurex-Plus“ Testsystem war im weiteren bei allen im vorliegenden untersuchten 87 *S. aureus*-Kulturen eine positive Reaktion zu beobachten. Eine Identifizierung von *S. aureus* mit dem „Staphaurex-Plus“ Testsystem zeigte bei anderen Autoren eine variable Sensibilität von 98,2% bis 100% und eine Spezifität von 93,4% bis 96,2% (LUIJENDIJK et al., 1996; WILKERSON et al., 1997; GUPTA et al. 1998; VAN GRIETHUYSEN et al., 2001).

Bei den 87 Kulturen der vorliegenden Arbeit konnten ferner die Enzyme DNase und Thermonuclease nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen beschrieben KLOOS und SCHLEIFER (1986)



den Nachweis des Enzyms Thermonuclease als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von *S. aureus*-, *S. intermedius*- sowie *S. hyicus*-Kulturen gegenüber anderen Staphylokokkenarten. Die Thermonucleasen widerstehen, im Gegensatz zu hitzeempfindlichen DNasen, selbst minutenlanges Kochen ohne Aktivitätsverlust (CUNNINGHAM et al., 1956). Hitzeempfindliche DNasen werden häufig auch von koagulasenegativen Staphylokokkenarten und einigen Mikrokokkenarten gebildet (LACHICA et al., 1971; GEMMEL, 1983). Die Hitzeresistenz ist somit ein entscheidendes Merkmal zur Differenzierung der DNasen der Staphylokokken und zur Auffindung eines z.B. mit *S. aureus* kontaminierten Lebensmittels, selbst nach dessen Erhitzung (CHESBRO und AUBORN, 1967). Die Thermonucleasen von *S. aureus* unterscheiden sich serologisch von den Thermonucleasen anderer Bakterienspezies (LACHICA et al., 1979; GUDDING, 1983).

Übereinstimmend mit BRÜCKLER et al. (1994) konnte bei allen untersuchten 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. Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase wurde mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests geprüft und zeigte sich als Hemmung des mukoiden Wachstums einer *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*-Testkultur. SKALKA (1985) beschrieb diesen Dekapsulationstest als geeignete und zuverlässige Methode zur Differenzierung von *S. aureus* und *S. intermedius*.

Innerhalb der 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich 87,4% der Stämme als resistent gegenüber Penicillin. Vergleichbare Ergebnisse fanden LANGONI et al. (1991). Diese Autoren untersuchten 702 *S. aureus*-Kulturen aus dem Bundesstaat São Paulo, Brasilien, und stellten fest, dass 86,3% der Stämme resistent gegenüber Penicillin waren.

LANGENEGGER et al. (1986) konnten ebenso bei *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus dem Bundesstaat São Paulo, eine Penicillinresistenz bei 58,9% der Stämme beobachten. WALLMANN et al. publizierten 2003 die Ergebnisse einer Überwachungsstudie von 2001 zur Antibiotikaresistenz in Deutschland. Dabei führten die Autoren auf, dass nur 23,6% der 212 untersuchten *S. aureus*-Kulturen resistent gegenüber Penicillin waren.

Penicilline gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Lactamantibiotika und wirken auf proliferierende Keime. Ihr  $\beta$ -Lactam-Ring hemmt die Mureinsynthetasen, die für den Aufbau der Bakterienzellwand wichtig sind. Ist dieses Enzym gehemmt, wird die notwendige Quervernetzung der Glykosidstränge durch Peptidbrücken gestört. Über die entstehenden Lücken kommt es infolge des wachsenden Innendrucks der Bakterienzelle zur Lysis. Der Wirkungsmechanismus hat zur Folge, dass nur proliferierende Bakterien betroffen sind und  $\beta$ -Lactamantibiotika für tierische Zellen, die keine Zellwand besitzen, nicht zytotoxisch wirksam sind (KROKER, 1999).

Für die Resistenz von *S. aureus* gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika scheinen drei verschiedene Wirkmechanismen verantwortlich zu sein: Erstens die Bildung von extrazellulären Enzymen, den sogenannten Penicillinasen oder  $\beta$ -Lactamasen, die den  $\beta$ -Lactam-Ring hydrolysieren. Dies führt zu einer Inaktivierung des Antibiotikums; Als zweites wurden Strukturänderungen oder die Verminderung der Zahl von Penicillinbindungsproteinen (PBPs) beschrieben, was dazu führte, dass das Penicillin die Rezeptoren nicht erreichen kann; Als dritter Resistenzmechanismus gilt eine mangelnde Aktivierung autolytischer Enzyme der bakteriellen Zellwand. Die Keime entwickeln mittels dieser Mechanismen eine Toleranz gegenüber dem bakteriziden Effekt von  $\beta$ -Lactamantibiotika (SABATH et al., 1977; SIMON und STILLE, 2000).

ABRAHAM und CHAIN beschrieben erstmals 1940 die Bildung des Enzyms Penicillinase bei *Escherichia coli*. Die erste Beschreibung dieses Enzym bei

*S. aureus* erfolgte von McKEE et al. (1944) und KIRBY (1944). Die Enzyme werden sowohl chromosomal als auch durch Plasmide kodiert und stellen klinisch die bedeutsamste Ursache der bakteriellen Resistenzen gegenüber Penicillinen und anderen  $\beta$ -Lactamantibiotika dar (LYON und SKURRAY, 1987).

Trotz der beschriebenen Resistenzerscheinungen sind  $\beta$ -Lactamantibiotika in der Veterinärmedizin aufgrund ihrer guten bakteriziden Wirksamkeit und ihrer geringen Toxizität Mittel der Wahl. Dies ist besonders im Rahmen der Mastitistherapie von Bedeutung (NICOLET, 1985; KROKER, 1999).

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich alle 87 Kulturen als empfindlich gegenüber Oxacillin. Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von LANGONI et al. (1991). Diese Autoren untersuchten 702 *S. aureus*-Kulturen des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, und stellten bei 27,5% der Kulturen eine Resistenz gegenüber Oxacillin fest. STEPHAN et al. (1999) und WALLMANN et al. (2003) fanden, entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen, bei 63 bzw. 212 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert in der Schweiz und Deutschland, ebenso keine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum.

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 Isoxazolympenicilline, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin abgelöst (SIMON und STILLE, 2000). Seit den späten 70er Jahren wurden Ausbrüche durch methicillinresistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) und deren Verbreitung beschrieben (GIAMARELLOU et al., 1981; WITTE et al., 1997). Multiresistente *S. aureus*-Stämme sind fast immer auch resistent gegen Oxacillin. Der Resistenzmechanismus beruht auf dem Vorkommen des Gens *mecA*. Dies kodiert das Penicillinbindeprotein PBP2 mit nur geringer

Affinität für  $\beta$ -Lactamantibiotika. Eine Kreuzresistenz gegen alle Vertreter dieser Substanzgruppe einschließlich der Cephalosporine und Carbapeneme wurde beschrieben (LAUDE, 2000). Oxacillinresistente *S. aureus*, isoliert von Rindermastitiden, scheinen in Brasilien, ebenso wie in Deutschland, nicht der Ursprung der MRSA, isolierbar aus Untersuchungsproben vom Menschen, zu sein.

Innerhalb der 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen zeigten alle Kulturen ein intermediäres Verhalten gegenüber Gentamicin. Bei *S. aureus*-Kulturen, die aus Milchproben mehrerer Bezirke des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, isoliert wurden, konnte für alle untersuchten Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin festgestellt werden (LANGENEGGER et al., 1986). NADER-FILHO et al. (1986) zeigten bei 94,6% von 37 untersuchten *S. aureus*-Isolaten eine Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin. LANGONI et al. (1991) untersuchten 702 *S. aureus*-Kulturen und stellten bei 72,5% der Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin fest. WALLMANN et al. (2003) konnten bei 212 untersuchten *S. aureus*-Kulturen aus Deutschland ebenso keine Resistenz gegenüber Gentamicin feststellen.

Der Angriffspunkt der Aminoglykosidantibiotika, wie z.B. Gentamicin, liegt nach KROKER (1999) in der Translationsphase der Proteinsynthese. Aminoglykosidantibiotika blockieren die Proteinsynthese nicht, sie induzieren jedoch die Bildung funktionsuntüchtiger Proteine. Vermutet werden weiterhin mit Permeabilitätsstörungen einhergehende Interaktionen der Antibiotika mit der Zellmembran der Bakterien. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika erfolgt, nach dem oben genannten Autor, plasmidvermittelt durch Aufnahme von Resistenzfaktoren (R-Faktoren). Es kommt zur Induktion einer enzymatischen Deaktivierung durch Adenylierungs-, Phosphorylierungs- und Acetylierungsreaktionen.

Innerhalb der 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich alle Kulturen als empfindlich gegenüber Minocyclin, und Tetracyclin. Bei *S. aureus*-Stämmen, die aus Milchproben mehrerer Bezirke des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, isoliert wurden, war für 37 bzw. 702 untersuchten *S. aureus*-Kulturen bei 70,3% bzw. 57,2% der Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclin nachweisbar (NADER-FILHO et al., 1986; LANGONI et al., 1991). STEPHAN et al. (1999) beschrieben bei 63 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden in der Schweiz, bei allen Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclin. WALLMANN et al. (2003) konnten nur bei 2,8% der untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden in Deutschland, eine Resistenz gegenüber Tetracyclin beobachten.

Tetracyclin und Minocyclin gehören zur Gruppe der "klassischen Breitbandantibiotika" und wirken durch Hemmung der Proteinsynthese bakteriostatisch. Resistenzen sind plasmid- oder chromosomalvermittelt und entstehen durch eine von den Tetracyclinen selbst induzierte Inhibition des Transportprozesses in die Bakterienzelle (KROKER, 1999).

## **5.2 Restriktionsverdau der Gesamtzell-DNA**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Feststellung mutmaßlicher epidemiologischer Zusammenhänge der *S. aureus*-Kulturen untereinander die Makrorestriktionsanalyse nach Verdau der chromosomalen DNA mit dem Restriktionsenzym *Sma*I und eine Auftrennung der Fragmente mittels PFGE eingesetzt. Laut GROTHUES und TÜMMLER (1991) steht mit der PFGE ein Verfahren zur Verfügung, mit dessen Hilfe Infektionsquellen und Übertragungswege von bakteriellen Erregern ermittelt und die Diversität und klonale Struktur von Bakterienpopulationen aufgeklärt werden können. Die PFGE stellt nach RÖMLING et

al. (1994, 1995) die Methode der Wahl, den sogenannten Goldstandard für die epidemiologische Typisierung der meisten Mikroorganismen, die für eine Infektionskrankheit verantwortlich gemacht werden, dar.

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 von SCHWARTZ et al. entwickelt. Dabei ergeben sich definierte, stammspezifische Bandenmuster („Fingerprinting“). Bei der herkömmlichen Elektrophorese von DNA-Fragmenten (im statischen elektrischen Feld) können nur Stücke bis zu einer Größe von etwa 50 kb getrennt werden. Größere Fragmente wandern nur noch wenig und ohne Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Molekülgröße. Mit der PFGE ist es möglich, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von etwa 2.000 Kb zu trennen. Die DNA ist aufgrund ihres Phosphatgruppengerüsts negativ geladen. Die PFGE setzt die DNA einem elektrischen Feld aus, das seine Richtung in festgelegten Zeitintervallen („Pulszeiten“) wechselt. Wird ein elektrisches Feld an ein Gel angelegt, so strecken sich die DNA-Moleküle in Richtung des Feldes und durchwandern das Gel. Verschwindet das erste elektrische Feld und wird ein zweites Feld (im einem bestimmten Winkel zum ersten Feld) aktiviert, muss das DNA-Knäuel seine Konformation ändern, um sich zu reorientieren, bevor es in die Richtung des zweiten elektrischen Feldes migrieren kann. Größere DNA-Moleküle brauchen mehr Zeit als kleinere Moleküle, um sich umzuorientieren, d.h. Moleküle mit zunehmender Größe benötigen längere Zeit, bevor sie mit der Migration durch das Gel beginnen. Demnach verbleibt mit zunehmender Größe der Moleküle immer weniger Zeit für die Wanderung in Feldrichtung, daraus folgt die bei der PFGE zu beobachtende

Auftrennung der linearen DNA-Moleküle nach dem Molekulargewicht (LAI et al., 1989; GARDINER, 1991).

Der "contour clamp homogeneous electric field" (CHEF)-Apparat wurde in der vorliegenden Arbeit für die PFGE genutzt. Dieses System bildet ein Hexagon an Punktelektroden, die in einem Winkel von  $120^\circ$  zueinander positioniert sind (Abb. 5-1). Das CHEF-System der Firma Biorad wurde mit Hilfe der Arbeiten von CHU et al. (1986) entwickelt. Die Parameter Puffertemperatur und -zusammensetzung, Temperatur und Ionenstärke des Gels, Spezifikation und Konzentration der verwendeten Agarose sowie der Winkel und die Konfiguration der Elektroden zueinander werden stets konstant gehalten, während die Pulszeit und die Stärke des elektrischen Feldes variiert werden können. Die Puffertemperatur sollte laut GARDINER (1991) zwischen 4 und 15 °C gehalten werden, da die DNA-Fragmente umso schneller durch das Gel laufen, je höher die Temperatur ist. Pulszeit und Feldstärke sind die entscheidenden Parameter, die den während der PFGE aufgetrennten Molekulargewichtsbereich festlegen. Die Genauigkeit der Auftrennung ist von der Laufzeit, der Umorientierungszeit (Pulsdauer) und dem Winkel der Elektrodenanordnung abhängig. Diese Parameter sind für jeden Bakterientyp bzw. für das jeweils gewählte Restriktionsenzym unterschiedlich, da die Größe der Fragmente von der Lokalisierung der Schnittstellen auf dem Genom bestimmt wird.

Der Vergleich der mit der PFGE aufgetrennten Fragmente, insbesondere die quantitative Auswertung der Fragmentlängenmuster, erfordert eine reproduzierbare und vergleichbare kolineare Auftrennung in allen Spuren des Gels (Abb. 5-1). Ein Vorteil in diesem System ist, dass viele Proben in einem Gel parallel aufbereitet werden können, da die DNA-Banden exakt untereinander angeordnet werden. RÖMLING et al. (1995) stellten fest, dass, wenn alle Stämme auf einem einzigen Gel analysiert werden konnten, der visuelle Vergleich der Fragmentlängenmuster in der

Regel ausreichte. Der Vergleich von Mustern verschiedener Gele erfordert jedoch eine sorgfältige Kontrolle. Die experimentellen Bedingungen sollten so weit wie möglich standardisiert werden. Längenstandards, sogenannte Marker, sind auf der äußeren Spur aufzutragen, um Inhomogenitäten des elektrischen Feldes zu erfassen. Abweichungen in der Güte eines „DNA-Fingerprinting“ beruhen in der Regel auf Partialverdau, Methylierung der Schnittstellen, unzureichender Auflösung oder Signalintensität, Fehlinterpretationen von Doppel- und Mehrfachbanden oder dem Verlust kleiner Fragmente (<20 Kb) aus dem Gel.

