

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Phänotypisierung und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten  
aus Rohmilchproben Thüringer Milchviehherden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Anna Katharina Schlotter  
aus Marktredwitz

Leipzig, 2012

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen,  
Veterinärmedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Tag der Verteidigung: 06.11.2012

Angefertigt an der Thüringer Tierseuchenkasse AdÖR,

gefördert durch die Thüringer Tierseuchenkasse AdÖR und die Landesvereinigung

Thüringer Milch e.V.



*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis:

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>Glossar I</b>	
<b>Glossar II</b>	
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Taxonomie.....	<b>2</b>
2.1.2 Morphologie.....	<b>2</b>
2.1.3 Genom.....	<b>3</b>
2.1.4 Klassifizierung boviner <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate.....	<b>3</b>
2.1.5 Unterschiede bezüglich der Virulenz verschiedener <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>5</b>
2.1.6 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren.....	<b>6</b>
2.1.6.1 Zellgebundene Substanzen.....	<b>7</b>
2.1.6.1.1 Polysaccharidkapsel.....	<b>7</b>
2.1.6.1.2 Protein A (IgG-Fc-Rezeptor).....	<b>8</b>
2.1.6.1.3 Fibronectin-bindendes Protein.....	<b>8</b>
2.1.6.1.4 Clumping-Faktor.....	<b>8</b>
2.1.6.2 Extrazelluläre Enzyme und Toxine.....	<b>9</b>
2.1.6.2.1 Koagulase.....	<b>9</b>
2.1.6.2.2 Hämolyse.....	<b>10</b>
2.1.6.2.3 Exfoliatives Toxin.....	<b>11</b>
2.1.6.2.4 Enterotoxine.....	<b>12</b>
2.1.6.2.5 Toxic-shock-syndrom-Toxin.....	<b>15</b>
2.1.6.2.6 Leukozidine.....	<b>16</b>
2.1.6.2.7 Extrazelluläre Enzyme.....	<b>18</b>
<b>2.2 Mastitiden durch <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Epidemiologie der durch <i>Staphylococcus aureus</i> bedingten Mastitiden.....	<b>19</b>
2.2.2 Invasion und Infektion bei boviner Mastitis.....	<b>20</b>
2.2.3 Pathogenese der bovinen Mastitis durch <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>21</b>
2.2.4 Klinik und Verlauf der <i>Staphylococcus aureus</i> -Mastitiden.....	<b>22</b>
2.2.5 Diagnose der <i>Staphylococcus aureus</i> -Mastitiden.....	<b>23</b>
2.2.6 Therapie der <i>Staphylococcus aureus</i> -Mastitiden.....	<b>25</b>
2.2.7 Prophylaxe der <i>Staphylococcus aureus</i> -Mastitiden.....	<b>26</b>
2.2.8 Untersuchungen zur Häufigkeit und Prävalenz von <i>Staphylococcus aureus</i> - Mastitiden.....	<b>27</b>

2.2.9 Bedeutung von Resistenzen gegenüber Antibiotika.....	28
<b>2.3 DNA-Microarrays.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Entwicklung der Microarray-Technologie.....	31
2.3.2 Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung boviner <i>Staphylococcus aureus</i> -Isolate mittels DNA-Microarray-Technologie.....	32
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Darstellung der teilnehmenden Betriebe.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Milchprobenahme und Transport.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Durchführung der bakteriologischen Untersuchung.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Identifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>36</b>
3.4.1 Identifizierung anhand Koloniemorphologie, Latexschnellagglutination und Nachweis der Plasmakoagulase.....	36
3.4.2 Verwendung weiterer Tests zur Identifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
<b>3.5 Auswahl von <i>Staphylococcus aureus</i>-Isolaten für weiterführende Untersuchungen.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 DNA-Microarray-basierte Genotypisierung.....</b>	<b>38</b>
3.6.1 Extraktion der DNA.....	38
3.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und –Reinheit.....	39
3.6.3 Molekularbiologische Typisierung mittels Microarray-Technologie.....	39
3.6.3.1 Prinzip der DNA-Microarray-Untersuchungen.....	39
3.6.3.2 Durchführung der DNA-Microarray-Untersuchungen.....	41
3.6.3.3 Auswahl relevanter Pathogenitätsfaktor-Gene und Resistenzdeterminanten.....	42
<b>3.7 Erfassung des Phänotyps.....</b>	<b>44</b>
<b>3.8 Erstellung eines Antibiogramms.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9 Weiterführende Untersuchungen.....</b>	<b>46</b>
<b>3.10 Statistische Methoden.....</b>	<b>46</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Bestätigung der Spezieszugehörigkeit.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Zuordnung zu CC und <i>agr</i>-Gruppen.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Detektion von Pathogenitätsfaktor-Genen.....</b>	<b>50</b>
4.3.1 Detektion von Kapsel-Genen.....	50
4.3.2 Detektion von Hämolyisin-Genen.....	50
4.3.3 Detektion von Genen des Exfoliativen Toxins.....	51
4.3.4 Detektion von Enterotoxin-Genen.....	52
4.3.5 Detektion von Genen des Toxic-shock-syndrome-Toxins.....	53
4.3.6 Detektion von Leukozidin-Genen.....	54

4.3.7 Detektion von Genen extrazellulärer Enzyme.....	55
<b>4.4 Detektion von Resistenzdeterminanten.....</b>	<b>56</b>
4.4.1 Detektion des $\beta$ -Laktamase-Gens <i>blaZ</i> .....	56
4.4.2 Detektion des Gens <i>mecA</i> .....	56
4.4.3 Detektion weiterer Resistenzdeterminanten.....	57
<b>4.5 Erfassung des Phänotyps.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Zusammenführung von Ergebnissen der Phänotypisierung und der Genotypisierung.....</b>	<b>59</b>
<b>4.7 Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest.....</b>	<b>60</b>
<b>4.8 Zusammenführung von Ergebnissen zur Antibiotikaresistenz.....</b>	<b>63</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Klassifizierung der 189 <i>Staphylococcus aureus</i>-Isolate.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 CC-spezifische Ausstattung der 189 <i>Staphylococcus aureus</i>-Isolate mit Pathogenitätsfaktor-Genen.....</b>	<b>68</b>
<b>5.3 Resistenzverhalten der untersuchten 189 Isolate.....</b>	<b>76</b>
<b>5.4 Phänotypisierung der 189 Isolate mit Bezug zu den einzelnen CC.....</b>	<b>83</b>
<b>5.5 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>85</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>90</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>Bisherige Publikationen.....</b>	<b>127</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>128</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>Danksagung</b>	

## Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AdÖR	Anstalt des öffentlichen Rechts
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
CC	Klonaler Komplex (clonal complex)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
Fc	fragment crystallisable
g	Gramm
g´	Gravitationsbeschleunigung auf der Erdoberfläche
h	Stunden (hours)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
inkl.	inklusive
iP	isoelektrischer Punkt
k.A.	keine Angabe
KbE	Kolonie-bildende Einheit(en)
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mm	Millimeter

mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
Mbp	Megabasenpaare
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NMC	National Mastitis Council
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzwert (p-value)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
sec	Sekunden (seconds)
sog.	sogenante/sogenannter/sogenanntes
ssp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TVL	Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätszucht
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (transfer ribonucleic acid)
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
var.	Variante (varietas)
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
>	größer als
<	kleiner als
∑	Summe
$\bar{x}$	Median

## Glossar I

Bezeichnungen der in dieser Untersuchung erwähnten Pathogenitätsfaktor-Gene (kursive Schreibweise) und verwendete Kurzbezeichnungen der Proteine:

<b>Bezeichnung des Gens</b>	<b>Kodiertes Protein</b>	<b>Kurzbezeichnung des Proteins (soweit in dieser Untersuchung verwendet)</b>
<i>cap</i>	Polysaccharidkapsel	-
<i>clfA</i>	Clumping-Faktor A	-
<i>clfB</i>	Clumping-Faktor B	-
<i>coa</i>	Koagulase	-
<i>etA</i>	Exfoliatives Toxin A	ET A
<i>etB</i>	Exfoliatives Toxin B	ET B
<i>etC</i>	Exfoliatives Toxin C	ET C
<i>etD</i>	Exfoliatives Toxin D	ET D
<i>fnbA</i>	Fibronectinbindendes Protein A	-
<i>fnbB</i>	Fibronectinbindendes Protein B	-
<i>hla</i>	Hämolysin $\alpha$	-
<i>hlb</i>	Hämolysin $\beta$	-
<i>hlc</i>	Hämolysin $\gamma$	-
<i>hld</i>	Hämolysin $\delta$	-
<i>hlgA</i>	Hämolysin $\gamma$ , Komponente A	HlgA
<i>katA</i>	Katalase	-
<i>lukD</i>	Leukozidin D	LukD
<i>lukE</i>	Leukozidin E	LukE
<i>lukF-hlg</i>	Hämolysin $\gamma$ , Komponente B	HlgB
<i>lukS-hlg</i>	Hämolysin $\gamma$ , Komponente C	HlgC
<i>lukF-PV</i>	Panton-Valentine-Leukozidin (F-Komponente)	LukF-PV
<i>lukS-PV</i>	Panton-Valentine-Leukozidin (S-Komponente)	LukS-PV
<i>lukF-P83</i>	Leukozidin F (bovine Variante)	LukF-P83
<i>lukM</i>	Leukozidin M	LukM
<i>nuc</i>	Thermonuklease	-
<i>sak</i>	Staphylokinase	-
<i>sea</i>	Enterotoxin A	SEA
<i>seb</i>	Enterotoxin B	SEB
<i>sec</i>	Enterotoxin C	SEC
<i>sed</i>	Enterotoxin D	SED
<i>see</i>	Enterotoxin E	SEE

<i>seg</i>	Enterotoxin G	SEG
<i>seh</i>	Enterotoxin H	SEH
<i>sei</i>	Enterotoxin I	SEI
<i>sej</i>	Enterotoxin J	SEJ
<i>sek</i>	Enterotoxin K	SEK
<i>sel</i>	Enterotoxin L	SEL
<i>sem</i>	Enterotoxin M	SEM
<i>sen</i>	Enterotoxin N	SEN
<i>seo</i>	Enterotoxin O	SEO
<i>sep</i>	Enterotoxin P	SEP
<i>seq</i>	Enterotoxin Q	SEQ
<i>ser</i>	Enterotoxin R	SER
<i>ses</i>	Enterotoxin S	SES
<i>set</i>	Enterotoxin T	SET
<i>seu</i>	Enterotoxin U	SEU
<i>sev</i>	Enterotoxin V	SEV
<i>spa</i>	Protein A	-
<i>tst-1</i>	Toxic-shock-syndrome-Toxin	TSST-1
<i>tst-RF122</i>	Toxic-shock-syndrome-Toxin (bovine Variante)	-

## Glossar II

Bezeichnungen der in dieser Untersuchung erwähnten Resistenzdeterminanten (kursive Schreibweise):

<b>Resistenzdeterminante</b>	<b>Funktion</b>
<i>aacA-aphD</i>	Gentamicin-Resistenz
<i>blaZ</i>	Penicillin-Resistenz
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Resistenz
<i>cfr</i>	Chloramphenicol-Resistenz
<i>dfrA</i>	Trimethoprim-Resistenz
<i>dfrB</i>	Trimethoprim-Resistenz
<i>dfrD</i>	Trimethoprim-Resistenz
<i>dfrG</i>	Trimethoprim-Resistenz
<i>dfrK</i>	Trimethoprim-Resistenz
<i>ermA</i>	Erythromycin-/Clindamycin-Resistenz
<i>ermB</i>	Erythromycin-/Clindamycin-Resistenz
<i>ermC</i>	Erythromycin-/Clindamycin-Resistenz
<i>far</i>	Fusidinsäure-Resistenz
<i>fexA</i>	Chloramphenicol-Resistenz
<i>fosB</i>	Epoxyd-Resistenz
<i>mecA</i>	Methicillin-/Oxacillin-Resistenz
<i>mefA</i>	Makrolid-Resistenz
<i>msrA</i>	Erythromycin-Resistenz
<i>msrB</i>	Erythromycin-Resistenz
<i>norA</i>	Fluorchinolon-Resistenz
<i>tetK</i>	Tetrazyklin-Resistenz
<i>tetL</i>	Tetrazyklin-Resistenz
<i>tetM</i>	Tetrazyklin-Resistenz
<i>vanA</i>	Vancomycin-Resistenz
<i>vanB</i>	Vancomycin-Resistenz
<i>vanZ</i>	Teicoplanin-Resistenz
<i>vatA</i>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/Streptograminen
<i>vatB</i>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/Streptograminen
<i>vgaA</i>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/Streptograminen
<i>vgb</i>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/Streptograminen

### **1 Einleitung**

*Staphylococcus aureus* zählt zu den bedeutendsten Erregern boviner Mastitiden (KAPUR et al. 1995). Als Verursacher schwer zu therapierender, vorwiegend chronischer Euterentzündungen bedingt dieser Erreger hohe ökonomische Verluste (ZECCONI 2006). Epidemiologische Studien lassen auf die Existenz verschiedener *Staphylococcus aureus*-Stämme mit unterschiedlicher Relevanz im Mastitisgeschehen schließen (SOMMERHÄUSER 2001, HERRON-OLSON et al. 2007). Die genetische Heterogenität des Erregers wird darüber hinaus durch die An- bzw. Abwesenheit verschiedenster Resistenzdeterminanten und Pathogenitätsfaktoren erhöht, die auch aus humanmedizinischer Sicht von Bedeutung sind. So sind mehrfachresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme als gefährliche Zoonose-Erreger anzusehen. Weiterhin ist die Fähigkeit des Bakteriums zur Bildung hitzestabiler Enterotoxine von lebensmittelhygienischer Relevanz.

Ziel der durchgeführten Untersuchung war daher, Aufschluss über Resistenzdeterminanten und Pathogenitätsfaktoren am Beispiel der in Thüringer Milchviehherden vorkommenden *Staphylococcus aureus* zu erhalten, wobei die DNA-Microarray-Technologie zum Einsatz kam. Die Anwendung dieses innovativen Verfahrens sollte zudem Kenntnisse über die Verbreitung verschiedener klonaler Komplexe des Erregers in Thüringer Beständen vermitteln. Darüber hinaus sollte analysiert werden, inwieweit der Genotyp mit dem Phänotyp der Isolate korreliert.