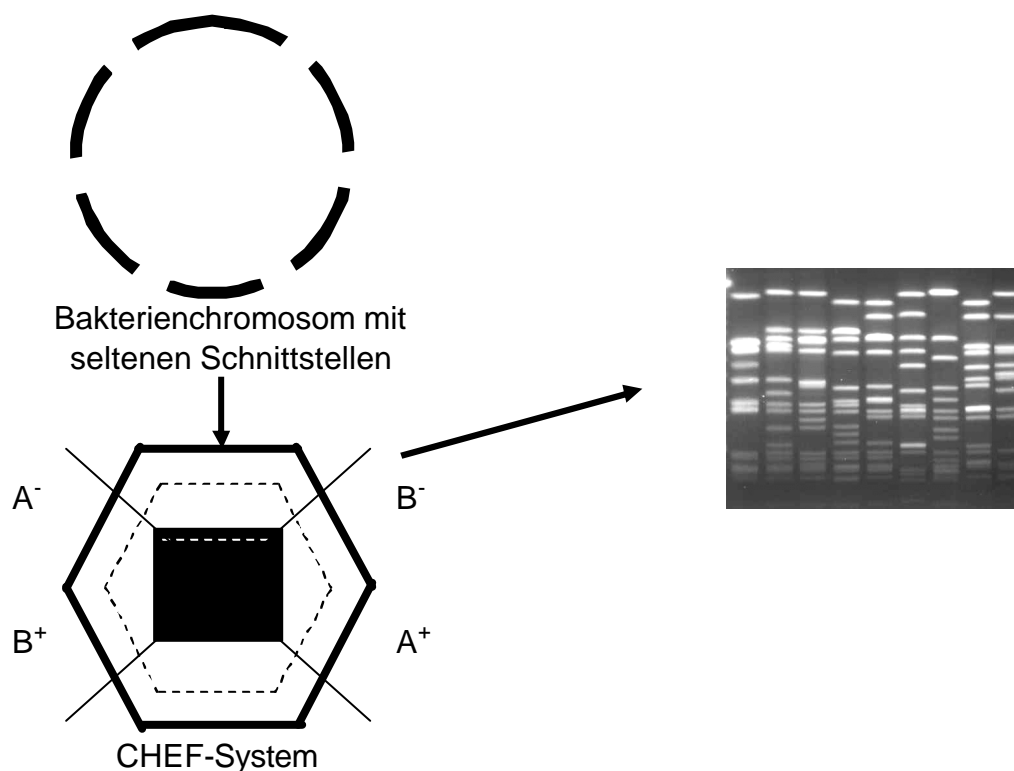


Abb. 5-1: Schema zur Funktionsweise der PFGE (CHEF-System) nach LAI et al. (1989)



Die Identifizierung von Stämmen, die einen Klon repräsentieren, ist sicherlich die wichtigste Anwendung der Infektionsepidemiologie. TENOVER et al. (1995) berichteten, dass das entstandene Fragmentlängenmuster den Genotyp eines Bakterienstamms definiert. Miteinander verwandte Stämme einer Spezies werden anhand ihrer Ähnlichkeit im Fragmentlängenmuster erkannt. Der quantitative Fragmentlängenvergleich erlaubt eine Definition von „Klon“ und „klonalen Varianten“ innerhalb einer Spezies. Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind selektionsneutrale Marker, die im Verlauf der Evolution des Bakterienchromosoms über Rearrangements oder Mutationen an einer Stelle des Genoms verloren gehen und an anderer Stelle neu entstehen können. Die nicht miteinander verwandten Klone einer Spezies zeichnen sich durch unterschiedliche Fragmentlängenmuster aus, während die Varianten eines Klons sehr ähnliche oder identische Fragmentlängenmuster besitzen. RÖMLING et al. (1995) gaben an, dass sich alle klassischen Fragestellungen der Infektionsepidemiologie mit dem „DNA-Fingerprinting“ untersuchen lassen. Man kann z.B. auch Infektionswege im Organismus verfolgen, die genomische Variation der Erreger während chronischer Infektionen beobachten und den Erfolg hygienischer Maßnahmen überprüfen.

Die nach TENOVER et al. (1995) allgemein gültige Richtlinie für den epidemiologischen Vergleich von PFGE-Fragmentmustern besagt, dass Isolate, die in bis zu drei Bandenpositionen differieren, aus einem einzigen genetischen Vorfall entstanden sein können. Solche Isolate stellen möglicherweise epidemiologisch eng verwandte Subtypen desselben Stammes dar. 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. 5-1).

Tab. 5-1: Schema zur Beurteilung von PFGE-Gelen nach TENNOVER et al. 1995.

	Genetische Ereignisse (n)	Bandenunterschiede	Interpretation
Typ A	0	0	identisch
Subtyp A	1	2-3	Teilidentisch
Nicht verwandt	2	4-6	Nicht identisch

Laut GOERING (1998) eignen sich für GC-reiche Sequenzen, Enzyme, die Hexanukleotide aus A und T erkennen und analog für AT-reiche Genome, Enzyme, die eine hexamere Sequenz aus G oder C erkennen, wie z.B. *SmaI* (CCC↓GGG). Bei der Wahl der selten schneidenden Restriktionsendonuklease *SmaI* wurde der relativ geringe G+C-Gehalt von *S. aureus* berücksichtigt (MASLOW et al., 1993).

Der Restriktionsverdau der 87 *S. aureus*-Isolate der vorliegenden Untersuchungen mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* ergab eine überschaubare Zahl gut voneinander abgrenzbarer Fragmente überwiegend im Größenbereich von 23,1 bis 582 Kb. Das Restriktionsenzym *SmaI* erwies sich bereits in einer Vielzahl von vergleichbaren Untersuchungen als optimales Enzym zur Analyse der chromosomalen DNA von *S. aureus* (CARLES-NURIT et al., 1992; SCHLICHTING et al., 1993; SANCHES et al., 1995; KLUYTMANS et al., 1995, JORGENSEN et al., 1996; TOSHKOVA et al., 1997; VAN BELKUM et al., 1998; ANNEMÜLLER et al., 1999; LANGE et al., 1999; GALDBART et al., 2000; ENRIGHT et al., 2000; DEPLANO et al., 2000; AKINEDEN et al., 2001; ZADOKS et al., 2002).

Nach Auftrennung der Fragmente der 87 *S. aureus*-Kulturen durch PFGE konnten 26 DNA-Restriktionsmuster (MA1-MA7, MB1-MB4, MC1 und MC2, MD1 und

MD2, ME1-ME6, MF, MG, MH, MI1 und MI2), die sich in neun Abstammungslinien (LA-LI) zusammenfassen liessen, unterschieden werden. Die Abstammungslinien LA (Muster MA1-MA7) und LE (Muster ME1-ME6) waren mit 63 (72,2%) Isolaten überwiegend nachweisbar. Der Nachweis von *S. aureus* der Abstammungslinien LA und LE erfolgte in allen sechs Bezirken des Bundesstaats São Paulo. Die Abstammungslinien LB (Muster MB1-MB4), LC (Muster MC1 und MC2), LD (Muster MD1 und MD2), LF (Muster MF), LG (Muster MG), LH (Muster MH) und LI (Muster MI1 und MI2) waren dagegen nur bei 24 (27,8%) Isolaten unterschiedlicher Bezirke des Bundesstaats São Paulo nachweisbar.

Das vermehrte Auftreten der Abstammungslinien LA und LE zeigte, dass nur wenige *S. aureus*-Klone für die Mastitissituation in einzelnen Betrieben und, übergreifend, in mehreren Betrieben verschiedener Bezirke verantwortlich zu sein scheint. Aufgrund des Nachweises gleicher DNA-Restriktionsmuster bei *S. aureus*, isoliert von mastitiskranken Kühen in Irland und in den USA, vermuteten FITZGERALD et al. (1997) ebenso das Vorkommen einer kleinen Anzahl spezialisierter *S. aureus*-Klone, die für die Mehrzahl der Rindermastitiden verantwortlich waren.

Ähnliche Feststellungen trafen ANNEMÜLLER et al. (1999), AKINEDEN et al. (2000) und ZADOCKS et al. (2000) bei der Untersuchung von *S. aureus*-Stämmen, isoliert aus boviner Mastitismilch. Diese Autoren führten ebenfalls PFGE-Analysen mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I durch und fanden, dass nur wenige Bakterienklone für die Mastitissituation in einzelnen, teilweise in mehreren Betrieben verantwortlich waren und bestätigten die Übertragung dieses Mastitiserregers von Kuh zu Kuh. ZADOCKS et al. (2002) untersuchten 225 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von der Haut vom Mensch, der Zitzenhaut, der Melkanlage und aus Milch mittels PFGE. Dabei zeigten die Isolate der Haut der Melker, der Zitze und der Melkgeräte

Übereinstimmungen. Unterschiede waren dagegen im PFGE-Muster dieser Isolate mit den Isolaten aus Milch feststellbar. Die Autoren folgerten daraus, dass die Isolate der Haut von Mensch und Zitze durch die Milchgeräte verbreitet wurden und dass diese Isolate keine besondere Bedeutung für eine Infektion der Milchdrüse haben.

Die Ergebnisse der PFGE der vorliegenden Untersuchungen zeigten ferner, dass alle *S. aureus*-Stämme aus vorherrschenden Abstammungslinien resistent gegenüber Penicillin waren, dagegen nur 54,2% der *S. aureus*-Stämme aus sporadischen Abstammungslinien. Dies könnte bedeuten, dass die antibiotische Resistenz ein Selektionsfaktor für die Ausbreitung vorherrschender Abstammungslinien war.

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

Die ribosomale RNA stellt einen Bestandteil des Ribosoms dar. Innerhalb der ribosomalen Nukleinsäuren, die am Vorgang der Proteinsynthese beteiligt sind, lassen sich drei RNA-Formen unterscheiden. Dies ist zum einen die ribosomale RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die Messenger-RNA (mRNA). Ähnlich wie die DNA sind diese drei RNA-Typen polymere Moleküle, die aus Mononukleotiden bestehen, die über Phosphorbrücken miteinander verbunden sind. Die RNA-Moleküle unterscheiden sich zur DNA zum einen in einer deutlich geringeren Größe und in dem Zucker Ribose anstatt Desoxyribose und in der Base Uracil anstatt Thymin.

Die bakteriellen Ribosomen (70S) bestehen aus zwei ungleichen Untereinheiten, der kleinen 30S Untereinheit („small ribosomal subunit“ RNA, SSU), bestehend aus 21 ribosomalen Proteinen und der 50S Untereinheit („large ribosomal subunit“ RNA, LSU), bestehend aus 31 ribosomalen Proteinen: Die Einheit S

bezeichnet eine „Svedberg“-Einheit, welche sich auf das Molekulargewicht der einzelnen Teile bezieht. Die kleine Untereinheit enthält die 16S rRNA und eine „spacer“-Region (Spacer-1), die große Untereinheit die 23S rRNA, eine weitere „spacer“-Region (Spacer-2) und die 5S rRNA (Abb. 5-2) (GÜRTLER und STANISICH, 1996; LEWIN, 1998). Die ribosomalen rRNA-Gene sind für alle Organismen überlebenswichtig und im Reich der Bakterien hoch konserviert (WOESE, 1987; AMANN et al., 1995). Die 16S-23S rRNA-ISR, die die 16S und die 23S rRNA verbindet, spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der RNA.

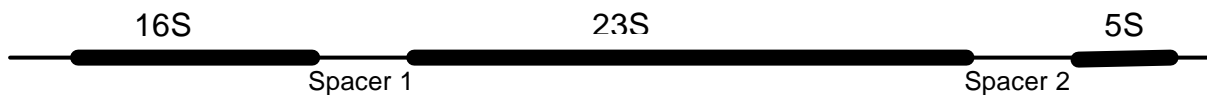


Abb. 5-2: Schematische Darstellung eines typischen rRNA-Operons nach KING et al. (1986)

Die Charakterisierung des 16S rRNA-Gens ist als Standardmethode zur Identifizierung von Spezies, Genera und Familien von Bakterien bereits etabliert. Dies spiegelt sich in der großen Anzahl an Informationen wieder, welche sich aufgrund von phylogenetischen Analysen von Mikroorganismen mit Hilfe dieses Gens bereits angesammelt haben (BARRY et al., 1991; KOSTMAN et al., 1992; JENSEN et al., 1993; EISEN, 1998). Im Gegensatz dazu wurde bisher relativ wenig über 23S rRNA-Gensequenzen berichtet, und weder dieses Gen, noch das 5S rRNA-Gen fanden bisher häufigen Einsatz in phylogenetischen Studien. Demgegenüber gibt es bereits zahlreiche Informationen über die Sequenz der 16S-23S rDNA-ISR. Diese Region ist bei den meisten Spezies wesentlich variabler als die der angrenzenden 16S rRNA- und der 23S rRNA-Gene, wobei es Variationen sowohl in

der Länge als auch in der Sequenz geben kann (FORSMAN et al., 1995; MENDOZA et al. 1998).

Eine Amplifizierung von 16S rRNA-spezifischen Genabschnitten zur PCR-vermittelten Identifizierung von Staphylokokkenspezies unter Verwendung von speziesspezifischen Oligonukleotidprimern wurde bereits von SARUTA et al. (1995), MONDAY und BOHACH (1999) und JAFFE et al. (2000) beschrieben.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten unter Verwendung der von MONDAY und BOHACH (1999) beschriebenen Oligonukleotidprimer, durch die Amplifizierung von 16S rRNA-spezifischen Genabschnitten, alle 87 Kulturen als *S. aureus* identifiziert werden.

In weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde das 23S rRNA-Gen zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* verwendet. Unter Nutzung der von STRAUB et al. (1999) beschriebenen Oligonukleotidprimer waren ebenso alle 87 untersuchten Isolate als *S. aureus* identifizierbar. STRAUB et al. (1999) verglichen das 23S rRNA-Gen von *S. aureus*-Isolaten mit anderen Staphylokokkenspezies und fanden bei *S. aureus*, *S. carnosus*, *S. piscifermentans*, *S. condimentii* und *S. epidermidis* Variationen in der Sequenz. LÄMMLER et al. (2000) und AKINEDEN et al. (2001) verwendeten ebenso 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 mit diesen Oligonukleotidprimern keine Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies feststellen.

Sowohl das 16S rRNA-Gen wie auch das 23S rRNA-Gen ermöglichten eine Identifizierung von *S. aureus*, waren aber, aufgrund fehlender Genpolymorphismen, nicht zur Genotypisierung der Kulturen geeignet.

FORSMAN et al. (1997) differenzierten sechs unterschiedliche Staphylokokkenspezies, darunter auch *S. aureus*, unter Verwendung unterschiedlicher speziesspezifischer Oligonukleotidprimer aus dem Bereich der 16S-23S rDNA-ISR mittels PCR. MENDOZA et al. (1998) amplifizierten ebenso diese Region mittels PCR. Dies ermöglichte den Autoren eine Unterscheidung von 31 verschiedenen Staphylokokkenspezies, darunter auch *S. aureus*. Unter Verwendung der von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer konnten ANNEMÜLLER et al. (1999) bei 25 *S. aureus*-Isolaten Größenpolymorphismen dieser Region nachweisen.

Bei den untersuchten *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Arbeit ergaben sich ebenfalls Genpolymorphismen in diesem Bereich. Dabei waren einzelne Amplikons mit Größen von 520, 420 und 380 Bp und gemeinsam auftretende Amplikons mit Größen von 520 und 380 Bp nachweisbar. Die Genpolymorphismen zeigten teilweise Beziehungen zu den bereits beschriebenen Abstammungslinien. So war bei allen Kulturen der Abstammungslinien LC, LD, LG und LI eine Amplikongröße von jeweils 420, 520, 420 und 520 Bp nachweisbar. Innerhalb der *S. aureus* der Abstammungslinie LA zeigten 34 Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 520 Bp und eine Kultur zwei Amplikons mit einer Größe von 520 und 380 Bp. Vergleichbare Variationen wurden auch bei den drei Kulturen der Abstammungslinie LB festgestellt, wobei bei drei Kulturen eine Amplikongröße von 420 Bp und bei einer Kultur eine Amplikongröße von 520 Bp nachweisbar war. Innerhalb der beiden Kulturen der Abstammungslinie LH waren ebenso zwei Amplikons mit Größen von 380 bzw. 520/380 Bp zu beobachten. Alle *S. aureus*-Kulturen aus der Abstammungslinie LE erwiesen sich unter Verwendung der beschriebenen 16S-23S rDNA-spezifischen Oligonukleotidprimer als negativ. Dies könnte auf Sequenzvariationen dieser Stämme im Bereich der Primeransatzstelle zurückzuführen sein. Die

Größenvariationen der 16S-23S rDNA-ISR einiger *S. aureus* innerhalb einer Abstammungslinie weisen ebenso auf Sequenzvariationen dieser Stämme in diesem Bereich hin und können als Zeichen der fortschreitenden Evolution bewertet werden.

*S. aureus* bildet zahlreiche mutmaßliche Virulenzfaktoren, die als konstante oder variierende Eigenschaften bei dieser Spezies auftreten. Die Auffindung dieser zellwandassoziierten oder auch extrazellulären Substanzen wird von klinisch-mikrobiologischen Labors zur Identifizierung und Differenzierung von Staphylokokken, insbesondere von *S. aureus*, eingesetzt und kann möglicherweise eine Erklärung für das jeweilige Krankheitsbild geben. Ein Hauptnachteil dieser konventionellen Verfahren liegt in der zuvor häufig notwendigen Reindarstellung des zu identifizierenden Mikroorganismus, in falsch negativen Ergebnissen aufgrund verminderter Expression der jeweiligen zellwandgebundenen oder extrazellulären Substanzen oder auch in einer mangelnden Empfindlichkeit des Nachweissystems. Zur Umgehung dieser Probleme eignet sich der Nachweis der Gene, die die jeweiligen Substanzen kodieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Thermonuclease-Gen *nuc* bei allen 87 *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. Das Gen wies keine Polymorphismen auf. Das Thermonuclease-Gen *nuc* wurde bereits von KOVACEVIC et al. (1985) sequenziert. BRAKSTAD et al. (1992) konnten ebenso zeigen, dass sich der Nachweis des *nuc*-Gens zur molekularen Identifizierung von *S. aureus* eignet.

Die Amplifizierung des Cumping-Factor-kodierenden Gens *clfA* mit den nach STEPHAN et al. (2000) beschriebenen Oligonukleotidprimern, die nach der von McDEVITT et al. (1994) beschriebenen Gensequenz erstellt worden waren, ergab bei 86 Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 1000 Bp und bei einer Kultur eine



Größe von 900 Bp. Da beide verwendeten Oligonukleotidprimer auf einer konstanten Region des Gens ansetzen, könnte diese Variation aufgrund einer Deletion eines Genabschnitts entstanden sein. AKINEDEN et al. (2001) verwendeten, bei der Untersuchung von 103 *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden, ebenso diese *clfA*-spezifischen Oligonukleotidprimer und erhielten auch Amplikongrößen von 900 und 1000 Bp. STEPHAN et al. (2000) fanden bei 34 untersuchten *S. aureus*-Kulturen eine einheitliche Amplikongröße des *clfA*-Gens von 1000 Bp. HASSAN (2002) konnte mit den verwendeten Oligonukleotidprimern keine Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies feststellen. Der Nachweis des Gens *clfA* erwies sich somit ebenso als konstante Eigenschaft von *S. aureus* und als weitere Möglichkeit zur Identifizierung dieser Spezies.

Wie bereits beschrieben dient die Koagulase in mikrobiologischen Labors als ein Hauptkriterium zur Differenzierung von *S. aureus* von koagulasenegativen Staphylokokken. Eine Amplifizierung des Gens *coa* kann ebenso zur Identifizierung und darüber hinaus auch zur Genotypisierung von *S. aureus* eingesetzt werden. Unter Verwendung der von HOOKEY et al. (1998) beschriebenen Oligonukleotidprimer *coa-I* und *coa-II* konnte zunächst bei allen 87 *S. aureus*-Kulturen dieser Arbeit das *coa*-Gen amplifiziert werden. Dabei waren fünf unterschiedliche Amplikongröße von 500, 590, 660, 820 und 900 Bp, entsprechend nach dem unter [4.3](#) bereits dargestellten Genaufbau, vier, fünf, sechs, acht und neun „Repeats“, feststellbar. HASSAN (2002) konnte zeigen, dass diese Oligonukleotidprimer zu keinen Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenkontrollstämmen führten. AKINEDEN et al. (2001) untersuchten, unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer, 103 *S. aureus*-Kulturen und konnten Amplikongröße von 440 bis 840 Bp nachweisen.

Die Genpolymorphismen des *coa*-Gens zeigten eindeutige Beziehungen zu den bereits beschriebenen Abstammungslinien. So war bei allen Kulturen der Abstammungslinien LB, LC, LE, LF, LG und LI eine Amplikongröße von jeweils 820, 820, 660, 660, 590 und 660 Bp nachweisbar. Dagegen zeigten innerhalb der Abstammungslinie LA 34 Kulturen eine Amplikongröße von 590 Bp und eine Kultur eine Amplikongröße von 660 Bp. Vergleichbare Variationen wurden auch bei den drei Kulturen der Abstammungslinie LD festgestellt, wobei für zwei Kulturen eine Amplikongröße von 500 Bp und bei einer Kultur eine Amplikongröße von 590 Bp nachweisbar war. Innerhalb der beiden Kulturen der Abstammungslinie LH waren ebenso zwei Amplikongrößen von 820 und 900 Bp zu beobachten. Diese Variationen könnten auf Deletion oder Neukombination einzelner „Repeats“ zurückzuführen sein und erneut als Fortsetzung der Evolution bakterieller Virulenzfaktoren verstanden werden.

In weiteren erfolgte mit den von FRÉNEY et al. (1996) beschriebenen Oligonukleotidprimern die Amplifizierung des Genabschnitts, der die X-Region des Gens *spa* kodiert. Der Gennachweis in diesem Bereich ergab neun unterschiedliche Amplikongröße von 100, 130, 180, 220, 250, 270, 290, 310 und 340 Bp, entsprechend, nach dem unter [4.3](#) bereits dargestellten Genaufbau zwei, drei, fünf, sieben, acht, neun, zehn, elf und zwölf „Repeats“. HASSAN (2002) konnte bereits unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies beobachten und vier verschiedene Amplikongrößen von 100, 200, 280 und 300 Bp nachweisen. AKINEDEN et al. (2001) beschrieben 10 verschiedene Amplikongrößen von 90, 110, 140, 170, 190, 220, 240, 270, 290 und 300 Bp. Polymorphismen dieses Genabschnitts wurden ebenso von TOSHKOVA et al. (1997) und ANNEMÜLLER et al. (1999) beobachtet.

Die Genpolymorphismen des die X-region-kodierenden Teils des *spa*-Gens zeigten ebenso eindeutige Beziehungen zu den bereits beschriebenen Abstammungslinien. So war bei allen Kulturen der Abstammungslinien LA, LC, LD, LE, LF, LG und LI eine Amplikongröße von 100, 290, 220, 290, 270, 250 und 130 Bp nachweisbar. Bei den fünf Kulturen der Abstammungslinie LB war dagegen bei vier Kulturen eine Amplikongröße von 310 Bp und bei einer Kultur eine Amplikongröße von 220 Bp nachweisbar. Vergleichbare Variationen konnte bei den beiden Kulturen der Abstammungslinie LH beobachtet werden, wobei bei einer Kultur eine Amplikongröße von 180 Bp und der anderen Kultur eine Amplikongröße von 340 Bp vorhanden waren. Auf das Auftreten von Genvariationen bei Kulturen einer Abstammungslinie, möglicherweise verursacht durch Deletion oder Insertion, wurde bereits bei der Besprechung des *coa*-Gens hingewiesen.

Bei der Amplifizierung des die IgG-bindende-Region-kodierenden Teils des Gens *spa* wiesen 9,2% der untersuchten Isolate ein Amplikon mit einer Größe von 720 Bp, entsprechend vier IgG-bindende Einheiten und 90,8% der Kulturen ein Amplikon mit einer Größe von 920 Bp, entsprechend fünf IgG-bindende Einheiten, auf. STEPHAN et al. (2000), AKINEDEN et al. (2001) und HASSAN (2002) fanden bei den meisten untersuchten *S. aureus*-Kulturen ebenso eine Amplikongröße von 920 Bp. HASSAN (2002) konnte darüber hinaus, unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer, keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokkenspezies beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten eindeutige Beziehungen zwischen den Genpolymorphismen des *coa*-Gens und des *spa*-Gens sowie den PFGE-Mustern. Kulturen mit gleichen oder ähnlichen PFGE-Mustern einer Abstammungslinie zeigten überwiegend die gleichen Genpolymorphismen.

Bei infektiösen Prozessen spielen Oberflächenproteine, die eine Adhäsion von Bakterien ermöglichen, eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren. *S. aureus* besitzt verschiedene zur Adhäsion beitragende Bindungsproteine. Von besonderer Bedeutung sind darunter das kollagenbindende Protein CNA (SNODGRASS et al., 1999) und die fibronectinbindenden Proteine FnBPA und FnBPB (RYDEN et al., 1983).

Nach Angaben zahlreicher Autoren (SMELTZER et al., 2000; BOOTH et al., 2001; MOORE und LINDSAY, 2001) ist das CNA-kodierende Gen *cna* nur vereinzelt bei *S. aureus* feststellbar. Korrespondierend dazu wurde dieses Gen mit seinen Genabschnitten *cnaA* und *cnaB* in der vorliegenden Arbeit nur bei neun *S. aureus*-Kulturen nachgewiesen. Bei der Amplifizierung des *cna*-Gen-Abschnitts B waren Genpolymorphismen mit Amplikongrößen von 600, 1200 und 1700 Bp nachweisbar. Dies weist, nach SWITALSKI et al. (1993) und nach dem unter 4.3 bereits dargestellten Genaufbau, auf ein „Repeat“, zwei bzw. drei „Repeats“ hin. Die positiven Kulturen waren den sporadischen Abstammungslinien LD, LF und LG zuzuordnen. Bei allen drei *S. aureus* der Abstammungslinie LG hatte der *cna*-Gen-Abschnitt B eine Größe von 1700 Bp. Bei den drei Kulturen der Abstammungslinie LD zeigte eine Kultur eine Amplikongröße von 1200 Bp und zwei Kulturen eine Amplikongröße von 1700 Bp. Vergleichbare Variationen wurden bei den zwei Kulturen der Abstammungslinie LI beobachtet, wobei bei einer Kultur eine Amplikongröße von 600 Bp und bei der anderen Kultur eine Amplikongröße von 1700 Bp nachweisbar war. Wie bereits für die Gene *coa* und *spa* beschrieben, könnten diese Größenunterschiede innerhalb einer Abstammungslinie durch genetische Ereignisse innerhalb der sich wiederholenden Einheiten dieses Gens erklärt werden. Nach SNODGRASS et al. (1999), sind Genmutanten, die keinen B Abschnitt des *cna*-Gens besitzen, trotzdem fähig, Kollagen zu binden. Das eher seltene Auftreten

dieses Gens bei den Untersuchungen der Kulturen der vorliegenden Arbeit könnte darauf hinweisen, dass dieses Bindungsprotein keine oder nur eine untergeordnete Bedeutung für eine Infektion der Milchdrüse hat.

Die FnBP von *S. aureus* spielen, nach LAMMERS et al. (1999), bei Rindermastitiden eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren. Sie führen zu einer vermehrten Adhäsion der Bakterien an Euterepithelien. Die FnBPA und FnBPB werden von den Genen *fnbA* und *fnbB* kodiert. Ein Sequenzvergleich der FnBPA- und FnBPB-Proteine zeigt eine Aminosäureidentität von 94% (SIGNÄS et al., 1989; JONSSON et al., 1991). Laut GREENE et al. (1995), haben Genmutanten, die entweder kein FnBPA- oder kein FnBPB-Protein besitzen, gleiche Bindungsaktivitäten für Fibronectin.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte das FnBPA-kodierende Gen *fnbA* bei allen 87 untersuchten *S. aureus*-Kulturen nachgewiesen werden. Bei der Amplifizierung des FnBPB-kodierenden Gens *fnbB* waren nur 37 (42,5%) der *S. aureus*-Kulturen positiv. Das *fnbB*-Gen war bei den zwei *S. aureus*-Kulturen der sporadischen Abstammungslinie LH feststellbar, darüber hinaus bei 35 *S. aureus*-Kulturen der vorherrschenden Abstammungslinie LA, wobei sich eine Kultur dieser Abstammungslinie als negativ erwies. Ein vergleichbares Fehlen des *fnbB*-Gens bei Kulturen einer Abstammungslinie beobachteten BOOTH et al. (2001) bei *S. aureus*-Kulturen, isoliert vom Menschen. Diese Autoren konnten innerhalb einer Abstammungslinie bei 20 Kulturen eine positive und bei einer Kultur eine negative *fnbB*-Reaktion feststellen. Die fehlende *fnbB*-Reaktion dieser Stämme und auch bei der *S. aureus*-Kultur der Abstammungslinie LA der vorliegenden Untersuchungen könnte auf Sequenzvariationen im Bereich der Primeransatzstellen zurückzuführen sein. Innerhalb der fünf Kulturen der Abstammungslinie LB war dieses Gen nur bei einer Kultur nachweisbar. Alle *S. aureus*-Kulturen der vorherrschenden

Abstammungslinie LE und der sporadischen Abstammungslinien LC, LD, LF, LG und LI waren negativ. Das zusätzliche Vorkommen von FnBPB bzw. *fnbB*, gemeinsam mit dem regelmäßig vorkommenden FnBPA bzw. *fnbA*, scheint für die Ausbreitung von *S. aureus*-Kulturen in Milchviehbetrieben nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

In der vorliegenden Arbeit waren 12,6% der *S. aureus*-Kulturen positiv für das Polysaccharidkapsel Typ 5-kodierende Gen *cap5* und 87,4% positiv für das Polysaccharidkapsel Typ 8-kodierende Gen *cap8*. MOORE und LINDSAY (2001) beobachteten, bei 42 methicillinempfindlichen *S. aureus*-Kulturen, isoliert vom Menschen, bei 35,7% der Isolate das Gen *cap5* und bei 61,9% der Kulturen das Gen *cap8*. Das prozentuale Auftreten der Gene *cap5* und *cap8* bei den *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen zeigte somit eine ähnliche Verteilung dieser Kapselserotypen. Laut TOLLERSRUD et al. (2000) ist das Vorkommen von *cap5*- und *cap8*-Genen nicht immer mit einer nachweisbaren Kapselbildung verbunden. Diese Autoren konnten bei 50 *S. aureus*-Kulturen, die durch Serotypisierung mittels Antikörpern gegenüber Polysaccharidkapsel-Typ 5 und -Typ 8 keine Reaktionen zeigten, nachweisen, dass das *cap5*-Gen bei 48 Kulturen und das *cap8*-Gen bei zwei Kulturen vorhanden war.