## **2 Literaturübersicht**

### 2.1 Staphylococcus aureus

#### 2.1.1 Taxonomie

*Staphylococcus aureus* zählt zu den unbeweglichen, grampositiven Kokken aus der Familie der *Staphylococcaceae* (früher *Micrococcaceae*). Die ca. 0,7–1,2 µm großen Bakterien wachsen fakultativ anaerob. Eine Ausnahme bildet *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius*, eine obligat anaerobe Subspezies (SOMERVILLE und PROCTOR 2009).

Die Gattungsbezeichnung „*Staphylococcus*“ leitet sich vom griechischen Begriff *staphyle* (=Traube) ab und bezieht sich auf das für Staphylokokken charakteristische mikroskopische Bild trauben- oder haufenförmiger Kokkenaggregate (OGSTON 1882, GATERMANN und MIKSITS 2009). Allerdings können Staphylokokken auch einzeln oder paarweise gelagert vorkommen (SELBITZ 2006). Sie bilden keine Sporen und sind in der Regel zur Bildung von Katalase fähig, die die Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> katalysiert (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Staphylokokken sind Besiedler der Haut, Hautdrüsen und Schleimhäute des Menschen und warmblütiger Tiere (KLOOS und SCHLEIFER 1986).

Aufgrund seines pathogenen Potentials ist *Staphylococcus aureus* der bedeutendste Vertreter der Koagulase-positiven Staphylokokken (MARTINEAU et al. 2000). Im Gegensatz zu den Koagulase-negativen Staphylokokken sind diese in der Lage, das extrazelluläre Protein Koagulase zu bilden. Neben *Staphylococcus aureus* sind auch *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* ssp. *coagulans* und einige Vertreter der Spezies *Staphylococcus hyicus* zur Bildung von Koagulase fähig (PHILLIPS und KLOOS 1981, VARALDO et al. 1988, DEVRIESE et al. 2005). Alle Koagulase-positiven Staphylokokken sind Erreger eitriger Infektionskrankheiten (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, DEVRIESE et al. 2005). Während einige der aufgeführten Spezies bzw. Subspezies in ihrem Vorkommen auf wenige Wirte beschränkt sind, besitzt *Staphylococcus aureus* ein sehr breites Wirtsspektrum (VALENTIN-WEIGAND 2011).

#### 2.1.2 Morphologie

*Staphylococcus aureus* ist durch schnelles aerobes oder anaerobes Wachstum auf einem breiten Spektrum von Nährmedien charakterisiert. Einzelne Kolonien sind deutlich voneinander abgegrenzt, glatt und konvex mit einem Durchmesser von 1–6 mm nach 18–20h Bebrütung bei 37 °C. Die klassische goldfarbene Pigmentierung, nach der die Spezies benannt ist (lateinisch: aureus = golden), wird durch Carotinoide hervorgerufen. Sie ist allerdings nicht immer vorhanden, so dass die Farbe der Kolonien von Grau, Grauweiß über Gelblich, Gelborange bis Orange variiert.

Die Koloniemorphologie ist weiterhin vom Vorhandensein einer Kapsel abhängig. Stark bekapselte Kolonien sind meist kleiner, stärker gewölbt und haben ein glänzend feuchtes Aussehen.

Auf Blutagar zeigt *Staphylococcus aureus* in aller Regel hämolytische Aktivität (KLOOS und SCHLEIFER 1986, BLOBEL und SCHLIESSER 1994).

### 2.1.3 Genom

Neben einer konservierten Kernregion umfasst das Genom von *Staphylococcus aureus* akzessorische Gene, die unter anderem für eine Vielzahl von Virulenzfaktoren kodieren.

Zur Kernregion gehören die Abschnitte des Genoms, die in mehr als 80 % aller Isolate einer Spezies vorhanden sind (GILL 2009). Diese Abschnitte sind essentiell für regulatorische und metabolische Funktionen (sog. „housekeeping functions“), kodieren aber auch für eine Reihe von Virulenzfaktoren, die bei nahezu allen *Staphylococcus aureus*-Isolaten vorhanden sind. So beherbergt das Kerngenom unter anderem die Gene, die für Koagulase (*coa*), Protein A (*spa*), Clumping-Faktor (*clfA*, *clfB*) und Fibronectin-bindendes Protein A (*fnbA*) kodieren (OHLSEN et al. 2006). Die Größe der Kernregion variiert zwischen 2,8 und 2,9 Mbp, wobei sie 75 % der gesamten Erbinformation des Bakteriums beinhaltet (LINDSAY und HOLDEN 2004).

Das akzessorische Genom stellt einen flexiblen Genpool dar, der ausschlaggebend für die Virulenz bestimmter *Staphylococcus aureus*-Stämme ist. Neben Genen, die für verschiedene Virulenzfaktoren (Exotoxine, Enterotoxine) kodieren, sind auch Resistenzgene vorhanden. Die Mehrheit dieser Gene liegt auf mobilen genetischen Elementen wie Pathogenitätsinseln, chromosomalen Kassetten, Transposons und Plasmiden, wodurch der horizontale Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen möglich wird (MOORE und LINDSAY 2001, OHLSEN et al. 2006, HERRON-OLSON et al. 2007, HAVERI 2008). Durch Kombination bestimmter „mobiler“ Virulenzfaktoren entstehen Stämme, die in der Lage sind, in einem bestimmten Wirt ein bestimmtes Krankheitsbild hervorzurufen (GILL 2009).

### 2.1.4 Klassifizierung boviner *Staphylococcus aureus*-Isolate

Bereits in den 1960er Jahren wurde beschrieben, dass sich *Staphylococcus aureus*-Isolate aus bovinem Material von solchen unterscheiden, die aus anderen Wirten isoliert werden (MEYER 1967). Aufgrund der Übereinstimmung morphologischer Merkmale und einfacher biochemischer Tests bei einigen Isolaten, die aus derselben Wirtsspezies stammten, beschrieben MEYER (1967) und WITTE et al. (1977) verschiedene Varianten von *Staphylococcus aureus*. Die Autoren betrachteten dabei die Koagulation von humanem und bovinem Plasma, das Wachstum auf Kristallviolett-Agar, den Hämolyseintyp, die Fibrinolyseproduktion und die Pigmentbildung. Der überwiegende Teil der bovinen Isolate wurde von den Autoren der Variante *Staphylococcus aureus* var. *bovis* zugeordnet. Neben den von MEYER (1967) und WITTE et al. (1977) berücksichtigten Merkmalen bezogen HAJEK und MARSALEK (1971) das Vorhandensein des Clumping-Faktors in ihre Untersuchungen ein. Sie beschrieben auf dieser Grundlage die Biotypen A-F, wobei der Biotyp C spezifisch für Rind und Schaf war.

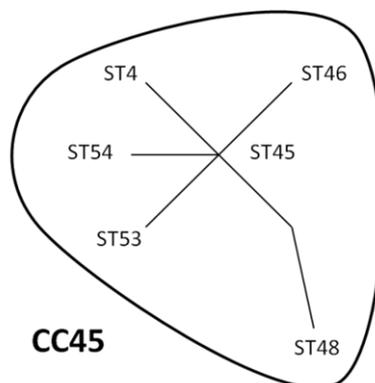
Durch die fortschreitende Entwicklung molekularbiologischer Verfahren ist heute die detaillierte Betrachtung des Genoms von *Staphylococcus aureus* möglich. Bei epidemiologischen Untersuchungen zum Vorkommen von *Staphylococcus aureus* beim Rind kamen in der Vergangenheit verschiedene molekularbiologische Methoden wie die Pulsfeldgelelektrophorese und die Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen zum Einsatz (SOMMERHÄUSER 2001, CABRAL 2003).

Allerdings gestaltet sich der Vergleich der Ergebnisse innerhalb verschiedener Labors schwierig. Möglich wird ein Vergleich bei Methoden wie der DNA-Sequenzierung bestimmter Genloci (z.B. *spa*-Typisierung), dem „Multi-Locus-Sequenz-Typing“ (MLST) und der Microarray-Technologie. Darüber hinaus ermöglichen diese Methoden die Ermittlung epidemiologischer Zusammenhänge zwischen verschiedenen *Staphylococcus aureus*-Isolaten (FRÉNAVY et al. 1996, SUNG et al. 2008, GRABER et al. 2009, HATA et al. 2010a, SALAM et al. 2010).

Ein weit verbreitetes Klassifizierungsverfahren, das die Betrachtung der Nukleotidabfolge in den Mittelpunkt rückt, stellt die MLST dar. Die Charakterisierung erfolgt beim MLST durch die Sequenzierung von sieben etwa 450 bp großen Genfragmenten, die sich innerhalb essentieller Gene der jeweiligen Bakterienspezies (sog. „housekeeping genes“) befinden (SMITH et al. 2005a). So ist jedes Bakterienisolat durch die Allele an diesen sieben Loci, das sog. „allelische Profil“, definiert.

Jedem allelischen Profil wird ein Sequenztyp (ST) zugeordnet, der eine eindeutige Charakterisierung des Isolates darstellt. Isolate mit demselben ST weisen an allen sieben Loci identische Sequenzen auf und werden als Angehörige eines Klons angesehen.

Klonale Komplexe (Clonal Complexes, CC) sind aus mehreren ST bestehende Gruppen. Sie sind dadurch definiert, dass jeder ST über ein allelisches Profil verfügt, das mit dem Profil mindestens eines weiteren Sequenztyps desselben klonalen Komplexes verwandt ist. Die Verwandtschaft zweier Sequenztypen wird dadurch definiert, dass mindestens fünf von sieben Allelen identisch sind. Die Bezeichnung der klonalen Komplexe richtet sich nach dem Sequenztyp, der sich von den meisten anderen ST innerhalb des klonalen Komplexes lediglich in einem Allel unterscheidet (FEIL et al. 2003, FENG et al. 2008) (Abb. 1).



**Abb.1:** Exemplarische Darstellung von CC45 (modifiziert nach FEIL et al. 2003)

Während einige ST, die aus Milch isoliert werden können, bei einer Vielzahl von Wirten vorkommen, können andere ST nur beim Rind nachgewiesen werden (VAN DEN BORNE et al. 2010). Die Wirtsspezifität dieser Stämme lässt auf eine Adaption an die bovine Milchdrüse schließen (HERRON-OLSON et al. 2007, VAN DEN BORNE et al. 2010). Laut HERRON-OLSON et al. (2007) gehen die

kuhspezifischen ST auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück, der große Ähnlichkeit mit humanspezifischen Staphylokokken aufweist. Sie unterscheiden sich von solchen, die mit anderen Tierarten assoziiert sind (VAN DEN BORNE et al. 2010).

Verschiedenen Studien hatten zum Ergebnis, dass nur wenige Genotypen für den Großteil der Mastitiden in Rinderbeständen verantwortlich sind (KAPUR et al. 1995, FITZGERALD et al. 1997, MØRK et al. 2005, SMITH et al. 2005b, FOURNIER et al. 2008, SUNG et al. 2008). Während einige dieser Genotypen kuh- bzw. wiederkäuerspezifisch sind, kommen andere bei einer Vielzahl von Spezies vor (SUNG et al. 2008, MONECKE et al. 2011a). Laut BARKEMA et al. (2006) dominiert innerhalb einer Herde in der Regel ein bestimmter Stamm, der sich kontagiös verhält. Neben diesem Stamm existieren weitere Stämme mit geringer Prävalenz.

### 2.1.5 Unterschiede bezüglich der Virulenz verschiedener *Staphylococcus aureus*

Die verschiedenen ST unterscheiden sich neben ihrer Epidemiologie auch in ihrer Virulenz, woraus unterschiedliche Therapie- und Sanierungsmaßnahmen resultieren (GRABER et al. 2009).

In Untersuchungen von VAN DEN BORNE et al. (2010) wiesen Mastitiden, die durch kuhspezifische ST hervorgerufen worden waren, verglichen mit Mastitiden durch nicht-kuhspezifische *Staphylococcus aureus* eine niedrigere Heilungsrate nach antibiotischer Behandlung auf. Die Autoren schlossen daraus, dass Mastitiden durch kuhspezifische ST länger behandelt werden müssen als solche durch nicht-kuhspezifische ST. Als weiteres Ergebnis ihrer Untersuchungen stellten VAN DEN BORNE et al. (2010) fest, dass die Mehrheit der Stämme, die ausschließlich bei Kühen vorkommen, Penicillin-sensibel war, wohingegen alle nicht-kuhspezifischen ST resistent gegenüber Penicillin waren.

ZADOKS et al. (2000) konnten Zusammenhänge zwischen dem Genotyp und der Schwere der Erkrankung feststellen. Auch HAVERI et al. (2005) setzten mittels Pulsfeldgelelektrophorese ermittelte Genotypen mit der Manifestation und Persistenz boviner *Staphylococcus aureus*-Infektionen in Beziehung. Von fünf in der Untersuchung vorherrschenden Genotypen ging einer (Pulsotyp B) mit schwerwiegenden Mastitiden einher, die jedoch gut auf eine Therapie ansprachen. Diese Zusammenhänge konnten MIDDLETON et al. (2002) nicht bestätigen, als sie die Immunantwort von 191 Kühen mit dem jeweils isolierten *Staphylococcus aureus*-Stamm verglichen. Die Autoren folgerten, dass die Immunantwort in erster Linie vom individuellen Wirt abhängt und nicht vom verursachenden *Staphylococcus aureus*-Stamm.

Weiterhin wurde ein unterschiedlicher Einfluss der verschiedenen ST auf die Zellzahl (GRABER et al. 2009) und den Milchproduktionsverlust (MIDDLETON und FOX 2002) ermittelt.

Bei *in vitro* Untersuchungen von MULLARKY et al. (2001) unterschieden sich einige Stämme in ihrer Fähigkeit, die Phagozytose zu umgehen. Darüber hinaus wiesen HENSEN et al. (2000) Unterschiede im Potential nach, in bovine Alveolarepithelzellen einzudringen.