Die für die Typ 5- und Typ 8-Kapselbildung verantwortlichen Gene *cap5* und *cap8*, mit dem unter [4.3](#) bereits dargestellten Genaufbau, wurden von SAU et al. (1997) vergleichend untersucht. Strukturell bestehen die *cap5*- und *cap8*-Gene aus 16 offenen Leserahmen (ORF-A bis -P). Das Fehlen der Polysaccharidkapsel Typ 5 bei *cap5*-Gen-positiven Kulturen könnte, nach TOLLERSRUD et al. (2000), auf eine Mutation des *cap5*-ORF-E zurückzuführen sein. Unter Laborbedingungen hängt die Kapselproduktion von *S. aureus* von verschiedenen Faktoren, wie Sauerstoffmenge

oder Aminosäuregehalt des Mediums, ab (BRÜCKLER et al., 1994; HERBERT et al., 1997).

Bekapselte *S. aureus*-Kulturen haben eine höhere Resistenz gegenüber Phagozytose (POOLMAN, 1990). Kulturen mit geringerer Bekapselung ließen sich, nach SOMPOLINSKI et al. (1985) und HOCHKEPPEL et al. (1987), überwiegend den Serotypen 5 und 8 zuordnen. Die Serotypen 5 und 8 kommen häufig bei *S. aureus*, isoliert aus Milchproben, vor. Dies konnte durch verschiedene Studien bestätigt werden. TOLLERSRUD et al. (2000) untersuchten die Kapselserotypen von 274 *S. aureus*-Isolaten aus Milchproben aus Europa (Dänemark, Schweden, Finnland, Island und Irland) und von 362 *S. aureus*-Isolaten aus Milchproben aus den USA. Bei den *S. aureus* aus Europa hatten 12% der Kulturen den Serotyp 5 und 51% der Kulturen den Serotyp 8. Bei den Kulturen aus den USA fanden die Autoren 15% der Kulturen positiv für Serotyp 5 und 27% der Kulturen positiv für Serotyp 8. In der Arbeit von GUIDRY et al. (1997) zeigten *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus Milchproben von fünf Staaten der USA, einige Variationen der Kapselserotypen. Dabei hatten von den Isolaten aus New York 20% den Serotyp 5 und 36% den Serotyp 8, von den Isolaten aus Michigan 12% den Serotyp 5 und 19% den Serotyp 8, von den Isolaten aus Wisconsin 26% den Serotyp 5 und 27% den Serotyp 8, von den Isolaten aus Texas 8% den Serotyp 5 und 10% den Serotyp 8 und von den Isolaten aus Kalifornien 18% den Serotyp 5 und 21% den Serotyp 8.

Das variable Auftreten der Gene *cap5* und *cap8* innerhalb der *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Untersuchungen ermöglichte ebenso eine Genotypisierung der Kulturen. Alle *S. aureus* der vorherrschenden Abstammungslinien LA und LE erwiesen sich, mit einer hohen Signifikanz ( $P < 0,0001$ ), als positiv für *cap8*. Bei den Kulturen der sporadischen Abstammungslinien waren darüber hinaus alle *S. aureus* der Abstammungslinien LB und LC *cap8* positiv,

solche der Abstammungslinien LD, LF, LG, LH und LI positiv für *cap5*. Das *cap5*-Gen wies hinsichtlich des Vorkommens bei den sporadischen Abstammungslinien eine hohe Signifikanz auf ( $P < 0,0001$ ).

Das gemeinsame Auftreten der Gene *cap5* und *cna* erwies sich ebenso als signifikant ( $P < 0,001$ ). Alle Stämme, die positiv für *cap8* waren, waren negativ für *cna*. Vergleichbare Zusammenhänge konnten auch MOORE und LINDSAY (2001) bei der Untersuchung von *S. aureus*, isoliert vom Menschen, beobachten. Dies stand im Gegensatz zu den Untersuchungen von RYDING et al. (1997) und BOOTH et al. (2001). Diese Autoren fanden, bei *S. aureus*, isoliert vom Menschen, signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Gene *cap8* und *cna*. Dem signifikant hohen Auftreten von *cap8* bei vorherrschenden Abstammungslinien könnte eine Bedeutung als Charakteristikum von *S. aureus* solcher Abstammungslinien haben.

Die Synthese der Virulenzfaktoren erfolgt bei *S. aureus* mit Hilfe eines übergeordneten Regulationssystems (RECSEI et al., 1985). Dieses mit „accessory gene regulator“ bezeichnete Regulatorsystem wurde von PENG et al. (1988) kloniert und sequenziert. Das *agr*-Gen-Produkt fördert in der späten exponentiellen Phase die Bildung von vielen Exoproteinen wie z.B. Toxinen, Hämolytinen und Enzymen. Dagegen wird die Bildung von zellwandgebundenen Virulenzfaktoren wie z.B. das Protein A und das fibronectinbindende Protein aber auch die nicht zellwandgebundene Koagulase bei *S. aureus* in der frühen exponentiellen Phase produziert und vom *agr*-Gen-Produkt reprimiert (LINDBERG et al., 1990).

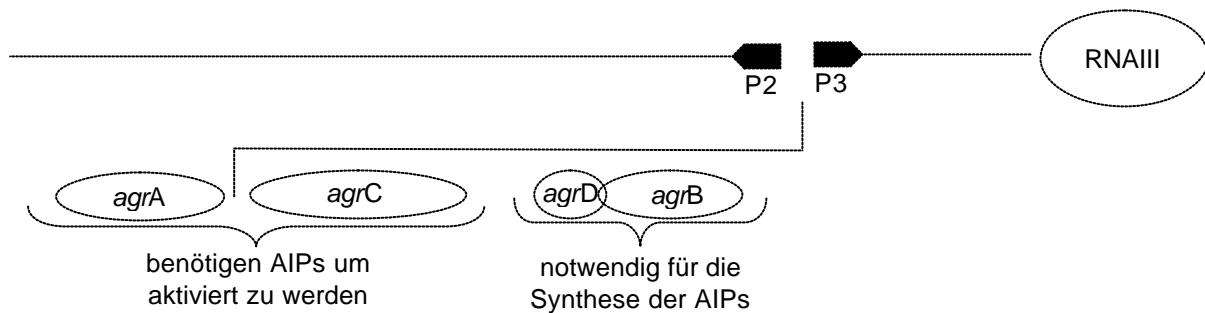
Der *agr*-Genort besteht aus zwei Operons (P2 und P3) mit entgegengesetzten Transkriptionsrichtungen (Abb. 5-3). Das Operon P2 enthält vier Gene (*agrA*, B, C und D) und wird von Promoter P2 transkribiert (KORNBLUM et al., 1990). Die *agrA* und *agrC*-Gene sind zwei Komponenten des klassischen „pathway“-Transduktionsignals, wobei *agrC* den Signalrezeptor und *agrA* den Antwortregulator



kodieren (NOVICK et al., 1995). Die *agrB* und *agrD*-Gene produzieren gemeinsam kleine Peptide, die sogenannten „autoinducing“-Peptide (AIPs), die an *agrC* binden und dieses Gen aktivieren (JI et al., 1995). Die primäre Rolle von *agrA* und *agrC* liegt in der „up“-Regulation der beiden P2- und P3-*agr*-Promotoren. Dieser Schritt wird in Verbindung mit einem zweiten Transkriptionsfaktor, das sogenannte „DNA-binding“-Protein (SarA), durchgeführt (NOVICK et al., 1995). Das SarA-Protein ist das primäre Produkt des „staphylococcal accessory regulator“-Genlocus (*sar*) (BLEVINS et al., 1999).

Das P3 Operon kodiert das RNA-Molekül III (RNAlII), welches für die „up-Regulation“ der extrazellulären Proteine und für die „down-Regulation“ der zellwandgebundenen Proteine während der Transkriptionsphase verantwortlich ist (JI et al., 1995). Das P3 Operon kodiert ebenso das  $\delta$ -Hämolysin, welches jedoch keine Rolle innerhalb des Regulationssystems spielt (NOVICK und MUIR, 1999).

Die P2- und P3-*agr*-Promotoren werden unterschiedlich reguliert. Sie zeigen eine schwache Aktivität in der frühen exponentiellen Phase und eine starke Aktivität in der späten Wachstumsphase (VANDENESCH et al., 1991a). Ein dritter schwacher konstitutioneller Promotor (P1) ist innerhalb des Operons P2, unmittelbar vor dem *agrA*-Gen, lokalisiert. Seine genaue Funktion innerhalb dieses Systems ist bislang nicht bekannt (NOVICK et al., 1993).



**Abb. 5-3:** Schematische Darstellung des *agr*-Systems nach NOVICK und MUIR (1999). Das Operon P2 enthält vier Gene (*agrA*, B, C und D) und wird vom Promoter P2 aus transkribiert. Die *agrA* und *agrC*-Gene kodieren den Antwortregulator und den Signalrezeptor. Die primäre Rolle von *agrA* und *agrC* liegt in der „up“-Regulation der beiden P2- und P3-*agr*-Promotoren. Die *agrB* und *agrD*-Gene produzieren gemeinsam die AIPs, die an *agrC* binden und dieses Gen aktivieren. Das P3 Operon kodiert RNAIII, welches verantwortlich für die „up-Regulation“ der extrazellulären Proteine und für die „down-Regulation“ der zellwandgebundenen Proteine ist.

Jl und NOVICK (1997) zeigten bei ca. 400 *S. aureus*-Stämmen und auch bei anderen Staphylokokkenspezies, dass die meisten Stämme AIPs für die Aktivierung der RNAIII-Transkription produzierten und absonderten. Jedoch hemmten die AIPs eines Stamms oder einer Spezies die Aktivierung der RNAIII-Transkription anderer Stämme oder anderer Spezies. Dies weist auf eine neuartige bakterielle Interferenz hin, da die Hemmung der Produktion der Virulenzfaktoren stärker betroffen ist als das Zellwachstum. Ein Vergleich von *agrB*, C und D verschiedener *S. aureus*-Stämme auf Aminosäureebene zeigte, dass bei diesen Genen sowohl konservierte als auch variable Regionen enthalten sind. Die variablen Aminosäureregionen sind

u.a. für die Spezifität der AIPs und den Wechselwirkungen zwischen dem *agrC*-Rezeptor und ihren Liganden verantwortlich. Aufgrund dieser Variabilität innerhalb der Aminosäureregionen und der damit verbundenen Spezifität von *agrB*, *C* und *D* lassen sich die *S. aureus* in die vier Gruppen *agrI* bis *IV* einteilen. Die Mitglieder einer *agr*-Gruppe aktivieren über ihre AIPs jeweils die RNAIII-Transkription der Stämme der gleichen Gruppe, hemmen aber andererseits die RNAIII-Transkription anderer *agr*-Gruppen. Laut NOVICK et al. (1993) werden die AIPs aber auch von anderen Staphylokokkenspezies gebildet, die die RNAIII-Transkription von *S. aureus* aller vier *agr*-Gruppen hemmt.

Das Auftreten der *agr*-Gene I bis III innerhalb der *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Arbeit erwies sich als variabel. Diese Variation ermöglichte ebenso eine Genotypisierung der *S. aureus*. Alle Stämme der vorherrschenden Abstammungslinien, nicht aber solche der sporadischen Abstammungslinien, erwiesen sich als positiv für das Gen *agrII*. Eine hoch signifikante Beziehung war darüber hinaus zwischen dem Auftreten des *agrII*-Gens und der Gene *fnbB* und *cap8* ( $P = 0,0005$  und  $P < 0,0001$ ) und zwischen *agrI* bis III negativen Kulturen und dem Auftreten von *cna* und *cap5* ( $P = 0,0001$  und  $P < 0,0001$ ) zu beobachten. Das vermehrte gemeinsame Auftreten der Gene *agrII* und *cap8* bei den vorherrschenden Abstammungslinien könnte eine Bedeutung für die Ausbreitung einzelner *S. aureus*-Klone im Mastitisgeschehen haben.

Der Nachweis der für das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyisin verantwortlichen Gene *hla* und *hlb* ergab für *hla* bei 86 (98,9%) *S. aureus*-Kulturen und für *hlb* bei 84 (96,6%) Kulturen eine positive Reaktion. Laut O'REILLY et al. (1990) ist das Vorkommen von *hla* nicht immer mit einer nachweisbaren Bildung des  $\alpha$ -Hämolyisins verbunden. Dies konnte nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine  $\alpha$ -

Hämolyse war, nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode (3.3.4) zur Unterscheidung der Hämolyseformen, bei 84 (96,6%) der Kulturen nachweisbar. Bei zwei *hla*-positiven Kulturen konnte ausschließlich eine  $\beta$ -Hämolyse beobachtet werden. Die einzige *hla*-negative Kultur der vorliegenden Arbeit wies eine  $\delta$ -like-Hämolyse auf. Vergleichbare Unterschiede zwischen dem Gennachweis und dem Auftreten eines Hämolsins war für das Gen *hlb* feststellbar. Eine  $\beta$ -Hämolyse war, nach der von SKALKA et al. (1979) beschriebenen Methode (3.3.4) zur Unterscheidung der Hämolyseformen, bei 73 (83,9%) Kulturen nachweisbar, wobei bei 13 Kulturen, die positiv für das Gen *hlb* waren, phänotypisch ausschließlich eine  $\alpha$ -Hämolyse erkennbar war. Bei drei Kulturen der vorliegenden Arbeit, die eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse zeigten, konnte das *hlb*-Gen nicht amplifiziert werden.