## 2.1.6 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenese einer *Staphylococcus aureus*-Infektion stellt ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl sog. Pathogenitätsfaktoren dar, die zum einen fest mit der Zellwand verbunden sind, zum anderen in Form von Enzymen und Toxinen in die Umgebung der Staphylokokken sezerniert werden. In ihrer Gesamtheit können sie *Staphylococcus aureus* nicht nur die Adhäsion an wirtseigene Matrix- und Plasmaproteine sowie die Invasion von Wirtsgewebe, sondern auch die Umgehung der Immunantwort ermöglichen (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Tab. 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten dieser Faktoren, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

**Tab. 1:** Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus aureus*

(modifiziert nach VALENTIN-WEIGAND 2011)

Vorkommen	Faktor	kodierendes Gen	Referenz
zellgebunden	Kapsel	<i>cap</i>	SAU et al. (1997)
	Protein A	<i>spa</i>	PATEL et al. (1989)
	Fibronectinbindendes Protein	<i>fnbA, fnbB</i>	BURKE et al. 2010
	Clumping-Faktor	<i>clfA, clfB</i>	GANESH et al. (2008)
sezerniert	Koagulase	<i>coA</i>	MONECKE et al. (2007a)
	Hämolsine ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ )	<i>hla, hlb, hlg, hld</i>	FRITSCH (1970)
	Enterotoxine	<i>sea-see, seg-seu</i>	ARGUDIN et al. (2010)
	Toxic-shock-syndrom-Toxin	<i>tst-1</i>	DINGES et al. (2000)
	Exfoliative Toxine	<i>eta, etb</i>	LADHANI et al. (1999)
	Leukozidin	<i>lukS-PV, lukF-PV, lukS, lukF, lukF-P83, lukM, lukD, luke</i>	MONECKE et al. (2007a)
	Extrazelluläre Enzyme	<i>sak, katA, nuc</i>	MONECKE et al. (2007a)

Während einige Faktoren wie Koagulase, Clumping-Faktor und Protein A bei nahezu allen *Staphylococcus aureus*-Isolaten vorhanden sind und daher als taxonomische Merkmale dieser Bakterienspezies fungieren, treten insbesondere verschiedene Toxine nicht regelmäßig auf (MÜLLER et al. 1983, OHLSEN et al. 2006).

Die zeitliche Abfolge der Expression der Pathogenitätsfaktoren wird durch verschiedene regulatorische Loci gesteuert. Zu diesen zählen laut NOVICK (2003a) unter anderem *agr* (accessory gene regulator), die *sar* (staphylococcal accessory regulator)-Familie, *sae*, *srr* und *sigB*. Eine zentrale Stellung nimmt dabei das *agr*-System ein, mit dem die anderen Regulatoren in unterschiedlicher Weise interagieren (OHLSEN et al. 1997, GOERKE und WOLZ 2004). Die Aktivität des *agr*-Systems steht in Zusammenhang mit der vorliegenden Bakteriendichte (RECSEI et al. 1986). In der Frühphase

einer *Staphylococcus aureus*-Infektion, in der nur eine geringe Keimdichte vorliegt, ist die *agr*-Aktivität gering. So kommt es in erster Linie zur Expression von Oberflächenproteinen, die die Adhäsion an wirtseigene Strukturen ermöglichen. Bei fortschreitender Kolonisation führt eine Aktivitätssteigerung des Regulatorsystems zur verminderten Expression von Adhäsionsstrukturen und zur vermehrten Expression von Exotoxinen und Exoproteinen. Letztgenannte Faktoren können zur Ausbreitung der Bakterien und zur Bezwingung des wirtseigenen Immunsystems führen (PENG et al. 1988, OTTO 2001).

Die beschriebene Fähigkeit, auf eine fluktuierende Bakteriendichte mit einer Regulation der Genexpression zu reagieren, wird als „Quorum sensing“ bezeichnet (MILLER und BASSLER 2001). Grundlage für diese bakterielle Kommunikation bilden sog. Autoinducer oder Pheromone, die von den Bakterien in die Umgebung abgegeben werden und deren Konzentration daher in direktem Zusammenhang mit der Dichte der Bakterienpopulation steht. Durch Bindung der Pheromone an Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche kann die Populationsdichte von den Bakterien wahrgenommen und die Genexpression entsprechend der vorliegenden Verhältnisse reguliert werden (MORSCHHÄUSER 2008).

Im *agr*-System fungiert das Oktapeptid AgrD als Autoinducer. AgrD akkumuliert extrazellulär und bindet an das membranintegrierte Sensorprotein AgrC, wodurch bei Anreicherung des Oktapeptids eine Rückkopplungsschleife in Gang gesetzt wird. In der späten exponentiellen Wachstumsphase kommt es dadurch zur Aktivierung der meisten extrazellulären Proteine sowie der Polysaccharidkapsel und zur Inhibierung einiger Zellwand-assoziiierter Bindeproteine (GOERKE und WOLZ 2004). Anhand der Autoinducer-Rezeptor-Spezifität werden *Staphylococcus aureus*-Isolate in vier Interferenzgruppen eingeteilt. Innerhalb einer Gruppe kann das autoinduzierende Peptid die *agr*-Antwort aktivieren, wo es hingegen die *agr*-Expression anderer Gruppen hemmt (JARRAUD et al. 2002, SHOPSIN et al. 2003). Dabei muss keine phylogenetische Verwandtschaft der Mitglieder einer Gruppe vorliegen (FENG et al. 2008).

JARRAUD et al. (2000) stellten einen Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und *agr*-Interferenzgruppe her. Während Isolate der *agr*-Interferenzgruppe III gehäuft Toxic-shock-syndrom-Toxin produzieren, ist bei der *agr*-Interferenzgruppe IV eine Korrelation zu Stämmen vorhanden, die Exfoliatives Toxin produzieren.

### 2.1.6.1 Zellgebundene Substanzen

#### 2.1.6.1.1 Polysaccharidkapsel

Beobachtungen zum Vorkommen von Kapseln bei *Staphylococcus aureus* gehen auf BIGGER et al. (1927) zurück. Diese Autoren beschrieben bei einigen Kolonien eine schleimige Morphologie, die durch eine Bekapselung der Bakterien bedingt war (GILBERT 1931). Die meisten *Staphylococcus aureus*-Isolate sind jedoch mikrobekapselt und daher nicht von auffällig schleimiger Koloniemorphologie (ARBEIT 1984).

Kapseln von *Staphylococcus aureus* haben eine Polysaccharidstruktur (WILEY und WONNACOTT 1962) und finden sich bei über 90 % der klinischen Isolate (SAU et al. 1997, THAKKER et

al. 1998). Bei den elf bisher beschriebenen Serotypen dominieren die Kapseltypen 5 und 8 (SAU et al. 1997, O'RIORDAN und LEE 2004), wobei in bovinen Kulturen der Kapseltyp 5 mit einer Prävalenz von 51,4 % am häufigsten vorkommt (POUTREL et al. 1988).

Während das Ausbleiben der Komplementaktivierung und damit die pathogene Bedeutung der stark bekapselten Serotypen 1 und 2 nachgewiesen ist (MELLY et al. 1974, VERBRUGH et al. 1982), wird die Pathogenität der Kapseltypen 5 und 8 kontrovers diskutiert (THAKKER et al. 1998). So sprachen KARAKAWA et al. (1988) und NILSSON et al. (1997) den Serotypen 5 und 8 antiphagozytäre Eigenschaften zu, während XU et al. (1992) diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten. Die Rolle der Kapsel in der Pathogenität von *Staphylococcus aureus* scheint daher vom Versuchsaufbau und der jeweiligen Untersuchung abhängig zu sein (THAKKER et al. 1998).

### 2.1.6.1.2 Protein A (IgG-Fc-Rezeptor)

SJÖQUIST et al. (1972) beschrieben Protein A als eine Substanz, die kovalent an die Peptidoglykanstrukturen der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* gebunden ist. Jedoch wird insbesondere bei Methicillin-resistenten Stämmen auch von einem extrazellulären Vorkommen berichtet (MOVITZ 1976, LINDMARK et al. 1977).

Die pathogene Bedeutung dieses Proteins ergibt sich aus der Bindung an die Fc-Domäne von IgG. Auf diese Weise blockiert Protein A die Bindungsstelle der Komplementkomponente C1q. Der klassische Weg der Komplementkaskade wird gehemmt und infolgedessen die Opsonisierung vermindert (LAMBRIS et al. 2008).

### 2.1.6.1.3 Fibronectin-bindendes Protein

Die erstmals von KUUSELA (1978) beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Fibronectin und *Staphylococcus aureus* basieren auf Fibronectin-bindenden Proteinen auf der Staphylokokkenoberfläche (RYDEN et al. 1983). Diese Proteine befähigen die Staphylokokken, unter Vermittlung von Fibronectin an Epithel- sowie Endothelzellen und damit auch an bovine Euterzellen zu binden (VANN et al. 1989, DZIEWANOWSKA et al. 1999).

LAMMERS et al. (1999b) bezeichnen die Fibronectin-bindenden Proteine als essentiell für die Adhäsion und Invasion der bovinen Euterzelle und räumen ihnen damit eine bedeutende Rolle im Mastitisgeschehen ein. Im Gegensatz zu anderen Bakterien, die durch Sekrete vom Entzündungsgeschehen fortgespült werden, können adhärierte Staphylokokken sich am Ort ihrer Anheftung vermehren und durch gebildete Enzyme und Toxine den Wirtsorganismus schädigen (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Für die Invasion der Wirtszelle ist die Ausbildung einer Fibronectin-Brücke zwischen dem Fibronectin-bindenden Protein A und einem Integrin der Wirtszelle von Bedeutung (SINHA et al. 1999).

### 2.1.6.1.4 Clumping-Faktor

Laut DUTHIE (1954) reagiert der Clumping-Faktor direkt mit Fibrinogen und führt so zu einer Verklumpung der Staphylokokken im Plasma. Damit unterscheidet sich dieses Protein, das auch als „gebundene Koagulase“ bezeichnet wird, von der freien Koagulase, für deren Verklumpungsreaktion die Aktivierung von Prothrombin nötig ist (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, McDEWITT et al. 1997).

Andere Autoren stellen den Clumping-Faktor nicht der freien Koagulase gegenüber, sondern sehen ihn vielmehr als Zellwand-assoziierten Teil derselben an (JACHERTS 1956, BODEN und FLOCK 1989). NI EIDHIN et al. (1998) beschrieben neben dem bis zu diesem Zeitpunkt bekannten fibrinogenbindenden Clumping-Faktor A einen zweiten Clumping-Faktor. Diese als Clumping-Faktor B bezeichnete Komponente bindet an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Fibrinogens, während Clumping-Faktor A mit den  $\gamma$ -Ketten interagiert.

Die Tatsache, dass der Clumping-Faktor bei nahezu allen pathogenen Staphylokokken nachweisbar ist, stellt einen Hinweis für seine pathogene Relevanz dar (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, GANESH et al. 2008). Von Bedeutung ist hierbei die durch den Clumping-Faktor bedingte Hemmung der Opsonisierung, die eine Beeinträchtigung der Phagozytose nach sich zieht. Als Folge der Wechselwirkungen zwischen Fibrinogen und dem Clumping-Faktor der Staphylokokkenoberfläche kommt es zu einer sterischen Behinderung, die die Anlagerung der Komplementkomponente C3 hemmt. C3 wird dadurch in vermindertem Umfang zu C3b aktiviert und seine opsonisierende Wirkung dementsprechend reduziert (BLOBEL und SCHLIESSER 1994).

### 2.1.6.2 Extrazelluläre Enzyme und Toxine

Extrazelluläre Proteine befähigen *Staphylococcus aureus*, das Wirtsgewebe zu besiedeln und Krankheiten hervorzurufen. Hämolytine, Koagulase und verschiedenste Enzyme werden von nahezu allen *Staphylococcus aureus*-Isolaten gebildet. Sie modifizieren das Wirtsgewebe und schaffen damit die Bedingungen, die die Bakterien für ihr Wachstum benötigen. Darüber hinaus werden von einigen Isolaten zusätzliche Exoproteine produziert, zu denen das Toxic-shock-syndrom-Toxin, die Enterotoxine, Exfoliative Toxine und Leukozidine gehören (DINGES et al. 2000).

#### 2.1.6.2.1 Koagulase

Die Koagulase wird von allen *Staphylococcus aureus*-Kulturen gebildet und gilt als wichtigstes Kriterium zur Identifizierung dieser Bakterien (KLOOS und SCHLEIFER 1986). Sie stellt ein extrazelluläres Protein ohne enzymatischen Charakter dar (McDEWITT et al. 1992). Durch Bindung von Prothrombin durch die Koagulase entsteht „Staphylothrombin“, ein proteolytisch wirkender Komplex. Dieser Komplex hat Thrombin-ähnliche Funktionen, ohne dass es zur Überführung des Prothrombins in Thrombin kommt. So führt Staphylothrombin durch Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinogen zur Polymerisation des Fibrinogens. Dies resultiert in einer Koagulation des Plasmas (LUCZAK-KADLUBOWSKA et al. 2006, CHENG et al. 2010). Nach BODEN und FLOCK (1989) ist die Koagulase weiterhin zu direkten Wechselwirkungen mit Fibrinogen fähig und so auch in Abwesenheit von Prothrombin in der Lage, Plasma zu verklumpen. Die Polymerisation des Fibrinogens bedingt *in vivo* die Ausbildung einer Fibrinbarriere, die die Phagozytose beeinträchtigt und die Staphylokokken vor der wirtseigenen Abwehr schützt (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, PANIZZI et al. 2006).

#### 2.1.6.2.2 Hämolsine

Nahezu alle *Staphylococcus aureus*-Isolate produzieren die vier Hämolsine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die aufgrund ihres zytotoxischen Charakters auch als Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltatoxin bezeichnet werden (DINGES et al. 2000).

Das Alphatoxin wurde von allen Hämolsinen am intensivsten untersucht. Es wird vom *hla*-Gen kodiert und stellt ein aus 293 Aminosäuren bestehendes Polypeptid dar (OHLSEN et al. 1997, DINGES et al. 2000). Dieses Hämolsin interagiert mit vielen Zelltypen und ist mit einem weiten Spektrum zytotoxischer und pharmakologischer Effekte assoziiert (ROGOLSKY 1979). Die Zytotoxizität wird durch den porenbildenden Charakter des Alphatoxins vermittelt. Es wird als Monomer von *Staphylococcus aureus* abgegeben und bindet an die Membranen der Zielzelle. Dort unterliegt es starken Konformationsänderungen, in deren Folge es zur Ausbildung transmembranöser Poren kommt, die die osmotische Lyse der Zielzelle bedingen. Diese Zellyse ist nicht auf Erythrozyten beschränkt. Ebenso werden Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen zerstört (VANN und PROCTOR 1988, BHAKDI und TRANUM-JENSEN 1991). Da die Porenbildung allein nicht alle pathophysiologischen Effekte des  $\alpha$ -Hämolsins hinreichend erklärt, wird von weiteren sekundären Mechanismen des Toxins ausgegangen. WISEMANN (1975) beschreibt unter anderem Auswirkungen auf den Kreislauf, das Zentrale Nervensystem und den Atmungsapparat.