Das Auftreten von phänotypisch  $\beta$ -Hämolsin-positiven aber genotypisch *hlb*-negativen *S. aureus*-Kulturen könnte auf Sequenzvariationen der Primeransatzstelle zurückzuführen sein, die eine Amplifizierung des Gens *hlb* verhinderte. Die Gene *hla* und *hlb* bzw. das Auftreten einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse scheint, nach den Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, ebenso typisch für *S. aureus*, isoliert aus Mastitismilchproben von Brasilien, zu sein.

Die *S. aureus*-Kulturen der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus auf das Vorkommen von Enterotoxingenen und auch weiteren Toxingenen untersucht. Dabei konnten vermehrt die häufig gemeinsam auftretenden Toxingene *seg* und *sei* und vereinzelt auch das Toxingen *seh* nachgewiesen werden. Die Gene *seg* und *sei* waren ohne statistische Signifikanz bei vorherrschenden und sporadischen Abstammungslinien nachweisbar. Bei keiner der untersuchten *S. aureus*-Kulturen konnten die Gene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, sowie *tst*, *eta* oder *etb* nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen waren Enterotoxine bzw. Enterotoxingene bei *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden im Bundesstaat São Paulo, Brasilien, eher selten nachweisbar. NADER FILHO et al. (1988) beobachteten bei 32 untersuchten *S. aureus*-Kulturen, ebenso isoliert von Rindermastitiden im Bundesstaat São Paulo, Brasilien, die Bildung von Enterotoxin B bei einer Kultur. LOPES et al. (1990) beschrieben bei *S. aureus*-Kulturen, isoliert im Bundesstaat São Paulo, Brasilien, 4,7% Enterotoxin C-bildende Kulturen. Die genannten Autoren untersuchten ihre Kulturen jedoch nicht hinsichtlich der neu beschriebenen Enterotoxine G, H und I, die in den vorliegenden Untersuchungen miteinbezogen wurden.

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 bezeichneten dies als „enterotoxic gene cluster“ (*egc*). Innerhalb der neu beschriebenen Enterotoxine G bis O scheint von besonderer Bedeutung zu sein, obwohl hierzu bislang nur sehr wenige Arbeiten vorliegen, insbesondere der *egc*-Komplex. Der *egc*-Komplex wurde als ein Element der Genominsel vSaß beschrieben (BABA et al., 2002). Die Gene *seg* und *sei* traten, wie aufgrund des gemeinsamen Vorkommens beider Gene auf einer Pathogenitätsinsel zu erwarten, in den vorliegenden Untersuchungen überwiegend gemeinsam auf. Bei einer *S. aureus*-Kultur war das Gen *sei* allerdings nur alleine nachweisbar. Dies könnte auf eine Variation innerhalb der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel dieses Stammes oder auf Sequenzvariation der Primeransatzstellen der *seg*-spezifischen Primer zurückzuführen sein. Über das Auftreten von *sem*, *sen* und *seo* liegen bislang noch keine Ergebnisse vor. Die Gene *seg* und *sei* konnten bereits bei *S. aureus*, isoliert aus Milchproben mastitiskranker Kühe, nachgewiesen werden (AKINEDEN et al., 2001). OMOE et al. (2002) konnten allerdings zeigen, dass bei *S. aureus*-Kulturen,

isoliert vom Menschen und aus Milchproben, die diese beiden Gene besaßen, keine oder nur eine geringe Enterotoxinbildung messbar war. Aus diesem Grund ist die Bedeutung dieser neu beschriebenen Enterotoxine für die Euterpathogenität bislang noch unklar.

Das Toxingen *seh* war nur bei drei Kulturen der Abstammungslinie LD 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 die Expression von SEH nachweisen. Im Affenversuch hatte, nach SU und WONG (1995), das gereinigte SEH in einem Zeitraum von 1,5 bis 3 h nach der Aufnahme eine emetische Wirkung. NILSSON et al. (1999), HAKANSSON et al. (2000) und PETERSSON et al. (2001) beschrieben SEH als ein T-Zellmitogen, welches, verglichen mit allen beschriebenen Enterotoxinen, die höchste Affinität zu MHC-Klasse II-Molekülen besitzt. Die Bedeutung des nach den vorliegenden Untersuchungen eher vereinzelt aufgetretenen Gens *seh* für die Euterpathogenität ist bislang ebenfalls noch unklar.

MONDAY und BOHACH (1999) wiesen bereits mittels „Multiplex-PCR“ gleichzeitig mehrere SE-Gene nach. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mit den von diesen Autoren beschriebenen Oligonukleotidprimern ebenso durchgeführt werden; dabei war ein Nachweis von *seg*, *seh* und *sei* mit Hilfe der „Multiplex-PCR“ gleichzeitig möglich. Wie bereits bei den zuvor beschriebenen PCR-Ergebnissen gezeigt, traten die Gene *seg* und *sei*, bis auf eine *sei*-positive Kultur, gemeinsam auf.

Die *S. aureus*-Kulturen wurden ferner hinsichtlich des Gens *set1*, das ein SET kodiert, untersucht, wobei 85 (97,7%) Kulturen positiv und nur zwei (2,3%) Kulturen negativ waren. Dieses vermehrte Vorkommen könnte darauf hinweisen, dass diese Proteine eine Rolle als Virulenzfaktoren auch bei der Mastitis des Rindes spielen. Die *set*-Gene können mit bis zu 10 Varianten auf einer Pathogenitätsinsel vorkommen

(KURODA et al., 2001; BABA et al., 2002). Die *in vitro* Wirkung des SET1-Proteins wurde von WILLIAMS et al. (2000) geprüft. Diese Autoren zeigten, dass dieses Protein die Produktion von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und Tumor-Necrosis-Alpha von mononukleären Zellen des Menschen stimuliert.

#### **5.4 Schlußfolgerungen**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *S. aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermasitiden im Staat São Paulo, Brasilien, wiesen hinsichtlich phänotypischer und genotypischer Eigenschaften die weltweit vorkommenden Merkmale dieser Spezies auf. Dies zeigte sich unter anderem in dem Vorkommen und auch in den Genpolymorphismen zahlreicher mutmaßlicher Virulenzgene. Diese Merkmale zeigten im weiteren, gemeinsam mit den Ergebnissen des „DNA-Fingerprinting“, dass nur eine geringe Zahl gleicher oder nahe verwandter Bakterienklone für die Mastitissituation der jeweiligen Betriebe und, übergreifend, für Betriebe mehrerer Bezirke verantwortlich waren. Eine Erkennung dieser epidemiologischen Situation und mutmaßlicher Übertragungswege zwischen den Betrieben kann zu einer zukünftigen Sanierung der Betriebe und zu einer Steigerung der Tiergesundheit und der Wirtschaftlichkeit der Milchgewinnung in Brasilien beitragen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Im vorliegenden wurden 87 *S. aureus*-Kulturen, isoliert aus Milchproben von 87 an subklinischer Mastitis erkrankter Kühe 23 verschiedener Betriebe von sechs unterschiedlichen Bezirken des Bundesstaats São Paulo, Brasilien, untersucht. Aufgrund von phänotypischen Eigenschaften und durch PCR-vermittelte Amplifizierung von speziesspezifischen Genabschnitten des 16S rRNA- und des 23S rRNA-Gens, des Thermonuclease-Gens *nuc*, des Clumping-Factor-Gens *clfA*, des Koagulase-Gens *coa* und des Protein A-Gens *spa* konnten alle 87 Isolate der Spezies *S. aureus* zugeordnet werden. Bei der Amplifizierung der Gene *clfA*, *coa* und *spa* traten Genpolymorphismen auf, die eine Genotypisierung der *S. aureus* einzelner Betriebe ermöglichten. Die isolierten *S. aureus* wurden im weiteren durch Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA der Kulturen und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels PFGE untersucht. Dabei konnten 26 DNA-Restriktionsmuster (MA1-MA7, MB1-MB4, MC1 und MC2, MD1 und MD2, ME1-ME6, MF, MG, MH, MI1 und MI2), die sich zu neun Abstammungslinien (LA-LI) zusammenfassen ließen, unterschieden werden. Die beiden Abstammungslinien LA und LE waren durch 63 (72,2%) Isolate repräsentiert und konnten in allen sechs Bezirken des Bundesstaats São Paulo nachgewiesen werden. Eine weitergehende Charakterisierung der Kulturen war durch PCR-vermittelten Nachweis der überwiegend auftretenden Gene *fnbA* (100%), *cap8* (87,4%) und *agrII* (72,4%) bzw. der vereinzelt auftretenden Gene *cna* (10,3%), *fnbB* (42,5%), *cap5* (12,6%), *agrI* (14,9%) und *agrIII* (3,5%) möglich. Die *S. aureus*-Kulturen wurden ferner hinsichtlich des Vorkommens von Toxingenen untersucht. Hierbei konnten die Hämolyisingene *hla* (98,9%) und *hly* (96,6%), die Enterotoxingene *seg* (37,9%), *seh* (3,5%) und *sei* (39,1%) und das „Exotoxin-like“-Protein-Gen *setI* (97,7%) nicht aber die Toxingene



*sea, seb, sec, sed, see, sej, tst, eta* und *etb* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des „DNA-Fingerprinting“, die beschriebenen Genpolymorphismen und das Toxingenmuster zeigten, dass wenige spezialisierte Bakterienklone für die jeweilige Mastitissituation in den Betrieben bzw. in den sechs Bezirken des Bundesstaats São Paulo verantwortlich waren.

## 7 SUMMARY

In the present study 87 *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples from 87 cows with mastitis of 23 different farms in six different municipal districts of São Paulo State, Brazil, were investigated. According to phenotypical properties, and by PCR amplification of the genes encoding 16S rRNA and 23S rRNA, thermostable nuclease (*nuc*), Clumping-Factor (*clfA*), coagulase (*coa*) and protein A (*spa*) all 87 isolates of the present study could be identified as *S. aureus*. The amplification of the genes *clfA*, *coa* and *spa* displayed size polymorphisms and enabled a genotyping of the bacterial clones at the farm level. Genomic „DNA fingerprinting” patterns for the 87 *S. aureus* strains were generated by PFGE analysis. A total of 26 distinct patterns (MA1-MA7, MB1-MB4, MC1 and MC2, MD1 and MD2, ME1-ME6, MF, MG, MH, MI1 and MI2) resulted in nine *S. aureus* lineages (LA-LI). The most prevalent lineages, LA and LE, which accounted together 63 (72.2%) of the isolates, were collected from all of the six municipal districts of São Paulo State, Brazil. Further genotypic properties of the *S. aureus* isolates revealed that certain traits such as the genes *fnbA*, *cap8*, and *agrII* could be observed with almost all of the *S. aureus* isolates and were detected in 100%, 87,4%, and 72,4% of the strains, respectively. The genes *cna*, *fnbB*, *cap5*, *agrI* and *agrII* could be observed only for 10,3%, 42,5%, 12,6%, 14,9% and 3,5% of the strains, respectively. Toxin genes were also investigated and resulted in the detection of the haemolysin genes *hla* (98,9%) and *hlb* (96,6%), enterotoxin genes *seg* (37,9%), *seh* (3,5%) and *sei* (39,1%), and „Exotoxin-like“-Protein encoding gene *setI* (97,7%). None of the strains harboured the genes encoding *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *tst*, *eta* and *etb*. The results of DNA-fingerprinting, the gene polymorphisms and the toxin gene patterns revealed that some *S. aureus* lineages possess a capacity to cause infection and to disseminate

and that a limited number of clones seemed to be responsible for the cases of bovine mastitis on the various farms.

## 8 RESUMO

No presente estudo foram analisadas 87 amostras de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite subclínica, oriundas de 23 fazendas localizadas em seis municípios do Estado de São Paulo. Baseado em características fenotípicas e amplificando-se pela PCR fragmentos espécie-específicos dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, bem como da termonuclease (*nuc*), do Clumping-Factor“ (*clfA*), da coagulase (*coa*) e da Proteína A (*spa*), todas as 87 amostras puderam ser identificadas como *S. aureus*. A amplificação dos genes *clfA*, *coa* e *spa* resultou em polimorfismos, o que possibilitou uma tipagem genética das amostras entre as propriedades. As culturas foram ainda analisadas pela macrorestrição do DNA cromossomal e separação posterior dos fragmentos pela PFGE. Obteve-se 26 padrões de restrição do DNA (MA1-MA7, MB1-MB4, MC1 e MC2, MD1 e MD2, ME1-ME6, MF, MG, MH, MI1 e MI2), que puderam ser agrupados em nove linhagens (LA-LI). As linhagens LA e LE somadas representaram 72,2% com 63 amostras e puderam ser observadas nos seis municípios pesquisados. Adicionalmente foram analisadas outras características das culturas com a amplificação pela PCR dos genes *fnbA*, *cap8* e *agrII*, sendo estes encontrados em 100%, 87,4% e 72,4% das amostras, respectivamente. Os genes *cna*, *fnbB*, *cap5*, *agrI* e *agrIII* revelaram-se menos prevalentes, sendo estes amplificados em 10,3%, 42,5%, 12,6%, 14,9% e 3,5% das amostras, respectivamente. Foram amplificados também, os genes das hemolisinas *hla* e *hly*, os genes das enterotoxinas *seg*, *seh* e *sei*, bem como o gen *setI* da proteína „Exotoxin-like“, entre 98,9%, 96,6%, 37,9%, 3,5%, 39,1% e 97,7% das amostras, respectivamente. Não foram observadas reações positivas para os genes das toxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej*, *tst*, *eta* e *etb*. Verificou-se, pela análise dos padrões de macrorestrição do DNA, pela obtenção do polimorfismo genético e

---

pelo encontro dos gens de toxinas, que há um número limitado de clones especializados que são responsáveis pelos casos de mastite nas propriedades estudadas.

---

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- 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. Immunol. 44, 79-88
- ABRAHAM, E. P. und E. CHAIN (1940)  
An enzyme from bacteria able to destroy penicillin  
Nature 146, 837
- ABRAMSON, C. (1972)  
Staphylococcal enzymes  
In: Cohen, J. O., The Staphylococci, Wiley, Interscience, New York, USA
- ABRAMSON, C. und H. FRIEDMAN (1967)  
Enzymatic activity of primary isolates of staphylococci in relation to antibiotic resistance and phage type  
J. Infect. Dis. 117, 242-248
- 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. Diagn. Lab. Immunol. 8, 959-964
- AMANN, R. L., W. LUDWIG und K. H. SCHLEIFER (1995)  
Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation  
Microbiol. Rev. 59, 143-169
- ANFINSEN, C. B., P. CUATRECASAS und H. TANIUCHI (1971)  
Staphylococcal nuclease, chemical properties and catalysis  
In: Boyer, P., The Enzymes, 4, Academic Press, New York, USA, 177-204
- ANNEMÜLLER, C., C. LÄMMLER und M. ZSCHÖCK (1999)  
Genotyping of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis  
Vet. Microbiol. 69, 217-224
- ARBEIT, R. D., W. W. KARAKAWA, W. F. VANN und J. B. ROBBINS (1984)  
Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2, 85-91
- ARBUTHNOTT, J. P., D. C. COLEMAN und J. S. AZAVEDO (1990)  
Staphylococcal toxins in human disease  
J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl., 101S-107S

- ARVIDSON, S. O. (1983)  
Extracellular enzymes from *Staphylococcus aureus*  
In: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2, Academic Press, London/ New York, 745-808
- 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
- BAILEY, C. J., J. DE AZEVEDO und J. P. ARBUTHNOTT (1980)  
A comparative study of two serotypes of epidermolytic toxin from *Staphylococcus aureus*  
Biochim. Biophys. Acta 624, 111-120
- BARRY, T., G. COLLERRAN, M. GLENNON, L. K. DUNICAN und F. GANNON (1991)  
The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria  
PCR Methods Appl. 1, 51-56
- BAYLES, K. W. und J. J. IANDOLO (1989)  
Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D  
J. Bacteriol. 171, 4799-4806
- BELKUM, van, A., W. VAN LEEUWEN, M. E. KAUFMANN, B. COOKSON, F. FOREY, J. ETIENNE, R. GOERING, F. TENOVER, C. STEWARD, F. O'BRIEN, W. GRUBB, P. TASSIOS, N. LEGAKIS, A. MORVAN, N. E. SOLH, R. DE RYCK, M. STRUELENS, S. SALMENLINNA, J. VUOPIO-VARKILA, M. KOOISTRA, A. TALENS, W. WITTE und H. VERBRUGH (1998)  
Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study  
J. Clin. Microbiol. 36, 1653-1659
- BERGDOLL, M. S., C. R. BORJA und R. M. AVENA (1965)  
Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C  
J. Bacteriol. 90, 1481-1485

- BETLEY, M. J. und J. J. MEKAIANOS (1985)  
Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage  
*Science* 229, 185-187
- BETLEY, M. J. und J. J. MEKAIANOS (1988)  
Nucleotid sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene  
*J. Bacteriol.* 170, 34-41
- BHAKDI, S. und J. TRANUM-JENSEN (1991)  
Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*  
*Microbiol. Rev.* 55, 733-751
- BIGGER, J. W., C. R. BOLAND und A. R. O'MEARA (1927)  
Variant colonies of *Staphylococcus aureus*  
*J. Pathol. Bacteriol.* 30, 261-269
- BJÖRCK, L. und G. KRONVALL (1984)  
Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG binding reagent  
*J. Immunol.* 133, 969-974
- 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
- BLEVINS, J. S., A. F. GILLASPY, T. M. RECHTIN, B. K. HURLBURT und M. S. SMELTZER (1999)  
The staphylococcal accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (*cna*) in an *agr*-independent manner  
*Mol. Microbiol.* 33, 317-326
- BODÉN, M. K. und J. I. FLOCK (1992)  
Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman  
*Microb. Pathog.* 12, 289-298
- BODÉN, M. K. und J. I. FLOCK (1994)  
Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*  
*Mol. Microbiol.* 12, 599-606
- BOHACH, G. A. und P. M. SCHLIEVERT (1987)  
Nucleotid sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins  
*Mol. Gen. Genet.* 209, 15-20



- 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
- BOYLE, M. D. P (1990)  
The type I bacterial immunoglobulin-binding protein: Staphylococcal protein A  
In: Boyle, M. D. P., Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins, 1, Academic Press, San Diego/New York, USA, 17-28
- BRAKSTAD, O. D., K. AASBAKK und J. A. MÆAELAND (1992)  
Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene  
J. Clin. Microbiol. 30, 1654-1660
- 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
- BRUNNER, H. M., C. G. GEMMELL, H. HUSER und F. -J. FEHRENBACH (1981)  
Chemical and biological properties of *Staphylococcus aureus* lipase  
In: Jeljascewicz, J., Staphylococci and Staphylococcal Infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 329-333
- 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
- BUXTON, T. B., J. P. RISSING, J. A. HORNER, K. M. PLOWMAN, D. F. SCOTT, T. J. SPRINKLE und G. K. BEST (1990)  
Binding of a *Staphylococcus aureus* bone pathogen to type I collagen  
Microb. Pathog. 8, 441-448
- CADNESS-GRAVES, B., R. WILLIAMS, G. J. HARPER und A. A. MILES (1943)  
Slide-test for coagulase-positive staphylococci  
Lancet I, 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
- CARLES-NUTRIT, M. J., B. CHRISTOPHLE, S. BROCHE, A. GOUBY, N. BOUZIGES und M. RAMUY (1992)  
DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*  
J. Clin. Microbiol. 30, 2092-2096

- CASMAN, E. P (1965)  
Staphylococcal enterotoxin  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 128, 124-131
- CHAPMAN, G. H. (1945)  
The significance of sodium chloride in studies of staphylococci  
J. Bacteriol. 50, 201-203
- CHESBRO, W. R. und K. AUBRON (1967)  
Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods  
Appl. Microbiol. 15, 1150-1159
- CHEUNG, A. I., S. J. PROJAN, R. E. EDELSTEIN und V. A. FISCHETTI (1995)  
Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (fbpA) encoding a fibrinogen-binding protein  
Infect. Immun. 63, 1914-1920
- CHU, G., D. VOLLRATH und R. W. DAVIS (1986)  
Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric field  
Science 234, 1582-1585
- 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
- COSTA, E. O. (1991)  
Economics of infectious bovine mastitis  
Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo 15, 21-26
- CUNNINGHAM, L., B. W. CALTIN und M. PRVIAT DE GARILHE (1956)  
A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*  
J. Am. Chem. Soc. 78, 4642-4645
- DAJANI, A. S. (1972)  
The scaled-skin syndrome: Relation to phage group II staphylococci  
J. Infect. Dis. 125, 548-551

DEPLANO, A., A. SCHUERMANS, J. VAN ELDERE, W. WITTE, H. MEUGNIER, J. ETIENNE, H. GRUNDMANN, D. JONAS, G. T. NOORDHOEK, J. DIJKSTRA, A. VAN BELKUM, W. VAN LEEUWEN, P. T. TASSIOS, N. J. LEGAKIS, A. VANDER ZEE, A. BERGMANS, D. S. BLANC, F. C. TENOVER, B. C. COOKSON, G. O'NEIL, M. J. STRUELENS und THE EUROPEAN STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS OF THE ESCMID (2000)

Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive- element PCR analysis  
J. Clin. Microbiol. 38, 3527-3533

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

DUTHIE, E. S (1954)

Evidence for two forms of staphylococcal coagulase  
J. Gen. Microbiol. 10, 427-436

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

EISEN, J. A. (1998)

Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis  
Genome Res. 8, 163-167

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

Distribution of hemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci  
J. Pathol. Bacteriol. 62, 541-554

ENRIGHT, M. C., N. P. DAY, C. E. DAVIES, S. J. PEACOCK und B. G. SPRATT (2000)

Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*  
J. Clin. Microbiol. 38, 1008-1015

ETESSE-CARSENTI, H., J. ENTENZA, V. MONDAIN, J. DURANT, CH. PRADIER, E. BERNARD und P. DELLAMONICA (1991)

Rôle de la fibronectine sur l'adhésion des staphylocoques et interaction avec les propriétés anti-adhérentielles de la Péfloxacin  
Pathol. Biol. 39, 414-423

- FATTOM, A. I., J. SARWAR, A. ORTIZ und R. NASO (1996)  
A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge  
Infect. Immun. 64, 1659–1665
- FITTON, S. E., D. F. HUNT, J. MARASCO, J. SHABANOWITZ, S. WINSTON und A. DELL (1984)  
The amino acid sequence of delta hemolysin purified from a canine isolate of *S. aureus*  
FEBS Lett. 169, 25-29
- FITZGERALD, J. R., W. J. MEANEY, P. J. HARTIGAN, C. J. SMYTH und V. KAPUR (1997)  
Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows  
Epidemiol. Infect. 119, 261-269
- 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 a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens  
J. Bacteriol. 183, 63-70
- FORSGREN, A und J. SJÖQUIST (1966)  
„Protein A“ from *Staphylococcus aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human  $\tau$ -globulin  
J. Immunol. 97, 822-827
- FORSMAN, P., A. TISSALA-TIMISJÄRVI und T. ALATOSSAVA (1997)  
Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions  
Microbiol. 143, 3491-3500
- FOURNIER, J. M., K. HANNON, M. MOREAU, W. W. KARAKAWA und W. F. VANN (1987)  
Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*  
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138, 87-93
- FREER, J. H. und J. P. ARBUTHNOTT (1983)  
Toxins of *Staphylococcus aureus*  
Pharmac. Ther. 19, 55-106
- FRÉNAY, H. M. E., A. E. BUNSCHOTEN, L. M. SCHOULS, W. J. VAN LEEUWEN, C. M. J. E. VANDENBROUKE-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
- FRITSCHKE, D. (1970)  
Untersuchungen zur Funktion des  $\beta$ -Hämolysins von *Staphylococcus aureus*  
Zbl. Bakt. Hyg. I, Orig. 213, 348-355

- FROST, A. J (1975)  
Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland  
*Infect. Immun.* 12, 1154-1156
- 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.
- GALDBART, J. -O., A. MORVAN und N. E. SOLH (2000)  
Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains susceptible to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 185-190
- GARDINER, K. (1991)  
Pulsed field gel electrophoresis  
*Analyt. Chem.* 63, 648-665
- GEMMEL, C. G. (1983)  
Extracellular toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci  
*In: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, Staphylococci and Staphylococcal Infections*, 2, Academic Press, London/New York, 809-827
- GIAMARELLOU, H., M. PAPAPETROPOULOU und G.K. DAIKOS (1981)  
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections during 1978-1979: clinical and bacteriology observations  
*J. Antimicrob. Chemother.* 7, 649-655
- GOERING; R. V. (1998)  
The molecular epidemiology of nosocomial infection. An overview of principles, applications and interpretations  
*In: Spencer et al. (eds.), Rapid detection of infectious agents*, Plenum Press, New York, 131-157
- GREENE, C., D. MCDEVITT, P. FRANCOIS, P. E. VAUDAUX, D. P. LEW und T. J. 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
- GRISTINA, A. G. (1987)  
Biomaterial-centered infections: microbial adhesion versus tissue integration  
*Science* 237, 1588-1595

- GROTHUES, D. und B. TÜMMLER (1991)  
New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis application to the analysis of *Pseudomonas* species  
Mol. Microbiol. 5, 2763-2776
- GROV, A., B. MYKLESTAD und P. OEDING (1964)  
Immunochemical studies on antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. I. Isolation and chemical characterization of antigen A  
Acta Path. Microbiol. Scand. 61, 588-596
- GUDDING, R. (1983)  
Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties  
J. Clin. Microbiol. 18, 1098-1101
- GUIDRY, A., A. FATTOM, A. PATEL und C. O'BRIEN (1997)  
Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States  
Vet. Microbiol. 59, 53-58
- GUPTA, H., N. MCKINNON, L. LOUIE, M. LOUIE und A. E. SIMOR (1998)  
Comparison of six rapid agglutination tests for the identification *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 31, 333-336
- GÜRTLER, V. und V. A. STANISICH (1996)  
New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region  
Microbiol. 142, 3-16
- GUYONNET, F., M. PLOMMET und C. ET BOUILLANNE (1968)  
Purification de l'hémolysine  $\gamma$  de *Staphylococcus aureus*  
C. R. Acad. Sci. 267, 1180-1182
- HAKANSSON M., K. PETERSSON, H. NILSSON, G. FORSBERG, P. BJÖRK, P. ANTONSSON und L. A. SVENSSON (2000)  
The crystal structure of staphylococcal enterotoxin H: implications for binding properties to MHC class II and TcR molecules  
J. Mol. Biol. 302, 527-537
- HARSHMAN, S., P. BOQUET, E. DUFLOT, J. E. ALOUF, C. MONTECUCCO und E. PAPINI (1989)  
Staphylococcal  $\alpha$ -toxin: A study of membrane penetration and pore formation  
J. Biol. Chem. 264, 14978-14984
- HARVEY, R. L., G. KRONVALL, G. M. TROUP, R. E. ANDERSON und R. C. WILLIAMS JR. (1970)  
Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes by protein A of the *Staphylococcus*  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 453-456

- 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
- HEBERT G. A. und G. A. HANCOCK (1985)  
Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci  
J. Clin. Microbiol. 22, 409-415
- HEINS, J. N., J. R. SURIANO, H. TANIUCHI und C. B. ANFINSEN (1967)  
Characterization of nuclease produced by *Staphylococcus aureus*  
J. Biol. Chem. 242, 1016-1020
- HERBERT, S., D. WORLITZSCH, B. DASSY, A. BOUTONNIER, J. M. FOURNIER, G. BELLON, A. DALHOFF und G. DORING (1997)  
Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO<sub>2</sub> inhibition in vitro and in vivo  
J. Infect. Dis. 176, 431-438
- HOCHKEPPEL, H. K., D. G. BRAUN, W. VISCHER, A. IMM, S. SUTTER, U. STAEUBLI, R. GUGGENHEIM, E. L. KAPLAN, A. BOUTONNIER und J. M. FOURNIER (1987)  
Serotyping und electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8  
J. Clin. Microbiol. 25, 526-530
- 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 aureus* with special regard to clumping factor activity  
Zbl. Bakt. 276, 487-492
- HUSSAIN, M., K. BECKER, C. VON EIFF, J. SCHRENZEL, G. PETERS und M. HERRMANN (2001)  
Identification and characterization of a novel 38,5-Kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins  
J. Bacteriol. 183, 6778-6786
- JAFFE, R. I., J. D. LANE, S. V. ALBURY und D. M. NIEMEYER (2000)  
Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR  
J. Clin. Microbiol. 38, 3407-3412

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

Involvement of enterotoxin 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. VANDENESCH, M. BONNEVILLE und G. LINA (2001)

*egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*  
J. Immunol. 166, 669-677

JENSEN, K. (1958)

A normally occurring *Staphylococcus* antibody in human serum  
Acta Path. Microbiol. Scand. 44, 421-428

JENSEN, M. A., J. A. WEBSTER und N. STRAUS (1993)

Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms  
Appl. Environ. Microbiol. 59, 945-952

JI, G., R. C. BEAVIS und R. P. NOVICK (1995)

Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12055-12059

JI, G., R. BEAVIS und R. P. NOVICK (1997)

Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants  
Science 276, 2027-2030

JOHNSON, A. D., L. SPERO, J. S. und T. DE CICCO (1979)

Purification and characterization of different types of exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus*  
Infect. Immun. 24, 679-684