20–50 % der an einer Mastitis beteiligten *Staphylococcus aureus*-Isolate produzieren das Hämolsin  $\alpha$  (SUTRA und POUTREL 1994), das auf Blutagar eine vollständige Hämolyse hervorruft (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Um einen Aufschluss über die Rolle des Hämolsins  $\alpha$  im Mastitisgeschehen zu erhalten, führten WARD et al. (1979) Untersuchungen an Kaninchen durch. Die Injektion von Alphatoxin in deren Milchdrüse führte zu einer dosisabhängigen hämorrhagischen Nekrose des Drüsengewebes. Diese hämorrhagische Nekrose der Milchdrüse findet sich laut SEFFNER und BERGMANN (1994) auch beim Rind und ist auf eine Vasokonstriktion zurückzuführen. Laut ANDERSON (1976) übernimmt das Alphatoxin im bovinen Mastitisgeschehen eine Schlüsselrolle bei akuten gangränösen Mastitiden. KERRO DEGO et al. (2002) verglichen die Sensitivität von sekretorischen Zellen und Epithelzellen der bovinen Milchdrüse gegenüber Hämolsin  $\alpha$  und wiesen dabei eine höhere Empfindlichkeit der sekretorischen Zellen nach.

Das Betatoxin wird von einer Vielzahl Staphylokokken gebildet und stellt das Haupthämolsin bei tierischen Isolaten, insbesondere solchen vom Rind, dar (SUTRA und POUTREL 1994). Laut LARSEN et al. (2002) ist das Vorhandensein von Betatoxin typisch für *Staphylococcus aureus*-Isolate, die in boviner Mastitismilch nachgewiesen werden. Als Phospholipase C führt dieses Hämolsin durch die Hydrolyse von Sphingomyelin aus der Zellmembran zum Untergang der Erythrozyten (DOERY et al. 1963, FRITSCHKE 1970). Auf Blutagar ist diese Hämolyse nach einer 18-stündigen Bebrütung bei 37 °C zunächst unvollständig. Eine auf die Bebrütung folgende Kühlung verstärkt die hämolytische Aktivität *in vitro*, so dass es zu einer vollständigen Hämolyse kommt (SELBITZ 2006). Aus diesem Grund wird das Betatoxin auch als „hot-cold“-Hämolsin bezeichnet (DINGES et al. 2000). Die pathogene Bedeutung von Betatoxin im Mastitisgeschehen ist nicht eindeutig geklärt. Nach SUTRA und POUTREL (1994) führt die Injektion von gereinigtem Toxin in die Milchdrüse von

Kaninchen zur Ödematisierung des Gesäuges und zur Ansammlung von somatischen Zellen. Weiterhin berichten diese Autoren von toxinbedingten Gewebnekrosen und einer verminderten Aktivität des Alveolarepithels. Vergleichbare Auswirkungen des Betatoxins auf die bovine Milchdrüse wurden von NAIDU und NEWBOULD (1975) beschrieben.

Das Hämolysin  $\gamma$  stellt ein Zwei-Komponenten-Toxin dar. Strukturell bestehen diese Toxine aus einer S („slow eluted“)- und einer F („fast eluted“)-Komponente, die voneinander unabhängig sezerniert werden und in Kombination die Zelllyse bedingen (PRÉVOST et al. 1995, BOWNIK et al. 2004). Der dem Hämolysin zugrundeliegende Genkomplex *hlg* setzt sich aus den drei offenen Leserastern *hlgA*, *lukF-hlg* und *lukS-hlg* zusammen, die für die Proteine HlgA, HlgB und HlgC kodieren. Durch Kombination der F-Komponente HlgB mit einer der beiden S-Komponenten HlgA und HlgC ergibt sich die Möglichkeit zweier unterschiedlicher, aktiver  $\gamma$ -Hämolsine (DALLA SERRA et al. 2005).

Die hohe Sequenzhomologie mit den Genen des Panton-Valentine-Leukozidins legt eine enge Verwandtschaft der beiden Zwei-Komponenten-Toxine nahe, die unterschiedlich diskutiert wird. So lassen Untersuchungen von COONEY et al. (1993) vermuten, dass Hämolysin  $\gamma$  und Panton-Valentine-Leukozidin vom selben Genkomplex kodiert werden, während PRÉVOST et al. (1995) von zwei unterschiedlichen Loci ausgehen.

Hämolysin  $\gamma$  wird von nahezu allen *Staphylococcus aureus*-Isolaten gebildet. Da es durch Agar gehemmt wird, wurde das Vorhandensein dieses Toxins jedoch oft übersehen (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Durch die Bildung von Poren ist es in der Lage, Erythrozyten zu lysieren und neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu schädigen. Sein pathogener Einfluss im Mastitisgeschehen ist unklar (DINGES et al. 2000).

Das Hämolysin  $\delta$  wird von 97 % aller *Staphylococcus aureus*-Stämme gebildet. Es ist in der Lage, die Membranen von Erythrozyten, Leukozyten sowie vieler anderer Säugetierzellen und -zellorganellen zu zerstören (FREER und BIRKBECK 1982, DINGES et al. 2000). Der zugrunde liegende Mechanismus beruht vermutlich auf der amphipathischen Struktur des Toxins. Durch das gleichzeitige Vorliegen hydrophiler und hydrophober Domänen kann eine Einlagerung in die Zellmembran erfolgen, in deren Folge es zur Zerstörung der Membran kommt (FREER und BIRKBECK 1982, LEE und BIRKBECK 1983). THELESTAM und MÖLLBY (1975) verglichen Hämolysin  $\delta$  in Struktur und Wirkmechanismus mit dem Bienengift Mellitin. JANZON und ARVIDSON (1990) schrieben dem zugehörigen Gen *hld* darüber hinaus eine Rolle im *agr*-Regulationssystem zu. Laut WILLIAMS und HARPER (1947) ruft das Deltalysin auf Schafblutagar eine schmale, scharf begrenzte Zone vollständiger Hämolyse hervor. Die Rolle des Hämolsins  $\delta$  im bovinen Mastitisgeschehen ist nicht geklärt (DINGES 2000).

#### 2.1.6.2.3 Exfoliatives Toxin

Das Exfoliative Toxin (ET) wurde erstmals von KAPRAL und MILLER (1971) isoliert. Bislang wurden vier Serotypen beschrieben: ET A, ET B, ET C und ET D (LADHANI 2003). Nach PIEMONT et al. (1988) produzieren etwa 5 % der humanen Staphylokokken Exfoliatives Toxin.

ET A und ET B sind verantwortlich für das „Staphylococcal Scalded Skin Syndrome“, eine mit schwerwiegenden Hautläsionen einhergehende Krankheit, und eine Vielzahl anderer dermalen

Erkrankungen des Menschen (RIFAI et al. 1989, LADHANI 2003). Die beiden hitzestabilen Proteine fungieren als Serinproteasen (DANCER et al. 1990), die Desmoglein 1, ein Protein des Stratum granulosum, verdauen und dadurch zum Verlust des Zell-Zell-Kontaktes in diesem Bereich führen (LADHANI et al. 1999, LADHANI 2003). Darüber hinaus wird die Rolle von ET A als Superantigen diskutiert (FLEISCHER und BAILEY 1992, MONDAY et al. 1999). Über die Rolle von ET C und ET D im „Staphylococcal Scalded Skin Syndrome“ wird spekuliert (LADHANI 2003)

Die Bedeutung des Exfoliativen Toxins bei bovinen *Staphylococcus aureus*-Infektionen wurde von AKINEDEN et al. (2001) untersucht. Die Autoren wiesen in keiner der von ihnen untersuchten 103 aus Mastitismilch isolierten bovinen *Staphylococcus aureus*-Kulturen Exfoliatives Toxin nach. Sie leiteten daraus eine geringe Bedeutung dieses Toxins im Mastitisgeschehen ab. Diese Schlussfolgerungen wurden von HAVERI et al. (2007) untermauert, die bei 161 bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolaten kein Exfoliatives Toxin nachwiesen.

#### 2.1.6.2.4 Enterotoxine

Die Staphylokokkenenterotoxine (SE) sind eine Gruppe extrazellulärer Proteine, die aufgrund ihrer Fähigkeiten, humane Lebensmittelintoxikationen hervorzurufen, von großer lebensmittelhygienischer Relevanz sind (LOIR et al. 2003).

Neben den fünf sog. „klassischen“ Enterotoxinen A-E wurden in den letzten Jahren weitere Typen beschrieben, die mit SEG-SEV bezeichnet werden (REN et al. 1994, SU und WONG 1995, MUNSON et al. 1998, ZHANG et al. 1998, ORWIN et al. 2001, LETERTRE et al. 2003, ORWIN et al. 2003). Verschiedene Studien deuten jedoch darauf hin, dass die Fähigkeit, zu gastrointestinalen Symptomen zu führen, auf SEA-SEE sowie evtl. SEG, SEH, SEI, SER, SES und SET beschränkt ist (ORWIN et al. 2003, KLOTZ et al. 2003, ARGUDIN et al. 2010), wobei 95 % der durch *Staphylococcus aureus* bedingten Lebensmittelvergiftungen durch SEA-SEE verursacht werden (OMOE et al. 2002). Aufgrund der fehlenden oder bisher nicht nachgewiesenen emetischen Aktivität der erst in den letzten Jahren beschriebenen Enterotoxine SEJ-SEV werden diese von einigen Autoren auch als „staphylococcal enterotoxin-like“ (SEI) bezeichnet (OMOE et al. 2005a, ARGUDIN et al. 2010).

Nach Aufnahme des präformierten Toxins treten nach einer kurzen Inkubationszeit von zwei bis sechs Stunden Übelkeit, Erbrechen, abdominaler Schmerz und Diarrhoe auf. Die Symptome enden in der Regel nach ein bis zwei Tagen, in seltenen Fällen kann es jedoch zu lebensbedrohlichen kreislaufbedingten Schockzuständen kommen (BALABAN und RASOOLY 2000, ARGUDIN et al. 2010). Der den gastrointestinalen Symptomen zugrunde liegende Mechanismus bleibt unklar (BALABAN und RASOOLY 2000, HU et al. 2007). HU et al. (2007) wiesen jedoch nach, dass Hydroxytryptamin-Rezeptoren auf vagalen Afferenzen essentiell für den Emesis-auslösenden Effekt sind. Die für Menschen toxische Dosis von etwa 10 µg Enterotoxin ist sehr gering (RAJ und BERGDOLL 1969).

Von lebensmittelhygienischer Relevanz ist die Thermostabilität der Toxine und ihre relativ hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau, so dass sie sowohl eine Hitzebehandlung als auch die Magenpassage überstehen (BALABAN und RASOOLY 2000). Während bei einer Pasteurisierung vegetative Formen der Bakterien abgetötet werden, bleiben die Enterotoxine aktiv (HEESCHEN 1994). Neben beschriebener Fähigkeit, gastrointestinale Symptome in Primaten hervorzurufen und ihrer Thermostabilität listen DINGES et al. (2000) den Superantigencharakter als

weitere Eigenschaft der Enterotoxine auf. Nach der Bindung an MHC-II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen führen sie zur unspezifischen Aktivierung von T-Zellen (BALABAN und RASOOLY 2000). Die dadurch bedingte massive Freisetzung proinflammatorischer Substanzen kann im potentiell lebensbedrohlichen „Toxic Shock Syndrom“ münden (ARGUDIN et al. 2010).

Die Enterotoxin-Gene sind auf akzessorischen genetischen Elementen kodiert und befinden sich auf mobilen oder ehemals mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Prophagen oder Pathogenitätsinseln, wodurch der horizontale Transfer der Gene ermöglicht wird (ORWIN et al. 2001, ARGUDIN et al. 2010). Aufbau und Verteilung der mobilen genetischen Elemente variieren innerhalb der bisher vollständig sequenzierten *Staphylococcus aureus*-Genome zum Teil stark (HOLTFRETER 2006). Eine Besonderheit liegt bei den Genen von SEG, SEI, SEM, SEN und SEO vor. Diese sind zusammen im *enterotoxin gene cluster (egc)* lokalisiert und werden gemeinsam transkribiert (JARRAUD et al. 2001). Auf der Basis ihrer Untersuchungen zum *egc* vermuteten JARRAUD et al. (2001) weitere Enterotoxine, die aus diesem Operon hervorgehen. Diese Annahme wurde durch verschiedene Autoren aufgegriffen, so dass bislang *seu*, *seu<sub>2</sub>* und *sev* als Produkte genetischer Rekombinationen des *egc* identifiziert wurden (LETERTRE et al. 2003, THOMAS et al. 2006).

Die Synthese der Toxine erfolgt überwiegend in der postexponentiellen Wachstumsphase der Bakterien, wobei eine nachweisbare Bildung von Enterotoxinen erst bei Keimzahlen von mindestens  $10^5/g$  Lebensmittel auftritt. Jedes Enterotoxin wird als Vorläuferprotein gebildet und nach Abspaltung einer Signalsequenz aus der Zelle ausgeschleust (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, DINGES et al. 2000).

Charakteristische Eigenschaften der einzelnen Enterotoxine sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab.2: Charakteristische Eigenschaften der Staphylokokken-Enterotoxine

SE-Typ	MG (in Da)	iP	Emetische Aktivität	Lokalisation	Referenz
SEA	27100	7,26	ja	Prophage	KLOTZ et al. (2003) ARGUDIN et al. (2010)
SEB	28336	8,6	ja	Pathogenitätsinsel (SaPI3)	JONES und KHAN (1986) NOVICK (2003b)
SEC	27500- 27600	7,6- 8,1	ja	Pathogenitätsinsel (SaPI4)	NOVICK (2003b) ARGUDIN et al. (2010)
SED	27300	7,4	ja	Plasmid (pIB485)	CHANG und BERGDOLL (1979) BAYLES und IANDOLO (1989)
SEE	26425	7,0	ja	Prophage	BORJA et al. (1972) COUCH et al. (1988)
SEG	27043	k.A.	ja	genomische Insel (vSA $\beta$ )	MUNSON et al. (1998) ARGUDIN et al. (2010)
SEH	28500	5,7	ja	SCCmec	SU und WONG (1995) ARGUDIN et al. (2010)
SEI	24928	k.A.	schwach	genomische Insel (vSA $\beta$ )	MUNSON et al. (1998) ARGUDIN et al. (2010)
SEJ	28565	8,65	k.A.	Plasmid (pIB485)	BAYLES und IANDOLO (1989) ZHANG et al. (1998)
SEK	26000	7,0	k.A.	Pathogenitätsinsel (SaPI3)	ORWIN et al. (2001)
SEL	26000	8,5	nein <sup>3</sup>	Pathogenitätsinsel (SAPI4)	ORWIN et al. (2003)
SEM	24800	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	ARGUDIN et al. (2010)
SEN	26100	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	ARGUDIN et al. (2010)
SEO	26700	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	ARGUDIN et al. (2010)
SEP <sup>1</sup>	27000	k.A.	k.A. <sup>3</sup>	Prophage	ARGUDIN et al. (2001) KURODA et al. (2001)
SEQ	28200	k.A.	nein	Pathogenitätsinsel (SaPI3)	YARWOOD et al. (2002)
SER <sup>1</sup>	27000	k.A.	ja	Plasmid (pIB485-like, pF5)	ARGUDIN et al. (2001)
SES <sup>1</sup>	26214	k.A.	ja	Plasmid (pF5)	ONO et al. (2008) ARGUDIN et al. (2010)
SET <sup>1</sup>	22614	k.A.	schwach	Plasmid (pF5)	ONO et al. (2008) ARGUDIN et al. (2010)
SEU <sup>1</sup>	27100	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	LETERTRE et al. (2003) ARGUDIN et al. (2010)
SEU <sup>2</sup> (SEW) <sup>2</sup>	k.A.	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	THOMAS et al. (2006) ARGUDIN et al. (2010)
SEV <sup>2</sup>	k.A.	k.A.	k.A.	genomische Insel (vSA $\beta$ )	ARGUDIN et al. (2010)

<sup>1</sup>Genprodukt bisher nicht in klinischem Material nachgewiesen; Angaben zu MG und iP beziehen sich auf rekombinantes Produkt.