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 reactions  
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., 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
- JONSSON, P. und T. WADSTRÖM (1993)  
Staphylococcus  
In: Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals, Iowa State University Press, Ames, USA, 21-35
- JORGENSEN, M., R. GIMNEY, M. PEGLER, A. VICKERY und G. FUNNELL (1996)  
Typing multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotyping and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis  
J. Clin. Microbio. 34, 398-403
- KAIDA, S., T. MIYATA, Y. YOSHIKAWA, 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
- KAPLAN, M. H. und M. J. TENENBAUM (1982)  
*Staphylococcus aureus*: cellular biology and clinical application  
Am. J. Med. 72: 248-258
- KARAKAWA, W. W. und W. F. VANN (1982)  
Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*  
In: Robbins, J. B., J. C. Hill und J. C. Sadoff, Bacterial Vaccines, 4, Seminar in Infectious Diseases, Thieme Stratton Inc., New York, USA, 285-293
- 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
- KING, T. C., R. SIRDESKMUKH und D. SCHLESSINGER (1986)  
Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in prokaryotes  
Microbiol. Rev. 50, 428-451
- KIRBY, W. M. M. (1944)  
Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci  
Science 99, 452-453
- KLEICKMANN, A., J. BRÜCKLER, H. BLOBEL und D. KITZROW (1975)  
Chemotaktische Wirkungen einiger Staphylokokkensubstanzen  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 233, 153-162

- 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 and Wilkins, Baltimore, USA, 1013-1035
- 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
- KLUYTMANS, J., W. VAN LEEUVEN, W. GOESSENS, R. HOLLIS, S. MESSER, L. HERWALDT, H. BRUINING, M. HECK, J. ROST, N. VAN LEEUWEN, A. VAN BELKUM und H. VERBRUGH (1995)  
Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analysed by pheno- and genotyping  
J. Clin. Microbiol. 33, 1121-1128
- KORNBLUM, J., B. N. KREISWIRTH, S. J., PROJAN, H. ROSS und R. P. NOVICK (1990)  
*Agr*: polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*  
In: Novick, R. P., Molecular Biology of the Staphylococci, VCH Publisher, Inc. New York, USA, 373-402
- KOSTMAN, J. R., T. D. EDLIND, J. J. LIPUMA und T. L. STULL (1992)  
Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping  
J. Clin. Microbiol. 30, 2084-2087
- KOVACEVIC, S., L. E. VEAL, H. M. HSIUNG und J. R. MILLER (1985)  
Secretion of staphylococcal nuclease by *Bacillus subtilis*  
J. Bacteriol. 162, 521-528
- KROKER, R. (1999)  
Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen  
In: Löcher, W., F. R. Ungemach und R. Kroker, Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 211-246
- KRONVALL, G. und R. C. WILLIAMS JR. (1969)  
Differences in anti-protein A activity among IgG-subgroups  
J. Immunol. 103, 828-833
- KRONVALL, G., R. P. MESSNER und R. C. WILLIAMS JR. (1970)  
Immunochemical studies on the interaction between staphylococcal protein A and  $\gamma$ G globulin  
J. Immunol. 105, 1353-1359

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. MIZUTANI-UI, N. K. TAKAHASHI, T. SAWANO, R. -I. 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. HIRAMATSU (2001)

Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
Lancet 357, 1225-1240

KUUSELA, P. (1978)

Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*  
Nature (London) 276, 718-720

KUUSELA, P., T. VARTIO, M. VUENTO und E. B. MYHRE (1984)

Binding sites for streptococci and staphylococci in fibronectin  
Infect. Immun. 45, 433-436

LACHICA, R. V. F., P. D. HOEPRICH und C. GENIGEORGIS (1971)

Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci  
Appl. Microbiol. 21, 823-826

LACHICA, R. V. F. (1976)

Simplified thermonuclease test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* recovered on agar media  
Appl. Environ. Microbiol. 32, 633-634

LACHICA, R. V. F., S. S. JANG und P. D. HOEPRICH (1979)

Thermonuclease seroinhibition test for distinguishing *Staphylococcus aureus* from other coagulase-positive staphylococci  
J. Clin. Microbiol. 9, 141-143

LADHANI, S., C. L. JOANNOU, D. P. LOCHRIE, R. W. EVANS und S. M. POSTON (1999)

Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome  
Clin. Microbiol. Rev. 12, 224-242

LÄMMLER, C. (1983)

Vergleichende Untersuchungen von Fibrinogenrezeptoren an Bakterien unter besonderer Berücksichtigung pathogener Streptokokken  
Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

LÄMMLER, C. und H. BLOBEL (1985)

Plasmaproteinbindungen bei Gram-positiven Kokken  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 98, 365-368

- 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., P. SCHAUFUß, K. GORETZKI und H. BLOBEL (1986)  
Screening for bacterial Fc-receptor activity on nitrocellulose membranes  
J. Immunol. Meth. 90, 47-50
- LÄMMLER, C. (1991a)  
Bacteriolytic properties of an extracellular product of *Staphylococcus hyicus*  
In: Jeljaszewicz, J. und P. Ciborowski, The Staphylococci, Zbl. Bakt. Suppl. 21,  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 189-190
- LÄMMLER, C. (1991b)  
Characterization of *Staphylococcus hyicus* with the ATB 32 Staph system and  
with conventional test  
J. Clin. Microbiol. 29, 1221-1224
- LÄMMLER, C., Ö. AKINEDEN, C. ANNEMÜLLER, W. WOLTER und M. ZSCHÖCK  
(2000)  
Molecular analysis of virulence factors 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
- LAI, E., B. W. BIRREN, S. M., CLARK, M. I. SIMON und L. HOOD (1989)  
Pulsed Field Electrophoresis  
Biotechniques 7, 34-42
- LAMMERS, A., P. J. M. NUIJTEN und H. E. SMITH (1999)  
The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for  
adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells  
FEMS Microbiol. Lett. 180, 103-109
- LANGE, C., M. CARDOSO, D. SENCZEK und S. SCHWARZ (1999)  
Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine  
mastitis in Brazil  
Vet. Microbiol. 67, 127-141
- LANGENEGGER, J., M. P. FIGUEIREDO und E. R. FERREIRA (1986)  
Eficácia da combinação antibiótica de sulfato de gentamicina + penicilina G  
procaína no tratamento da mastite bovina  
Hora Vet. 30, 44-47
- LANGONI, H., P. F. DOMINGUES, M. P. PINTO und F. J. P. LISTONI (1991)  
Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica  
Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 43, 507-515

- LANGONI, H., A. V. DA SILVA, K. G. CABRAL und P. F. DOMINGUES (1998)  
Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica  
R. Bras. Med. Vet. 20, 204-209
- LAUDE, G. (2000)  
Erkrankungen durch *Staphylococcus aureus* unter besonderer Berücksichtigung der MRSA  
Mikrobiologie 10, 145-149
- LEWIN, B. (1998)  
Proteinsynthese  
In: Molekularbiologie der Gene, Spektrum Akademischer Verlag  
Heidelberg/Berlin, Germany, 145-146
- LINDBERG, M., K. JONSSON, H. -P. MÜLLER, H. JONSSON, C. SIGNÄS, M. HÖÖK, R. RAJA, G. RAUCCI und G. M. ANANTHARAMAIAH (1990)  
Fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*  
In: Novick, R. P., Molecular Biology of the Staphylococci, VCH Publishers Inc., New York, USA, 327-356
- 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
- LOEB, L. (1903)  
The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood  
J. Med. Res. 10, 407-419
- LÖKVIST, T und J. SJÖQUIST (1962)  
Chemical and serological analysis of antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. A comparison between the products obtained by Verwey's and Jensen's techniques  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 56, 295-304
- LOPES, C. A., G. MORENO, P. R. CURI, A. F. GOTTSCHALK, J. R. MODOLO, A. HORACIO, A. CORREA und C. PAVAN (1990)  
Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil  
Brit. Vet. J. 146, 443-448
- LUDLAM, G. B. (1949)  
A selective medium for the isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated material  
Month. Bull. Min. Health 8, 15
- LUIJENDIJK, A., A. VAN BELKUM, H. VERBRUGH und J. KLUYTMANS (1996)  
Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples  
J. Clin. Microbiol. 34, 2267-2269

- LYON, B. R. und Y. R. SKURRAY (1987)  
Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis  
Microbiol. Rev. 51, 88-134
- MAMO, W., G. FRÖMAN und T. WADSTRÖM (1988)  
Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis  
Vet. Microbiol. 18: 163-176
- MANDELL, G. L. (1975)  
Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*  
J. Clin. Invest. 55, 561-566
- MARR, J. C., J. D. LYON, J. R. ROBERSON, M. LUPHER, W. DAVIS und G. A. BOHACH (1993)  
Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications  
Infect. Immun. 61, 4254-4262
- MASLOW, J. N., A. M. SLUTSKY und R. D. ARBEIT (1993)  
Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology  
In: Persing, D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover und T. J. White, Diagnostic Molecular Microbiology, American Society of Microbiology, Washington, D. C., 563-572
- MATTSON, E., H. VAN DIJH, R. N. VERHOEFF und J. ROLLOF (1996)  
Supernatants from *Staphylococcus epidermidis* grown in the presence of different antibiotics induce differential release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes  
Infect. Immun. 64, 4351-4355
- McCARTNEY, C. A. und J. P. ARBUTHNOTT (1978)  
Mode of action of membrane damaging toxins produced by staphylococci  
In: Jeljaszewicz, J. und T. Wadström, Bacterial Toxins and Cell Membranes, Academic Press Inc., London/New York, 89-127
- McORMICK, J. K., J. M. YARWOOD und P. M. SCHLIEVERT (2001)  
Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An Update  
Annu. Rev. Microbiol. 55, 77-104
- McDEVITT, D., P. VARUDAUX und T. J. FOSTER (1992)  
Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor  
Infect. Immun. 60: 1514-1523
- McDEVITT, D., P. FRANCOIS, P. VAUDAUX und T. J. FOSTER (1994)  
Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*  
Mol. Microbiol. 11, 237-248

- McGAVIN, M. H., D. KRAJEWSKA-PIETRASIK, C. RYDÉN und M. HÖÖK (1993)  
Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity  
Infect. Immun. 61:2479–2485
- McKEE, C. M., G. RAKE und C. L. HOUCK (1944)  
Studies on *Aspergillus flavus*. II. The production and properties of a penicillin-like substance-flavacidin  
J. Bact. 47, 187
- McKEVITT, A. I., G. L. BJORNSON, C. A. MAURACHER und D. W. SCHEIFELE (1990)  
Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*  
Infect. Immun. 58, 1473-1475
- MELLOR, I. R., D. H. THOMAS und M. S. P. SANSOM (1988)  
Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus*  $\delta$ -toxin  
Biochim. Biophys. Acta 942, 280-294
- MENDOZA, M., H. MEUGNIER, M. BES, J. ETIENNE und J. FRÉNEY (1998)  
Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis  
Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1049-1055
- 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
- MÖLLBY, R. (1983)  
Isolation and properties of membrane damaging toxins  
In: Easmon, C.S.F. und C. Adlam, Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2, Academic Press, London, New York, 619-669
- MONDAY, S. R. und G. A. BOHACH (1999)  
Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates  
J. Clin. Microbiol. 37, 3411-3414
- MOORE, P. C. L. und J. A. LINDSAY (2001)  
Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes  
J. Clin. Microbiol. 39, 2760-2767
- MOREILLON, P., J. M. ENTENZA, P. FRANCIOLI, D. MCDEVITT, T. J. FOSTER, P. FRANÇOIS und P. VAUDAUX (1995)  
Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis  
Infect. Immun. 63, 4738–4743

- MOSHER, D. F. und R. A. PROCTOR (1980)  
Binding and factor Xlla-mediated cross-linking of a 27 kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*  
*Science* 209, 927-929
- MUCH, H. (1908)  
Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*  
*Biochem. Z.* 14, 143-155
- MUNSON, S. H., M. T. TREMAINE, M. J. BETLEY und R. A. WELCH (1998)  
Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*  
*Infect. Immun.* 66, 3337-3348
- NADER-FILHO, A., R. P. SCHOCKEN-ITURRINO und O. D. ROSSI JUNIOR (1985)  
Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo  
*Pesq. Vet. Bras.* 5, 53-56
- NADER-FILHO, A., R. P. SCHOCKEN-ITURRINO und O. D. ROSSI JUNIOR (1986)  
Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus*, isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos  
*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 38, 581-588
- NADER FILHO, A., O. D. ROSSI JR. und R. P. SCHOCKEN-ITURRINO (1988)  
Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica  
*Rev. Microbiol.* 19, 369-373
- NAIDU, A. S., J. MIEDZOBRODZKI, M. ANDERSSON, L. -E. NILSSON, A. FORSGREN und J. L. WATTS (1990)  
Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections  
*J. Clin. Microbiol.* 28, 2312-2319
- NICOLET, J. (1985)  
Grampositive Kokken  
In: *Kompendium der veterinärmedizinischen Bakteriologie*, Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg, 121-145
- NI EIDHIN, D., S. PERKINS, P. FRANCOIS, P. VAUDAUX, M. HÖÖK und T. J. FOSTER (1998)  
Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*  
*Mol. Microbiol.* 30, 245-257
- NILSSON, H., P. BJÖRK, M. DOHLSTEN und P. ANTONSSON (1999)  
Staphylococcal enterotoxin H displays unique MHC classII-binding properties  
*J. Immunol.* 163, 6686-6693



NOVICK, R. P., H. F. ROSS, S. J. PROJAN, J. KORNBLUM, B. KREISWIRTH und S. MOGHAZEH (1993)

Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule

EMBO J. 12, 3967-3975

NOVICK, R. P., S. J. PROJAN, J. KORNBLUM, H. F. ROSS, G. JI, B. KREISWIRTH, F. VANDENESCH und S. MOGHAZEH (1995)

The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*

Mol. Gen. Genet. 248, 446-458

NOVICK, R. P. und T. W. MUIR (1999)

Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria

Curr. Opin. Microbiol. 2, 40-45

OMOE, K., M. ISHIKAWA, Y. SHIMOD, D. -L. HU, S. UEDA und K. SHINAGAWA (2002)

Detection of *seg*, *seh* und *sei* genes 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

O'REILLY, M. B., B. N. KREISWIRTH und T. J. FOSTER (1990)

Molecular and a nonexpressed  $\alpha$ -toxin gene (*hla*) of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

In: Novick, R. P., Molecular Biology of the Staphylococci, VCH Publishers Inc., New York, p.439-443

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

PALMA, M., D. WADE, M. FLOCK und J. -I. FLOCK (1998)

Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen

J. Biol. Chem. 273, 13177-13181

PARK, P. W., D. D. ROBERTS, L. E. GROSSO, W. C. PARKS, J. ROSENBLOOM, W. R. ABRAMS und R. P. MECHAM (1991)

Binding of elastin to *Staphylococcus aureus*

J. Biol. Chem. 266, 23399-23406

PARKER, M. T. (1958)

Some cultural characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from superficial skin infections