<sup>2</sup>Existenz aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen postuliert; bislang keine Darstellung des Genprodukts.

<sup>3</sup>Emetische Aktivität bei Kaninchen und Mäusen, jedoch (bislang) nicht bei Primaten dargestellt.

Untersuchungen zur Bedeutung der Enterotoxine im Mastitisgeschehen wurden von SCHUBERTH et al. (2001) durchgeführt. Die Autoren verglichen die Prävalenz Enterotoxin-bildender *Staphylococcus aureus*-Isolate bei klinischen und subklinischen Mastitiden und konnten keine relevanten Unterschiede feststellen. Sie leiteten daraus eine geringe Bedeutung der Enterotoxine im Mastitisgeschehen ab. Dagegen konnten MATSUNAGA et al. (1993) bei perakuten *Staphylococcus aureus*-Mastitiden vermehrt SEC-produzierende Staphylokokken feststellen. Die Autoren schrieben diesem Enterotoxin daraufhin eine Bedeutung im Mastitisgeschehen zu.

Unbestritten bleibt jedoch der lebensmittelhygienische Aspekt (HOBBS 1951, BALABAN und RASOOLY 2000, SCHERRER et al. 2004, BECKER et al. 2007). Nach ORDEN et al. (1992) ist Mastitismilch die häufigste Ursache für Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken tierischen Ursprungs. Die Autoren verglichen die Prävalenz Enterotoxin-bildender *Staphylococcus aureus*-Kulturen bei Rind, Schaf und Ziege und konnten die höchste Prävalenz bei ovinen Isolaten feststellen. Die Angaben zur Prävalenz von Enterotoxin-Genen in Milchproben variieren stark. So ermittelten LARSEN et al. (2000) in einer dänischen Studie, dass nur in einem der untersuchten 414 *Staphylococcus aureus*-Isolate ein Enterotoxin-Gen vorhanden war. Die Autoren untersuchten ihre Isolate allerdings nur auf die bis dato bekannten Enterotoxine A–E und H. AKINEDEN et al. (2001) kamen zur Erkenntnis, dass die Gene *seg*, *sei* und *sej* neben *sea* und *sec* am häufigsten in Mastitismilch gefunden werden können. ZSCHÖCK et al. (2005) konnten in einer hessischen Studie in 61 (58,7%) der untersuchten 104 aus Mastitismilch isolierten *Staphylococcus aureus*-Kulturen die Gene von SEG, SEI und SEJ nachweisen. 37 dieser Stämme verfügten gleichzeitig über Gene der klassischen Enterotoxine. In Italien detektierten MORANDI et al. (2007) in 67 % der untersuchten 112 *Staphylococcus aureus*-Isolate aus Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch Enterotoxin-Gene. BECKER et al. (2007) wiesen allerdings darauf hin, dass der Nachweis der Enterotoxin-Gene keinen Aufschluss darüber gibt, ob die Gene exprimiert werden und so Toxine im Lebensmittel vorhanden sind. Nach TRANTER und BREHM (1990) kommen durch Konsummilch hervorgerufene Lebensmittelintoxikationen selten vor. Infolge der technologischen Verarbeitungsprozesse wird die Vermehrung und die damit einhergehende Toxinbildung von *Staphylococcus aureus* in der Regel ausgeschlossen. Rohprodukte hingegen verfügen über ein höheres Risiko, zu Enterotoxin-bedingten Erkrankungen zu führen (JØRGENSEN et al. 2005).

### 2.1.6.2.5 Toxic-shock-syndrome-Toxin

Das Toxic-shock-syndrome-Toxin (TSST-1) fungiert als Superantigen und ist hauptverantwortlich für das „Toxic Shock Syndrome“ (TSS) (LINDSAY et al. 1998, DINGES et al. 2000, PARSONNET et al. 2010). SHANDS et al. (1980) stellten fest, dass dieses in erster Linie bei jungen gesunden Frauen auftritt, die Tampons benutzen. Es handelt sich um eine akute und potentiell tödlich verlaufende Krankheit, die durch das gleichzeitige Auftreten von Hypotension, Fieber, Erythrodermie und einer ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn auftretenden Hautdesquamation gekennzeichnet ist. Um der Definition eines TSS zu genügen, müssen darüber hinaus mindestens drei weitere Organsysteme betroffen sein. Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zur disseminierten intravasalen Gerinnung und zur Ausbildung eines „Acute Respiratory Distress Syndrome“ kommen, die beide lebensbedrohliche Komplikationen darstellen (TODD 1988, DINGES et al. 2000).

Neben der menstruationsassoziierten Form, die immer durch TSST-1 hervorgerufen wird, existiert eine Form des TSS, die außerhalb der Menstruation auftritt und neben TSST-1 auch durch SEB und SEC ausgelöst werden kann. Betroffen sind in diesem Fall v.a. Patienten beiderlei Geschlechts mit Wundinfektionen, fokalen Staphylokokken-Infektionen oder Nasenoperationen.

Das entsprechende Gen *tst-1* befindet sich auf einem mobilen genetischen Element des Bakterienchromosoms, der sog. Pathogenitätsinsel 1 (SaPI1) (LINDSAY et al. 1998, NOVICK. 2003b, RUZIN et al. 2001). Über die Zwischenstufe eines Vorläuferproteins aus 234 Aminosäuren kommt es nach Abspaltung einer Signalsequenz aus 40 Aminosäuren zur Reifung des Proteins, das bei einem Molekulargewicht von 22 000 Da gegenüber Hitze genauso resistent ist wie gegenüber einem Verdau durch Trypsin (DINGES et al. 2000).

Die biologischen Effekte von TSST-1 sind vielfältig. Neben der genannten Wirkung als Superantigen, welches über Bindung an MHC-II-Komplexe zur exzessiven Freisetzung von T-Lymphozyten und damit zu einer Zytokinüberproduktion führt, bindet TSST-1 auch direkt an Endothelzellen und führt auf diese Weise zu deren Untergang. Darüber hinaus erhöht TSST-1 die Sensitivität gegenüber Endotoxinen, was weitere zytotoxische Effekte nach sich zieht (VON BONIN 1995). Dabei führt das alleinige Vorliegen von TSST-1 nicht zwangsweise zu einer Erkrankung. Mehrere Studien bringen eine reduzierte Immunantwort mit dem Auftreten von klinischen Symptomen in Verbindung (BERGDOLL et al. 1981, STOLZ et al. 1985, TODD 1988). So wird vermutet, dass niedrige Steroidhormonspiegel, die beispielsweise während der Menstruation oder in der postpartalen Phase auftreten, zu dieser verminderten Immunantwort führen können.

Laut SUTRA und POUTREL (1994) bilden etwa 20 % der bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolate TSST-1, wobei gewöhnlich eine gleichzeitige Produktion von SEC und SED vorliegt. LARSEN et al. (2002) ermittelten in ihren Untersuchungen eine Produktionsrate von 25 %, wobei bei 109 von 114 Isolaten gleichzeitig das Gen *sec* vorlag. VAN LEEUWEN et al. (2005) stellten bei bovinen Mastitisisolaten eine starke Häufung des Gens *tst-1* fest. Das von bovinen *Staphylococcus aureus*-Stämmen gebildete TSST-1 ist im Gegensatz zu caprinen und ovinen Varianten dem humanen TSST-1 sehr ähnlich (SUTRA und POUTREL 1994). Die Expression von TSST-1 hat nach Untersuchungen von KENNY et al. (1993) einen Einfluss auf das Mastitisgeschehen: Durch die Zytokinüberproduktion führt TSST-1 zu einer verstärkten intramammären Entzündungsreaktion und zur Chronifizierung des Prozesses. Dagegen konnten LARSEN et al. (2002) keinen Einfluss auf das Mastitisgeschehen nachweisen.

### 2.1.6.2.6 Leukozidine

Leukozidine stellen gegen Leukozyten gerichtete Toxine dar (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Die meisten aus bovinen Milchproben stammenden *Staphylococcus aureus*-Isolate produzieren Leukozidin und Kühe mit chronischer Mastitis verfügen über erhebliche Antileukozidin-Antikörpertiter (SUTRA und POUTREL 1994).

Wie das Hämolysin  $\gamma$  bestehen Leukozidine aus zwei synergistisch wirkenden Domänen F und S, deren Konformationsänderungen in der Membran der Zielzellen zur Porenbildung führen. Verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme produzieren unterschiedliche F- und S-Komponenten, die in mehreren Kombinationen auftreten können. LukS, LukS-PV, LukS-R und LukE, aber auch HlgA und HlgC des  $\gamma$ -Toxins sind Beispiele für S-Komponenten. Als F-Domänen fungieren LukF, LukF-PV,

LukF-R, HlgB, LukD und LukM (PRÉVOST et al. 1995, BOWNIK et al. 2004, KANEKO und KAMIO 2004). Die lytische Aktivität der verschiedenen Kombinationen ist unterschiedlich (BARRIO et al. 2006).

Die Kombination von LukS-PV und LukF-PV stellt das Panton-Valentine-Leukozidin dar. Dieses wird als Leukozidin im engeren Sinne angesehen, da es nur leukozid wirkt und keine hämolytische Aktivität aufweist (LOEFFLER et al. 1988). Das Panton-Valentine-Leukozidin wird von 2–3 % aller humanen *Staphylococcus aureus*-Isolate produziert (DINGES et al. 2000, LÖFFLER et al. 2010). Die S-Komponente wird durch das Gen *lukS*-PV, die F-Komponente durch das Gen *lukF*-PV kodiert. Der porenbildende Mechanismus ist mit dem anderer Leukozidine identisch. Die S-Komponente bindet an das Gangliosid G<sub>M1</sub> der Plasmamembran, wodurch die Aktivität der membrangebundenen Phospholipase gesteigert wird. Dies ermöglicht die Bindung der F-Komponente an die Plasmamembran, in deren Folge es durch die Zusammenlagerung jeweils dreier S- und F-Komponenten zur Porenbildung und damit zur Zellyse kommt (NODA et al. 1981, STAALI et al. 1998, BOWNIK et al. 2004). Die lytische Aktivität ist hochspezifisch für humane Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (KANEKO und KAMIO 2004, FERRY et al. 2005). Im Zuge der Lyse dieser Zelltypen kommt es zur Freisetzung chemotaktisch wirkender Faktoren, die eine Vasodilatation und einen vermehrten Einstrom von Leukozyten bedingen. Letztere führen durch die Abgabe degradierender Enzyme und reaktiver O<sub>2</sub>-Verbindungen zur Gewebszerstörung (FERRY et al. 2005).

PVL-produzierende *Staphylococcus aureus*-Stämme sind beteiligt an humanen Furunkulosen, rezidivierenden Abszessen und nekrotisierenden Pneumonien (PRÉVOST et al. 1995, KANEKO und KAMIO 2004, BOYLE-VAVRA und DAUM 2007). Durch Bakteriophagen wird die Übertragung der PVL-Gene zwischen verschiedenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen ermöglicht (KANEKO und KAMIO 2004). Bei Übertragung auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* entstehen PVL-produzierende Bakterienstämme, die gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika resistent sind. Die beim Menschen vorkommenden community-acquired MRSA (caMRSA), die in der Lage sind, auch bei Gesunden außerhalb von Krankenhäusern lebensbedrohliche Infektionen hervorzurufen, treten nahezu immer in Verbindung mit PVL auf (BOYLE-VAVRA und DAUM 2007). Im Gegensatz dazu kann das PVL-Gen bei nutztierassoziierten MRSA - anders als bei MRSA-Stämmen von Pferden und Kleintieren - in der Regel nicht gefunden werden (RANKIN et al. 2005, JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. 2007, LEWIS et al. 2008).

LukM wurde von CHORIT et al. (1995) aus dem bovinen *Staphylococcus aureus*-Stamm P83 isoliert. Seine Sequenz entspricht zu 70 % der von LukS und nur zu 17 % der von LukF. Darüber hinaus kreuzreagiert es mit anti-LukS-Antikörpern, nicht jedoch mit Antikörpern gegen LukF. Dennoch hat es dieselbe physiologische Aktivität wie LukF.

In Kombination mit dem ebenfalls aus P83 isolierten LukF-PV(P83) bildet LukM das Leukozidin mit der höchsten Leukotoxizität gegenüber bovinen neutrophilen Granulozyten (LOEFFLER et al. 1988, KANEKO et al. 1997, RAINARD et al. 2003, BARRIO et al. 2006). Das Vorkommen der zugehörigen Gene ist nahezu ausschließlich auf *Staphylococcus aureus*-Stämme beschränkt, die aus Rindern isoliert wurden (SMELTZER et al. 2009). Weiterhin wurde dieses Leukozidin bei Schaf und Ziege beschrieben (RAINARD et al. 2003). MONECKE et al. (2007a) konnten mittels DNA-Chip-Technologie

bei 53,1% der untersuchten deutschen und schweizerischen *Staphylococcus aureus*-Isolate aus bovinem Material das Gen des Bovinen Leukozidins nachweisen. Die Bedeutung des Bovinen Leukozidins im Mastitisgeschehen wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. SCHUBERTH et al. (2001) verglichen in einer deutschen Studie die Prävalenz Leukotoxin- und Enterotoxinproduzierender *Staphylococcus aureus*-Isolate bei subklinischen und akuten Mastitiden und konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen. Sie folgerten eine untergeordnete Rolle dieser Faktoren bei bovinen Mastitiden. Dagegen mutmaßten RAINARD et al. (2003), dass dem Leukozidin eine große Bedeutung in der Toxizität der Mastitis-verursachenden Staphylokokken-Stämme zukommt. Die Autoren verglichen das leukotoxische Potential verschiedener *Staphylococcus aureus*-Stämme gegenüber aus Wiederkäuern stammenden neutrophilen Granulozyten. Stämme, die über das Gen für LukM verfügten, wiesen eine signifikant höhere Leukotoxizität auf als solche ohne das Gen *lukM*. Weiterhin stellten RAINARD et al. (2003) fest, dass ovine und caprine Isolate den bovinen hinsichtlich ihrer Leukotoxizität überlegen waren. Sie sahen dies als möglichen Grund für die beim kleinen Wiederkäuer häufiger vorkommenden klinischen Mastitiden an. Diese Untersuchungen wurden von HAVERI et al. (2007) aufgegriffen, die die Anwesenheit des Gens *lukM* mit schwerwiegenden klinischen, jedoch nicht persistierenden Mastitiden in Zusammenhang brachten. YOUNIS et al. (2005) beschrieben nach intrazisternaler Injektion von LukF-PV(P83)/LukM eine Erhöhung des somatischen Zellgehalts. Bei *in vitro*-Tests beobachteten sie darüber hinaus eine durch das Leukozidin hervorgerufene starke Proliferation mononukleärer Zellen.

### 2.1.6.2.7 Extrazelluläre Enzyme

*Staphylococcus aureus* produziert eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, die laut SUTRA und POUTREL (1994) ihren Beitrag zur Pathogenese der *Staphylococcus aureus*-Mastitis leisten. Die Autoren ziehen in Erwägung, dass die enzymatische Ausstattung es den Bakterien ermöglicht, die Inhaltsstoffe der Milch als Substrat zu nutzen, so dass eine Vermehrung möglich wird. Letztendlich ist die Bedeutung von Phosphatase, Hyaluronidase, Thermonuklease, Lipase, Staphylokinase, Katalase und Protease im Mastitisgeschehen unklar (BLOBEL und SCHLIESSER 1994).

## 2.2 Mastitiden durch *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Epidemiologie der durch *Staphylococcus aureus* bedingten Mastitiden

Mastitiserreger werden aufgrund ihrer epidemiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften in verschiedene Klassen eingeteilt. Zum einen wird zwischen „major pathogens“ and „minor pathogens“, zum anderen zwischen „kontagiösen“ und „umweltassoziierten“ Erregern unterschieden.

Entsprechend seiner Pathogenität und der Reaktion des infizierten Organismus auf den Erreger wird *Staphylococcus aureus* zu den sog. „major pathogens“ gezählt (GREENE et al. 1991, HARMON 1994, WILSON et al. 1997). Im Gegensatz dazu werden Koagulase-negative Staphylokokken und *Corynebacterium bovis* als „minor pathogens“ angesehen (PANKEY et al. 1985, HOGAN et al. 1988). In betroffenen Herden sind „major pathogens“ häufig hochprävalent (WILSON et al. 1997). Entsprechende Mastitiden gehen mit deutlicheren Erhöhungen der Zellzahl und stärkeren Veränderungen der Milchezusammensetzung einher als die durch „minor pathogens“ verursachten. Darüber hinaus sind sie mit höheren finanziellen Verlusten verbunden (HARMON 1994, WILSON et al. 1997). Die Ausheilungsrate klinischer Mastitiden, die durch „major pathogens“ verursacht werden, war in einer von GREENE et al. (1991) durchgeführten Untersuchung deutlich geringer als bei Mastitiden durch „minor pathogens“. Neuere Untersuchungen lassen jedoch darauf schließen, dass auch als „minor pathogens“ angesehene Erreger zu irreversiblen Veränderungen des Zitzengewebes führen können (KRÖMKER 2010).

Eine weitere Einteilung der Mastitiserreger erfolgt anhand der Herkunft und Übertragung der Erreger. Dabei wird zwischen kontagiösen (kuh-/euterassoziierten) und umweltassoziierten Erregern unterschieden (SMITH und HOGAN 1993, BRADLEY 2002).

Kontagiöse Mastitiserreger sind gut an die Milchdrüse adaptiert. Das Haupterregerreservoir ist dementsprechend das infizierte Euter und die Übertragung erfolgt in erster Linie während des Melkens von Tier zu Tier bzw. von Zitze zu Zitze (HARMON 1994, BRADLEY 2002). Ein Überleben der kontagiösen Erreger ist auf Dauer nur in der Milchdrüse möglich (WINTER und ZEHLE 2009a). Entsprechende Mastitiden sind meist subklinisch mit periodisch auftretenden klinischen Episoden, wobei die subklinische Infektion durch eine Erhöhung der Zellzahl deutlich wird. In der Regel verläuft die Infektion chronisch (GREENE et al. 1991, HARMON 1994). Zum Teil persistieren kontagiöse Erreger lebenslang (BANNERMAN et al. 2004).

Umweltassoziierte Mastitiserreger kommen in der Umgebung der Tiere vor. Reservoir sind organische Einstreumaterialien, mit Mist bedeckte Triebwege und nasse oder feuchte Bereiche im Stall (SMITH und HOGAN 1993). Das krankmachende Potential dieser Erreger ist gering, jedoch kann es bei reduzierter Infektabwehr zu einem Eindringen ins Gewebe und einer daraus resultierenden Mastitis kommen (WINTER und ZEHLE 2009a)

Die diesbezügliche Zuordnung von *Staphylococcus aureus* ist nicht ganz eindeutig. Meist wird er zu den kontagiösen Mastitiserregern gerechnet (FOX und GAY 1993, HARMON 1994). Dabei ist er bei weitem nicht so stark an das Eutergewebe adaptiert wie z.B. *Streptococcus agalactiae*, der ebenfalls zu den kontagiösen Erregern gezählt wird (SEFFNER und BERGMANN 1994). Untersuchungen von

SOMMERHÄUSER (2001) zeigten, dass in Rohmilch verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme nachgewiesen werden können, die über ein unterschiedliches epidemiologisches Verhalten verfügen. Die Autoren untersuchten *Staphylococcus aureus*-Isolate von sechs Herden geno- und phänotypisch. Einige Stämme verbreiteten sich während des Melkens schnell von Viertel zu Viertel. Nach dem Klassifizierungsschema nach MEYER (1967) und WITTE et al. (1977) gehörten diese Stämme zur Variante *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich dabei um Stämme handelte, deren Vorkommen überwiegend auf das Rind beschränkt ist, wurden diese Stämme von SOMMERHÄUSER (2001) als euterassoziiert betrachtet. Andere *Staphylococcus aureus*-Stämme hingegen zeigten kaum Verbreitungstendenz und wiesen damit eher Ähnlichkeiten mit umweltassoziierten Erregern auf. Diese Stämme konnten durch eine Optimierung der Melkhygiene nicht aus den Beständen eliminiert werden.

Diese Beobachtungen zur Existenz umweltassoziiertes *Staphylococcus aureus*-Stämme wurden durch Untersuchungen von SMITH et al. (2005b) bestätigt. Die Autoren verglichen *Staphylococcus aureus*-Genotypen aus der Milch und aus der Umgebung der Kühe. Sie griffen dabei Untersuchungen von MATOS et al. (1991), ROBERSON et al. (1998) und ZADOKS et al. (2000) auf, in denen *Staphylococcus aureus*-Reservoirs in der Umgebung der Tiere nachgewiesen wurden. In einer Herde konnten SMITH et al. (2005b) einen *Staphylococcus aureus*-Stamm in der Einstreu der Tiere identifizieren, der im selben Bestand als Mastitiserreger fungiert. Sie werteten dies als Beweis umweltassoziiertes *Staphylococcus aureus*-Mastitiden. Nach Ansicht der Autoren muss diese Form der Übertragung gerade in gut geführten Betrieben in Betracht gezogen werden, in denen effizientes Hygienemanagement eine Übertragung während der Melkzeiten unwahrscheinlich macht.

### 2.2.2 Invasion und Infektion bei boviner Mastitis

Der Großteil der Mastitiden beginnt mit einer galaktogenen Infektion. Die Erreger passieren dabei den Strichkanal und gelangen über den Zitzenkanal, die Zisterne und die Milchräume bis in die Alveolarhöhlräume (SEFFNER und SCHULZ 1994). Die galaktogene Infektion durch *Staphylococcus aureus* wird dadurch begünstigt, dass dieser Erreger zur aktiven Passage des Zitzenkanals fähig ist (HOEDEMAKER et al. 2001).

Die Erregerübertragung erfolgt in erster Linie während des Melkvorgangs (HARMON 1994, BRADLEY 2002). Dabei stellt alles, was mit einem infizierten Euter bzw. Euterviertel in Kontakt kommt und anschließend ein anderes Euter bzw. Euterviertel berührt, eine potentielle Ansteckungsquelle dar (PHILPOT 1979). Durch die Hände des Melkpersonals, das Melkzeug oder den Euterlappen gelangt *Staphylococcus aureus* auf die Zitzenhaut und in den Bereich der äußeren Strichkanalöffnung (TSCHISCHKALE 2002). Der Erreger ist dabei häufig im Bereich kleiner Verletzungen an der Zitzenkuppe nachzuweisen (SEFFNER und BERGMANN 1994), auf gesunder Zitzenhaut kommt er laut PHILPOT (1979) nicht vor. Das Eindringen des Erregers in die Zitze wird durch Kapillarkräfte ermöglicht. Darüber hinaus können die beim maschinellen Milchentzug erzeugten zyklischen Druckschwankungen den Erreger von der Zitzenhaut ins Zitzeninnere befördern (TSCHISCHKALE 2002). Dieser Vorgang wird durch Lufteinstrom, wie er z.B. beim Abfall eines Zitzenbechers auftritt, erheblich verstärkt. Die mit Milchpartikeln durchsetzte Luft strömt dabei in die

drei verbleibenden, noch unter Vakuumeinwirkung stehenden Zitzenbecher und trifft dort auf die Zitzenöffnung. Des Weiteren gelangt die einströmende Luft über den kurzen Milchslauch, das Sammelstück und die langen Milchschräuche zur Melkleitung. In dieser sinkt das Vakuum ab, wodurch bei einem benachbarten, noch unter vollem Melkvakuum stehenden Melkzeug die evtl. kontaminierte Milch aus dem Leitungssystem zurück zu den Zitzen strömt (WEHOWSKY und TRÖGER 1994). Keime können durch diesen Effekt, der auch als „Impact“ bezeichnet wird, weit in den Zitzenkanal vordringen (SUTRA und POUTREL 1994, KRÖMKER 2007a).

Die Tatsache, dass *Staphylococcus aureus* auch aus den Eutern von nulliparen Färsen isoliert werden konnte, führte zur Identifizierung weiterer Übertragungsquellen außerhalb des Melkprozesses (MATOS et al. 1991, GILLESPIE et al. 1999). So berichteten OWENS et al. (1998) von der Bedeutung der Kleinen Weidestechfliege (*Haematobia irritans*) im Mastitisgeschehen. Nach Exposition zweier nicht-infizierter Färsen mit infizierten Fliegen konnten die Autoren eine intramammäre *Staphylococcus aureus*-Infektion nachweisen. Diese Ergebnisse wurden von GILLESPIE et al. (1999) bekräftigt, die eine hohe Übereinstimmung der DNA von aus Fliegen und aus Färseneutern isolierten Staphylokokken ermittelten.

Das Risiko einer Übertragung von kontagiösen Mastitiserregern durch die Verfütterung kontaminierter Milch wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte SCHALM (1942) eine höhere Inzidenz von durch *Streptococcus agalactiae* hervorgerufenen Mastitiden in Betrieben feststellen, die die Milch infizierter Kühe vertränkten. Durch das Haften und Sistieren dieses Erregers in den Tonsillen und das gegenseitige Ansaugen der Jungtiere konnte es nach Ansicht des Autors zu einer Verbreitung in der Herde kommen. Auch BRENTRUP (1998), KEIL et al. (2000), KEIL und LANGHANS (2001) und KRÖMKER (2007a) führen das gegenseitige Besaugen der Jungtiere in der Aufzuchtphase als Übertragungsmöglichkeit für kontagiöse Mastitiserreger auf.

BARTO et al. (1982) griffen die Untersuchung von SCHALM (1942) auf und wendeten die Fragestellung auf *Staphylococcus aureus* an. Die Verfütterung *Staphylococcus aureus*-kontaminierter Milch führte dabei weder zu einer Erhöhung der Keimzahl im Fleisch der Tiere, noch zu einer erhöhten Inzidenz von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden zum Zeitpunkt der ersten Kalbung. An Schlachtkörpern durchgeführte Untersuchungen von BRAMMER (1981) sprechen gegen eine bedeutende Rolle der Tonsillen in der Pathogenese der Färsenmastitis. Auch Studien von ROBERSON et al. (1994) an verschiedenen Körperstellen sprechen gegen eine *Staphylococcus aureus*-Besiedlung, die über einen Zeitraum von der Tränkeperiode bis zur Abkalbung persistiert.

Als weitere Übertragungsmöglichkeiten identifizierten ROBERSON et al. (1998) den gegenseitigen Körperkontakt der Tiere sowie den Kontakt zu einer infizierten Umgebung.

### 2.2.3 Pathogenese der bovinen Mastitis durch *Staphylococcus aureus*

Grundsätzlich hat die Infektion eines Euterviertels durch *Staphylococcus aureus* keinen Einfluss auf die verbleibenden Drüsenkomplexe (SUTRA und POUTREL 1994). Für den Erreger ist es von entscheidender Bedeutung, nach Eindringen ins Gangsystem mit Zellen der bovinen Milchdrüse zu

interagieren (LAMMERS et al. 1999a). So ist er in der Lage, unter Vermittlung von Fibronectin-bindendem Protein an Epithelzellen zu adhären, in sie einzudringen, sich in ihnen zu vermehren und zu persistieren. Auf diese Weise gelingt es *Staphylococcus aureus*, unter Umgehung der Wirtsabwehr weiter ins Gewebe vorzudringen (FROST 1975, ALMEIDA et al. 1996, LAMMERS et al. 1999b, ATALLA et al. 2010). Durch die Polysaccharidkapsel und die Produktion von Protein A wird die Phagozytose des Erregers beeinträchtigt (SUTRA und POUTREL 1994). Laut CUCARELLA et al. (2003) führt darüber hinaus die Ausbildung von Biofilmen zur Unangreifbarkeit des Erregers gegenüber Makrophagen. Wie in Punkt 2.1.3 aufgeführt, wird die Bedeutung anderer Pathogenitätsfaktoren im Mastitisgeschehen kontrovers diskutiert.