J. Hyg. (Camb.) 56, 238-253

- PATEL, A. H., P. NOWLAN, E. D. WEAVERS und T. J. FOSTER (1987)  
Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement  
Infect. Immun. 55, 3101-3110
- 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 adhesin  
J. Biol. Chem. 267, 4766, 4772
- PAULSSON, M., O. D. LIANG, F. ASCENCION und T. WADSTRÖM (1992a)  
Vitronectin-binding surface proteins of *Staphylococcus aureus*  
Zbl. Bakt. 277, 54-64
- PAULSSON, M., A. LJUNGH und T. WADSTRÖM (1992b)  
Rapid identification of fibonectin, vitronectin, laminin and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative staphylococci by particle agglutinations assays  
J. Clin. Microbiol. 30, 2006-2012
- PENG, H., R. P. NOVICK, B. KREISWIRTH, J. KORNBLUM und P. SCHLIEVERT (1988)  
Cloning characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*  
J. Bacteriol. 179, 4365-4372
- PETERSSON, K., M. HAKANSSON, H. NILSSON, G. FORSBERG, L. A. SVENSSON, A. LILJAS und B. WALSE (2001)  
Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence  
EMBO J. 20, 3306-3312
- PIÉMONT, Y., E. PIÉMONT und D. GERARD (1986)  
Fluorescence studies of thermal stability of staphylococcal exfoliative toxin A und B  
FEMS Microbiol. 36, 245-249
- PIÉMONT, Y., S. RIFAI und H. MONTEIL (1988)  
Les exfoliatines de *Staphylococcus aureus*  
Bull. Inst. Pasteur 86, 263-269
- 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
- RECSEI, P., B. KREISWIRTH, M. O'REILLY, P. SCHLIEVERT, A. GUSS und R. NOVICK (1985)  
Regulation of exprotein gene expression by *agr*  
Mol. Gen. Genet. 202, 58-61

- 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
- RÖMLING, U. T. HEUER und B. TÜMMLER (1994)  
Bacterial genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis techniques  
In: Chrambac, A. und M.J. Dunn, Advances in Electrophoresis, Vol. VHC, Weinheim, 353-406
- RÖMLING, U., R. FISLAGE und B. TÜMMLER (1995)  
Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern  
Immunol. Infekt. 23, 4-8
- ROGOLSKY, M. (1979)  
Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*  
Microbiol. Rev. 43, 320-360
- ROLLE, M. und A. MAYR (1993)  
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre  
6 Auflage, Enke Verlag Stuttgart
- ROTTER, J. und F. C. KELLY (1966)  
Serological reactions associated with the clumping factor of *Staphylococcus aureus*  
J. Bacteriol. 91, 588-594
- RYDEN, C., K. RUBIN, P. SPEZIALE, M. HÖÖK, M. LINDBERG und T. WADSTRÖM (1983)  
Fibronectin receptors from *Staphylococcus aureus*  
J. Biol. Chem. 258, 3396-3401
- RYDING, U., J. I. FLOCK, M. FLOCK, B. SODERQUIST und B. CHRISTENSSON (1997)  
Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*  
J. Infect. Dis. 176, 1096--1099
- SABATH, L. D., N. WHEELER, M. LAVERDIERE, D. BLAZEVIC und B. J. WILKINSON (1977)  
A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*  
Lancet I, 443-447
- SANTOS SANCHES, I., M. RAMIREZ, H. TRONI, M. ABECASSIS, M. PADUA, A. TOMASZ und H. DE LENCASTRE (1995)  
Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain  
J. Clin. Microbiol. 33, 1243-1246

- SARUTA, K., S. HOSHINA und K. MACHIDA (1995)  
Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene  
Microbiol. Immunol. 39, 839-844
- 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 enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity  
J. Mol. Biol. 269, 270-280
- SCHALM, O. W., E. J. CARROL und N. C. JAIN (1971)  
Bovine mastitis  
Lea und Febiger, Philadelphia, USA
- SCHEIFELE, D. W., G. L. BJORNSON, R. A. DYER und J. E. DIMMICK (1987)  
Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis  
Infect. Immun. 55, 2268-2273
- SCHLEIFER, K. H. und W. E. KLOOS (1975)  
Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*  
Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 50-61
- 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 from *Staphylococcus aureus* as a costimulator of human neutrophil oxidative burst  
J. Infect. Dis. 176, 1531-1537

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. Immunol. 42, 407-409

SHAFER, W. M. und J. J. IANDOLO (1978)

Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B

Infect. Immun. 20, 273-278

SHALITA, Z., E. MURPHY und R. P. NOVICK (1977)

Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*

J. Bacteriol. 129, 317-325

SIGNÄS, C., G. RAUCCI, K. JÖNSSON, P. -E. LINDGREN, G. M. ANANTHARAMAIAH, M. HÖÖK und M. LINDBERG (1989)

Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 699-703

SIMON, C. und W. STILLE (2000)

Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis, 10. Auflage, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 29-31

SJÖQUIST, J., J. MOVITZ, I. B. JOHANSSON und H. HJELM (1972)

Localization of protein A in the bacteria

Eur. J. Biochem. 30, 190-194

SKALKA, B, J. SMOLA und J. PILLICH (1979)

A simple method of detecting staphylococcal hemolysis

Zentbl. Bakteriol. Hyg. Abt. I Orig. A. 245:283-286

SKALKA, B. (1985)

Hyaluronidase test in the diagnosis of staphylococci

Vet. Med. (Praha) 30, 373-378

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

- 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 adhesin B domain  
Infect. Immun. 67, 3952-3959
- SOEDARMANTO, I. (1996)  
Vergleichende Untersuchungen an Streptokokken der serologischen Gruppe G unterschiedlicher Herkunft  
Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen
- SOMPOLINSKY, E., Z., SAMRA, W. W. KARAKAWA, W. F. VANN, R. SCHNEERSON und Z. MALIK (1985)  
Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types  
J. Clin. Microbiol. 22, 828-834
- SPEZIALE, P., G. RAUCCI, L. VISAI, L. M. SWITALSKI, R. TIMPL und M. HÖÖK (1986)  
Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan 1  
J. Bacteriol. 167, 77-81
- STEPHAN, R., U. DURA und F. UNTERMANN (1999)  
Resistenzsituation und Enterotoxinbildungsfähigkeit von *Staphylococcus aureus* Stämmen aus bovinen Mastitismilchproben  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 141, 287-289
- 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
- SU, Y. -C. und A. C. L. WONG (1995)  
Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H  
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1438-1443
- SUPERSAC, G., G. PREVOST und Y. PIEMONT (1993)  
Sequencing of leukocidin R from *Staphylococcus aureus* P 83 suggests that staphylococcal leukocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two component family of toxins  
Infect. Immun. 61, 580-587
- SVENSSON, L. A., E. M. SCHAD, M. SUNDSTRÖM, P. ANTONSSON, T. KALLAND und M. DOHLSTEN (1997)  
Staphylococcal enterotoxins A, D, and E  
Prep. Biochem. Biotechnol. 27, 199-228

- SWITALSKI, L. M., C. RYDEN, K. RUBIN, A. LJUNGH, M. HÖÖK und T. WADSTRÖM (1983)  
Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains  
Infect. Immun. 42, 628-633
- SWITALSKI, L. M., J. M. PATTI, W. BUTCHER, A. G. GRISTINA, P. SPEZIALE und M. HÖÖK (1993)  
A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage  
Mol. Microbiol. 7, 99-107
- TAKEUCHI, S., M. SAITO, K. IMAIZUMI, T. KAIKOH, H. HIGUCHI und S. INUBUSHI (2002)  
Genetic and enzymatic analyses of metalloprotease (aerolysin) from *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals  
Vet. Microbiol. 84, 135-142
- TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. 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: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, *Staphylococci and Staphylococcal Infections*, Academic Press, London/New York, 705-744
- TODD, J., M. FISHAUT, 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 JR. 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, CH. 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
- TOY, P. T. C. Y., L. -W. LAI, T. A. DRAKE und M. A. SANDE (1985)  
Effect of fibronectin on adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrin thrombi *in vitro*  
Infect. Immun. 48, 83-86

- 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
- TU, K. K. und W. A. PALUTKE (1976)  
Isolation and characterization of a catalase-negative strain of *Staphylococcus aureus*  
J. Clin. Microbiol. 3, 77-78
- UHLÉN, M., B. GUSS, B. NILSSON, S. GATENBECK, L. PHILIPSON und M. LINDBERG (1984)  
Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A  
J. Biol. Chem. 259, 1695-1702
- USHIODA, H., T. TERAYAMA, S. SAKAI, H. ZEN-YOJI, M. NISHIWAKI und A. HIDANO (1981)  
Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work  
In: Jeljaszewicz, J., Staphylococci and Staphylococcal Infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 77-83
- USUI, Y., T. OHTOMO und K. YOSHIDA (1985)  
Biochemical characterization of clumping factor extracted from a strain of *Staphylococcus aureus*  
In: Jeljaszewicz, J., The Staphylococci, Zbl. Bakt. Suppl. 14, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 197-205
- VALENTIN-WEIGAND, P. (1987)  
Anheftung pathogener Kokken an Epithelzellen von Mensch und Tier  
Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen
- VANDENESCH, F., J. KORNBLUM und R. P. NOVICK (1991a)  
A temporal signal independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*  
J. Bacteriol. 173, 6313-6320
- VANDENESCH, F., M. J. STORRS, F. POITEVIN-LATER, J. ETIENNE, P. COIRVALIN und J. FLEURETTE (1991b)  
Like hamolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*  
Fed. Eur. Microbiol. Soc. Lett. 78, 65-68
- VANN, J. M., R. J. HAMILL, R. M. ALBRECHT, D. F. MOSHER und R. A. PROCTER (1989)  
Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine endothelial cells  
J. Infect. Dis. 160: 538-542



- VANN, W. F., M. MOREAU, A. SUTTON, R. A. BYRD und W. W. KASAKAWA (1988)  
Structure and immunochemistry of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides  
In: Horowitz, M. A., Bacterial-Host-Cell Interaction, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series 64, Alan R. Liss, Inc. New York, USA, 187-198
- VERWEY (1940)  
A type-specific antigenic protein derived from the *staphylococcus*  
J. Exp. Med. 71, 635-644
- VOYTEK, A., A. G. GRISTINA, E. BARTH, Q. MYRVIK, L. M. SWITALSKI, M. HÖÖK und P. SPEZIALE (1988)  
Staphylococcal adhesion to collagen in intra-articular sepsis  
Biomaterials 9, 107-110
- WADSTRÖM, T. (1983)  
Biological effects of cell damaging toxins  
In: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, Staphylococci and Staphylococcal Infections, 2, Academic Press, London, New York, 671-704
- WALLMANN, J., K. SCHRÖTER, L. H. WIELER und R. KROKER (2003)  
Antibiotikaempfindlichkeit ausgewählter pathogener Bakterien von erkrankten Lebensmittel liefernden Tieren in Deutschland  
Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere Nutztiere 31, 122-131
- WATER, van de, L., A. T. DESTREE und R. O. HYNES (1983)  
Fibronectin binds to some bacteria but does not promote their uptake by phagocytic cells  
Science 220, 201-204
- WATTS, J. L., J. W. PANKLEY und S. C. NICKERSON (1984)  
Evaluation of the Staph-Ident. and STAPHase system for identification of staphylococci from bovine intramammary infections  
J. Clin. Microbiol. 20, 448-452
- WENK K. und H. BLOBEL (1970)  
Untersuchungen an „Leukozidinen“ von Staphylokokken verschiedener Herkunft  
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 213, 479-487
- WILKERSON, M., S. MCALLISTER, J. M. MILLER, B. J. HEITER und P. P. BOURBEUA (1997)  
Comparison of five agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*  
J. Clin. Microbiol. 35, 148-151
- WILKINSON, B. J. (1983)  
Staphylococcal capsules and slime  
In: Easmon, C. S. F. und C. Adlam, Staphylococci and Staphylococcal Infection, 2, The organism *in vivo* and *in vitro*, Academic Press, London/New York, 481-523

- WILLIAMS, R. J., J. M. WARD, B. HENDERSOM, 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. Immun.* 68, 4407-4415
- WINKLE, S. (1979)  
Mikrobiologische und serologische Diagnostik  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York, 3. Auflage
- WITTE, W., M. KREKEN, CH. BRAULKE und C. CUNY (1997)  
Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospital in central Europe, with special refererice to German hospitals  
*Clin. Microbiol. Infect.* 3, 414-422
- WOESE, C. R. (1987)  
Bacterial evolution  
*Microbiol. Rev.* 51, 221-271
- 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
- YACoub, A., P. LINDAHL, K. RUBIN, M. WENDEL, D. HEINEGARD und C. RYDÉN (1994)  
Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*  
*Eur. J. Biochem.* 222, 919-925
- YAMADA, K.M. (1983)  
Cell surface interactions with extracellular materials  
*Annu. Rev. Biochem.* 52, 761-799
- YAMAGUCHI, 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

ZADOKS, R., W. VAN LEEUWEN, H. BARKEMA, O. SAMPIMON, H. VERBRUGH, Y. H. SCHUKKEN und A. VAN 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

ZADOKS, R. N., W. B. VAN LEEUWEN, D. KREFT, L. K. FOX, H. W. BARKEMA, Y. H. SCHUKKEN und A. VAN BELKUM (2002)

Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing

J. Clin. Microbiol. 40, 3894-3902

ZHANG, S., J. J. IANDOLO und G. C. STEWART (1998a)

The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*)

FEMS Microbiol. Lett. 168, 227-233

ZHANG, L., K. JACOBSSON, J. VASI, M. LINDBERG und L. FRYKBERG (1998b)

A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*

Microbiol. 144, 985-991

## **Danksagung**

---

Insbesondere bedanke ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der mir durch finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums die Durchführung und erfolgreiche Beendigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Ch. Lämmler danke ich herzlichst für die freundliche Überlassung des Themas und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Zschöck, Frau Zimmermann und Frau Ianice vom Staatlichen Untersuchungsamt Hessen für die überaus freundliche Hilfsbereitschaft.

Ferner bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. H. Langoni für die Freundschaft und Unterstützung bei der Erlangung eines DAAD-Stipendiums in Brasilien.

Herrn Dr. J. Brückler möchte ich für die wertvollen Vorschläge zur Verbesserung des Manuskripts danken.

Meinen Kolleginnen Kristin und Michaela sowie meinen Kollegen Hassan, Izhar, Önder und Ömer danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Milchhygiene.

Agradeço ao Marcos e ao Cristiano pela coleta e envio das cepas de *S. aureus* examinadas no presente estudo, bem como ao Aristeu, pela sua amizade e orientação na análise estatística. Também sou grato ao Jörg, pelas orientações e longas conversas sobre o Brasil.

À Sra. Martha e ao Sr. Wolfram meu obrigado pelo apoio irrestrito, muito importante para a nossa estada na Alemanha. Aos meus irmãos Kéren e Kemuel sou grato por me suportarem por todos estes 34 anos.