*Staphylococcus aureus* ist weiterhin in der Lage, nach Phagozytose durch Leukozyten in diesen Zellen zu überleben, wodurch er gegenüber einer antibiotischen Behandlung unangreifbar wird (CRAVEN und ANDERSON 1984, HÉBERT et al. 2000). Infolge der Abkapselung staphylokokkenhaltiger neutrophiler Granulozyten entstehen Abszesse, die das Gangsystem der Milchdrüse verlegen und den Milchabfluss blockieren. Die betroffenen Regionen können nicht mehr zur Milchproduktion beitragen (ANDERSON 1982).

### 2.2.4 Klinik und Verlauf der *Staphylococcus aureus*-Mastitiden

In Abhängigkeit von der Pathogenität des Staphylokokken-Stammes, seiner Anreicherung im Gewebe und prädisponierenden Faktoren können sich nach der Infektion verschiedene Krankheitsbilder manifestieren, die von einer latenten Infektion bis hin zu einer perakuten, gangränösen Mastitis reichen (SEFFNER und BERGMANN 1994). Letztere kommt in erster Linie bei Färsen vor (WAAGE et al. 2001).

In der Regel führt *Staphylococcus aureus* zu einer subklinischen Mastitis mit chronischem Verlauf (SUTRA und POUTREL 1994, LEITNER et al. 2000). Bei betroffenen Tieren kann neben einer Erhöhung der Zellzahl und der Leitfähigkeit der Milch eine Reduktion der Milchmenge und -qualität festgestellt werden (SEFFNER und BERGMANN 1994). Allerdings kann auch bei Tieren mit Zellzahlen unter 100 000 Zellen/ml Milch *Staphylococcus aureus* isoliert werden (JONES et al. 1984).

Besonders postpartal kann es zu akuten Episoden der Infektion kommen, die durch Umfangsvermehrung und Schmerzempfindlichkeit der betroffenen Euterviertel, einen veränderten Sekretcharakter sowie eine stark reduzierte Milchmenge gekennzeichnet sind. Das Allgemeinbefinden ist bei erhöhter Körpertemperatur mäßig reduziert (SEFFNER und BERGMANN 1994).

Sowohl bei der chronischen als auch bei der akuten Form der *Staphylococcus aureus*-Mastitis geht funktionelles Drüsengewebe zugrunde und wird durch Bindegewebe ersetzt (RADOSTITIS et al. 2000). Den dadurch bedingten Milchmengenverlust bezifferten SUTRA und POUTREL (1994) bei chronischen *Staphylococcus aureus*-Mastitiden auf 10–25 %; SEFFNER und BERGMANN (1994) berichteten von einem Milchverlust von 35 %.

Perakute *Staphylococcus aureus*-Mastitiden treten in der Regel wenige Tage nach der Kalbung auf und gehen mit schwerwiegenden systemischen Symptomen einher. Die Körpertemperatur betroffener Tiere steigt auf bis zu 42 °C, das Allgemeinbefinden ist stark reduziert, die Nahrungsaufnahme und die Pansentätigkeit sistieren. Darüber hinaus können Tachykardie

(100-120/min) und Muskelschwäche auftreten. Das betroffene Viertel ist hart und geschwollen. Als Folge der Berührungsempfindlichkeit können hochgradige Lahmheiten der anliegenden Gliedmaße auftreten (MATSUNAGA et al. 1993, RADOSTITIS et al. 2000). Bedingt durch eine ischämische Nekrose werden die distalen Euterteile einschließlich der Zitzen im weiteren Verlauf kalt und zyanotisch. Ursächlich beteiligt sind hierbei Toxine mit gefäßverengender Wirkung wie das Alpha- und Betatoxin, TSST-1 sowie SEC (MATSUNAGA et al. 1993, TOLLERSRUD et al. 2000). Das Geschehen endet ohne Therapie meist tödlich (SEFFNER und BERGMANN 1994).

#### 2.2.5 Diagnose der *Staphylococcus aureus*-Mastitiden

Im Sinne einer prognostischen Krankheitsbewertung und einer zielgerichteten Behandlung ist die ätiologische Mastitisiagnose anzustreben. Aus diesem Grund ist bei Tieren mit klinischer Mastitis eine Untersuchung des Sekrets durchzuführen (WENDT et al. 1998). Subklinisch infizierte *Staphylococcus aureus*-Tiere sind im Rahmen von Kontrolluntersuchungen nach dem Abkalben oder vor dem Trockenstellen bzw. in Bestandsuntersuchungen zu erfassen (SCHULZ 1994).

Die kulturelle bakteriologische Milchuntersuchung stellt den Goldstandard der Mastitisiagnostik dar (RIFFON et al. 2001, GODDEN et al. 2002, PYÖRÄLÄ 2003). Hierbei wird die zu untersuchende Milch auf ein zumeist bluthaltiges Nährmedium aufgebracht, inkubiert und im Falle eines Erregerwachstums eine Differenzierung dieser Keime durchgeführt (WENDT et al. 1998). Die Aussagekraft einer kulturellen Anzuchtung der Mastitiserreger wird entscheidend von der Qualität der Probenahme beeinflusst (HAMANN 2003). Weiterhin sind der Zeitpunkt der Probenahme, die Lagerung und die Bearbeitung der Milchproben von Bedeutung (GODDEN et al. 2002). Nachteile einer kulturellen bakteriologischen Untersuchung sind die Zeit- und Arbeitsintensivität des Verfahrens (RIFFON et al. 2001). Des Weiteren können gerade in Bezug auf *Staphylococcus aureus* nicht alle positiven Tiere sicher erfasst werden, da aufgrund der intermittierenden Ausscheidung dieses Erregers die Anzahl der Keime zeitweise zu gering für einen kulturellen Nachweis ist (GODDEN et al. 2002, GRABER et al. 2007). Um eine hohe Sensitivität zu erzielen, ist daher die kostenintensive wiederholte Untersuchung von Viertelgemelken nötig (GRABER et al. 2007). So gaben SEARS et al. (1990) für die kulturelle bakterielle Untersuchung einer einmaligen Viertelgemelksprobe eine Sensitivität von 74,5 % an, während für eine zweimalige Untersuchung eine Sensitivität von 94 % und für eine dreimalige Untersuchung eine Sensitivität von 98 % ermittelt wurde. Dagegen gehen Gesamtgemelksproben, die das Sekret aller Euterviertel enthalten, mit einem wesentlich höheren Anteil falsch-negativer Ergebnisse einher. LAM et al. (1996) ermittelten beim Vergleich der Nachweisrate von *Staphylococcus aureus* in Viertel- und Gesamtgemelksproben für Gesamtgemelke nur eine relative Sensitivität von 63 %. In einer Studie von GODDEN et al. (2002) waren Viertelanfangsgemelke, die nach dem Abmelken der ersten Milchstrahlen gewonnen wurden, den nach dem eigentlichen Melkvorgang entnommenen Viertelendgemelken in Bezug auf einen *Staphylococcus aureus*-Nachweis signifikant überlegen. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Einfrieren der zu untersuchenden Milchprobe die Nachweisrate von *Staphylococcus aureus* erhöht. Darüber hinaus kann der Einsatz größerer Inokulamengen zu einer Sensitivitätssteigerung führen (LAM et al. 1996).

Im Falle eines Wachstums von grampositiven, Katalase-positiven Staphylokokken stellt die Unterscheidung zwischen *Staphylococcus aureus* und anderen Staphylokokken den wichtigsten klinischen Aspekt dar (BOERLIN et al. 2003). In Kombination mit morphologischen Kriterien (Hämolyseverhalten, Pigmentierung) ist hierbei vor allem der Nachweis der Koagulase von Bedeutung, die allerdings keine Unterscheidung zwischen *Staphylococcus aureus* und anderen Koagulase-positiven Staphylokokken zulässt (LAM et al. 1995, DVG 2009). Darüber hinaus wurden in verschiedenen Studien weitere Methoden wie die Prüfung kulturell-biochemischer Eigenschaften (Anwesenheit des Clumping-Faktors, Vorhandensein des Protein A, Mannitfermentation unter anaeroben Bedingungen, Acetoin-Produktion, Aurease-Aktivität) und die Verwendung von Selektivnährmedien (modifizierter Baird-Parker-Agar, mit Acriflavin supplementierter P-Agar) zur Abgrenzung von *Staphylococcus aureus* gegenüber anderen Staphylokokken als geeignet erachtet (ESSERS und RADEBOLD 1980, ROBERSON et al. 1992, OLLIS et al. 1995, CAPURRO et al. 1999, BOERLIN et al. 2003).

Mit dem Ziel, den *Staphylococcus aureus*-Nachweis zu beschleunigen, wurden in den letzten Jahren sog. Petrifilm-Systeme entwickelt. Diese gebrauchsfertigen Nährmediensysteme arbeiten mit relativ großen Inokulamengen, können direkt im Betrieb verwendet werden und lassen *Staphylococcus aureus*-Kolonien nach einer Bebrütungszeit von 24 h als violettrote Kolonien erkennen (SILVA et al. 2005, KRÖMKER et al. 2007). Die Sensitivität des Petrifilms bei der Beurteilung von Herdensammelmilch wurde von KRÖMKER et al. (2007) mit 94 % beurteilt, so dass die Autoren das System für diese Indikation als empfehlenswert beurteilten. Allerdings ermöglicht dieses Verfahren lediglich den gezielten *Staphylococcus aureus*-Nachweis ohne das Vorhandensein anderer Mastitiserreger zu überprüfen (SILVA et al. 2005). Darüber hinaus erfordert die Beurteilung eine hinreichende Ausbildung der durchführenden Personen (GODDEN et al. 2007) und im Gegensatz zur bakteriellen kulturellen Untersuchung können Kontaminationen bei diesem Verfahren nicht erkannt werden (McCARRON et al. 2009).

Neben den genannten Verfahren besteht die Möglichkeit, *Staphylococcus aureus* mittels PCR-Technik nachzuweisen (RIFFON et al. 2001, GRABER et al. 2007, SPITTEL et al. 2011). Im Gegensatz zur bakteriellen kulturellen Untersuchung können mit diesem Verfahren auch abgestorbene und nicht vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden (SPOHR 2011). Die Sensitivität des Verfahrens ist höher als bei anderen Methoden des Erregernachweises und im Gegensatz zum Petrifilm kann gleichzeitig auf das Vorhandensein mehrerer Erreger getestet werden (PHUEKTES et al. 2001, GRABER et al. 2007, KOSKINEN et al. 2009). Die Untersuchungszeit ist mit 3–4 h deutlich kürzer als bei anderen Verfahren, jedoch ist fraglich, ob dies unter Praxisbedingungen von Vorteil ist. Akut kranke Tiere sind in jedem Fall sofort zu versorgen und das Therapieregime ist nach Erhalt des Befundes lediglich anzupassen. Nachteilig auf einen praktischen Einsatz wirken sich der hohe Preis, die Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen und die Tatsache aus, dass die Erstellung eines Antibiotogramms aufgrund der fehlenden Anzüchtung des Erregers nicht möglich ist (SPITTEL et al. 2011, SPOHR 2011).

Gemeinsam ist den dargestellte Methoden, dass sie lediglich den Nachweis von *Staphylococcus aureus* anstreben, ohne einen Rückschluss auf die Pathogenität der vorliegenden Staphylokokken-Isolate zuzulassen.

### 2.2.6 Therapie der *Staphylococcus aureus*-Mastitiden

Bei der Therapie kommen in erster Linie Antibiotika zum Einsatz, wobei mehrere Autoren eine Verlängerung des Standardtherapie-Protokolls empfehlen. Die fünf- bis acht tägige Anwendung von Pirlimycin (GILLESPIE et al. 2002, DELUYKER et al. 2005) und Penicillin bzw. Penethamat (ZIV und STORPER 1985) bei subklinischen Mastitiden führte im Vergleich zur zweitägigen Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der Heilungsrate. Laut WINTER und ZEHLE (2009b) bedarf es einer Behandlungsdauer von acht bis zehn Tagen, um auch intrazellulär überlebende Erreger abzutöten. OWENS et al. (1988) verglichen den Behandlungserfolg einer alleinigen intramammären Amoxicillin-Behandlung mit einer Kombination aus systemisch verabreichtem Penicillin G und intramammär verabreichtem Amoxicillin. Die Kombination der Applikationsformen brachte mit 51 % eine doppelt so große Heilungsrate wie die alleinige intramammäre Behandlung. TAPONEN et al. (2003) verglichen die Kombination aus intramammärer (Penicillin G/Neomycin) und systemischer Behandlung (Procain/Penicillin G) mit der alleinigen systemischen Anwendung von Penicillin. Auch in dieser Studie führte die Kombinationstherapie zum größeren Behandlungserfolg. BARKEMA et al. (2006) führten die bessere Wirksamkeit der Kombinationstherapie auf die Eigenschaften des Erregers zurück, tief ins Euterparenchym vorzudringen. Die alleinige intramammäre Antibiotika-Applikation führt in der Tiefe des Gewebes nicht zu ausreichend hohen Konzentrationsspiegeln (WINTER und ZEHLE 2009b).

Ein weiterer Therapieansatz liegt in der intramammären Applikation von Interleukinen (DALEY et al. 1991). Diese Immunmodulatoren steigern laut ERSKINE et al. (1998) die wirtseigene Abwehr und können unterstützend zu einer Antibiotika-Therapie angewandt werden. In der von den Autoren durchgeführten Untersuchung führte die Kombination aus Cefapirin und Interleukin-2 bei 53,6 % der Viertel zur bakteriologischen Heilung und war damit der alleinigen antibiotischen Behandlung mit einer Heilungsrate von 33,3 % überlegen.

In Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt wird zwischen der Laktations- und der Trockenstelltherapie unterschieden (NICKERSON et al. 1995). Aufgrund der mit einer Antibiotikatherapie verbundenen Wartezeiten und des geringen Heilungserfolgs wird die Therapie subklinischer Mastitiden während der Laktation nur selten durchgeführt (PYÖRÄLÄ 2009). Eine Ausnahme stellen hier Gegenmaßnahmen zu einer Überschreitung der Tankmilchzellzahl dar (SOL et al. 1997). Die Laktationstherapie infizierter Erstkalbinnen führt zu einer Verringerung der Gewebeschädigung und erreicht häufiger als bei älteren Tieren die vollständige Elimination des Erregers (SOL et al. 1997).

Die in der Literatur angegebenen Heilungsraten variieren zwischen 4 und 92 % (ERSKINE et al. 1994, SUTRA und POUTREL 1994, SOL et al. 1997, NICKERSON et al. 1999, DINGWELL et al. 2003). BARKEMA et al. (2006) machten die Heilungsrate abhängig von dem betroffenen Tier, dem Pathogen und der durchgeführten Behandlung. Mit zunehmendem Alter der Kuh, Erhöhung der Zellzahl,

zunehmender Dauer der Infektion und Ausweitung der Infektion auf die anderen Viertel kam es zur Abnahme des Therapieerfolgs (SOL et al. 1997, BARKEMA et al. 2006).

### 2.2.7 Prophylaxe der *Staphylococcus aureus*-Mastitiden

Die Basis für ein Vorgehen gegen kontagiöse Mastitiserreger wurde durch NEAVE et al. (1969) formuliert. Die darin aufgeführten Bekämpfungsstrategien wurden als Fünf-Punkte-Programm bekannt. Dieses umfasst Hygienemaßnahmen während des Melkens und in der Zwischenmelkzeit, die Therapie klinischer Mastitiden, eine antibiotische Versorgung zum Trockenstellen, die Kontrolle der Melkanlage und einen fachgerechten maschinellen Milchentzug.

Maßgebend für die Senkung der Neuinfektionsrate und damit den Erfolg eines *Staphylococcus aureus*-Bekämpfungsprogramms ist die rasche Identifizierung infizierter Tiere (ZADOKS et al. 2002). In Abhängigkeit von der Therapiewürdigkeit des Einzeltiers und den räumlichen, personellen und finanziellen Gegebenheiten des Betriebs werden diese Tiere behandelt, von nicht-infizierten Tieren abgesondert oder gemerzt.

Für die Sanierung eines Bestandes ist neben der Identifizierung und Therapie infizierter Einzeltiere die Prävention von Neuinfektionen von entscheidender Bedeutung (NEAVE et al. 1969, JONES und OHNSTAD 2002). Essentiell sind neben der gründlichen Reinigung des Euters (SCHREINER und RUEGG 2003) unter anderem das Zitzendippen (EBERHART et al. 1983), die Melkzeugzwischeninfektion (KRÖMKER 2007b) und die Beachtung der Melkreihenfolge bzw. die Bildung von *Staphylococcus aureus*-positiven und -negativen Gruppen (JONES und OHNSTAD 2002). Bedingt durch ihre variierende Kontagiosität reagieren verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme unterschiedlich auf diese Maßnahmen zur Verbesserung der Melkhygiene. Im Gegensatz zu *Staphylococcus aureus*-Stämmen, die sich kontagiös verhalten, lassen sich Stämme mit den Charakteristika umweltassoziierter Keime durch ein solches Sanierungsprogramm nicht eliminieren (MIDDLETON et al. 2001, SOMMERHÄUSER 2001, SOMMERHÄUSER et al. 2003). In Anbetracht der Heterogenität der *Staphylococcus aureus*-Stämme fordern mehrere Autoren Untersuchungen zu stammspezifischen Therapiemaßnahmen. Bereits 1995 stellten KAPUR et al. (1995) die Wichtigkeit von Studien zum Verhalten der verschiedenen bovinen *Staphylococcus aureus*-Stämme heraus. BARKEMA et al. (2006) betonten, dass Untersuchungen mit Referenzstämmen wie Newbould 305 nicht repräsentativ für natürliche Staphylokokkeninfektionen sind und Ergebnisse so nicht auf andere bovine Stämme übertragen werden können.

Nach Ansicht einiger Autoren kann das Sanierungsprogramm durch den Einsatz von Vakzinen unterstützt werden (LEITNER et al. 2003, PELLEGRINO et al. 2008). Andere Autoren konnten dagegen keinen positiven Effekt einer Impfung feststellen (HOEDEMAKER et al. 2001, TENHAGEN et al. 2001, MIDDLETON et al. 2009, JOKIEL 2009). Allerdings war das Spektrum der in den Untersuchungen verwendeten Vakzine und Versuchsbedingungen so vielfältig, dass sie kaum miteinander verglichen werden können. WOLTER et al. (2010) machten jedoch darauf aufmerksam, dass eine Impfung nicht vor Neuinfektionen schützen kann, da eine zu Beginn der Infektion intakte Blut-Euter-Schranke einen starken Anstieg der Antikörperkonzentration im Euter verhindert.

Laut ZECCONI (2006) ist ein konsequent durchgeführtes Bekämpfungsprogramm in der Lage, *Staphylococcus aureus*-Mastitiden aus einem Bestand zu eliminieren. Die vollständige Erregerfreiheit des Bestandes kann jedoch wegen der Fähigkeit des Erregers, außerhalb der Milchdrüse zu überleben, nicht erreicht werden. KRÖMKER (2009) beurteilte eine Rate von unter 5 % *Staphylococcus aureus*-infizierter Tiere in einem Bestand als akzeptabel.

#### 2.2.8 Untersuchungen zur Häufigkeit und Prävalenz von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden

In verschiedenen in Europa und den USA durchgeführten Untersuchungen wurde *Staphylococcus aureus* als häufigstes „major pathogen“ identifiziert (SOBIRAJ et al. 1997, WAAGE et al. 1999, MAKOVEC und RUEGG 2003, PITKÄLÄ et al. 2004, TENHAGEN et al. 2006, FERGUSON et al. 2007, PIEPERS et al. 2007). Das Untersuchungsgut und damit die Nachweishäufigkeit von *Staphylococcus aureus* variierten in den unterschiedlichen Studien zum Teil erheblich.

Mit den vorliegenden Gesamtbestandsuntersuchungen zur *Staphylococcus aureus*-Prävalenz in Thüringer Milchviehbeständen direkt vergleichbar ist dabei lediglich eine finnische Studie von PITKÄLÄ et al. (2004), in der Viertelgemelksproben aller laktierenden Kühe von 216 Milchviehbeständen untersucht wurden. *Staphylococcus aureus* konnte dabei in 3,4 % der untersuchten 12 661 Proben nachgewiesen werden.

Einen ähnlichen Versuchsaufbau hatte eine in Brandenburg durchgeführte Untersuchung von TENHAGEN et al. (2006), in der in 80 Herden jeweils 32 Tiere stichprobenartig auf Mastitiserreger untersucht wurden. *Staphylococcus aureus* wurde in 5,7 % der 2560 Viertelgemelke gefunden.

Untersuchungen anderer Autoren sind in Tab. 3 dargestellt. Allerdings wurden bei diesen Studien immer nur einzelne Tiere eines Bestandes beprobt.

**Tab. 3:** Studiendesign und Ergebnisse von Untersuchungen zur Nachweishäufigkeit von *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen

Autoren	Land	Klinik	Probenart	Proben	Nachweishäufigkeit
				n	<i>Staphylococcus aureus</i> %
SOBIRAJ et al. (1997)	D	subklinisch	Viertelgemelk	1644	26,7
WAAGE et al. (1999)	N	klinisch	Viertelgemelk	1349	44,3
MAKOVEC und RUEGG (2003)	USA	subklinisch und klinisch	k.A.	77 172	5,7
FERGUSON et al. (2007)	I	subklinisch und klinisch	Viertel- und Gesamtgemelk	18 711	12,5

D = Deutschland; N = Norwegen; I = Italien

Untersuchungen in Regionen, in denen die Häufigkeit von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden über mehrere Jahre hinweg erfasst wurde, lassen auf eine in den letzten Jahren sinkende Nachweishäufigkeit dieses Erregers bei bovinen Euterentzündungen schließen (MYLLYS et al. 1998,

MAKOVEC und RUEGG 2003, PITKÄLÄ et al. 2004, SAMPIMON et al. 2009). Als Grund hierfür ziehen MAKOVEC und RUEGG (2003) eine bessere Wirtschaftlichkeit und damit eine bessere Wettbewerbsfähigkeit von Herden mit niedriger *Staphylococcus aureus*-Prävalenz in Erwägung, die sich förderlich auf die Implementierung von Kontrollprogrammen auswirkt.

Laktationsabhängige Prävalenzunterschiede wurden von TENHAGEN et al. (2006) beschrieben. Die Autoren stellten bei Tieren in späteren Laktationsabschnitten höhere *Staphylococcus aureus*-Prävalenzen fest als bei Tieren in frühen Abschnitten der Laktation. Sie führten dies auf eine weitverbreitete Trockenstelltherapie zurück, die zur Reduktion der Erregerprävalenz führte.

### 2.2.9 Bedeutung von Resistenzen gegenüber Antibiotika

Bereits wenige Jahre nach Einführung des Penicillins traten Penicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme auf (LYON und SKURRAY 1987). Der Anteil dieser Stämme ist regional unterschiedlich und variiert zwischen 20–30 % in den skandinavischen Ländern und 85 % in Irland (BARKEMA et al. 2006). Der Penicillin-Resistenz können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen (LYON und SKURRAY 1987), wobei die Produktion von  $\beta$ -Laktamase die häufigste Ursache darstellt (LIVERMORE 1995). Diese Enzymgruppe, die den  $\beta$ -Laktamring der Antibiotika hydrolysiert, ist bei der Mehrheit der Staphylokokken auf einem Plasmid lokalisiert, kann jedoch auch chromosomal kodiert werden (LYON und SKURRAY 1987). Bis zum Jahr 2001 waren bereits 340 verschiedene  $\beta$ -Laktamasen bekannt, die sich unter anderem in ihrer Lokalisation, ihrem hydrolytischen Spektrum und der Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren unterschieden (BUSH 2001).

Das Verhalten gegenüber Penicillin wurde von mehreren Autoren als relevant für den Heilungserfolg beschrieben. SOL et al. (2000), BARKEMA et al. (2006) und HAVERI (2008) verglichen die Heilungsrate von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden, die durch Penicillin-sensible und Penicillin-resistente Stämme verursacht wurden. Selbst unter Verwendung von Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika kam es bei durch Penicillin-sensible Stämme verursachten Mastitiden häufiger zur Ausheilung als bei Mastitiden durch Penicillin-resistente Stämme. Der Mechanismus, der diesem Zusammenhang zugrunde liegt, ist bislang unbekannt (KAPUR et al. 1995, BARKEMA et al. 2006). BARKEMA et al. (2006) vermuteten, dass die Pathogenitätsinsel, auf der das  $\beta$ -Laktamase-Gen *blaZ* lokalisiert sein kann, für weitere Mastitis-relevante Faktoren kodiert.

Mit Methicillin und Oxacillin entstanden in den 1960er Jahren halbsynthetische,  $\beta$ -Laktamase-feste Penicillinderivate (LYON und SKURRAY 1987). Bereits kurze Zeit nach der Einführung dieser Substanzen traten Staphylokokken auf, die neben Penicillin auch gegen Methicillin und Oxacillin resistent waren (ENRIGHT et al. 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus beruht auf der Produktion eines veränderten, als PBP2a bezeichneten Penicillin-bindenden Proteins, das sich durch eine sehr niedrige Affinität zu Methicillin und den meisten anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auszeichnet (CHAMBERS 1997). Aufgrund der ausbleibenden Bindung des Antibiotikums wird die Aktivität der für die Zellwandsynthese essentiellen Enzyme nicht beeinträchtigt und der bakterizide Effekt unterbleibt (LYON und SKURRAY 1987). Neben der Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika kommen bei diesen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) häufig weitere Resistenzen vor (DIEKEMA et al. 2001, LOWY 2003).

PBP2a wird durch das chromosomal gelegene Gen *mecA* kodiert, das innerhalb eines mobilen genetischen Elements, dem *staphylococcal cassette chromosome (SCCmec)*, lokalisiert ist. Durch horizontalen Gentransfer kann es zur Übertragung des Gens *mecA* zwischen verwandten Stämmen kommen (ENRIGHT et al. 2002, LOWY 2003). Der Nachweis des *mecA*-Gens ist beweisend für das Vorliegen eines Methicillin-resistenten Stammes. Üblicherweise erfolgt die MRSA-Bestimmung jedoch mit den klassischen phänotypischen Methoden der Resistenztestung, wobei statt Methicillin Oxacillin als Testsubstanz verwendet wird (BECKER 2004).

In der Humanmedizin stellen MRSA Problemkeime dar, die zu schwer therapierbaren Wundheilungsstörungen führen und teilweise weit verbreitet sind (TIEMERSMA et al. 2004). Auch in Tierkliniken werden MRSA seit einigen Jahren als Ursache nosokomialer Infektionen nachgewiesen (FRIEDRICH et al. 2011). Bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist die Gruppe der „livestock associated MRSA“ (laMRSA) beschrieben, die von den beim Menschen vorkommenden „hospital acquired MRSA“ und „community acquired MRSA“ abgegrenzt wird. Diese la-MRSA kommen vor allem in der Schweinepopulation vor (FRICK 2010, VANDERHAEGHEN et al. 2010). DE NEELING et al. (2007) stellten bei Schweinen in den Niederlanden eine Einzeltierprävalenz von 39 % und eine Herdenprävalenz von 81 % fest. In Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen ermittelten MEEMKEN et al. (2008) eine Einzeltierprävalenz von 13 % und eine Herdenprävalenz von 18 %. Alle MRSA-Isolate konnten dabei dem MLST-Typ ST398 zugeordnet werden, der auch beim Nutzgeflügel, beim Rind, bei verschiedenen Haustieren und beim Menschen vorkommt (MONECKE et al. 2011a). Laut TENHAGEN et al. (2008) stellt ST398 den bei Nutztieren bedeutensten MLST-Typ dar.

Im Gegensatz zum Schwein gibt es kaum Daten zur MRSA-Situation beim Rind (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Jena, 24.06.2010). Bei Milchkühen können MRSA wie andere *Staphylococcus aureus* Mastitiden hervorrufen. Nach FRIEDRICH et al. (2011) sind Mastitiden durch Methicillin-resistente Staphylokokken nur bedingt antibiotisch zu behandeln. Das Aussondern und Töten betroffener Tiere erscheint den Autoren zurzeit als einzige Möglichkeit der effektiven Bekämpfung. Durch den Verzehr von MRSA-haltiger Rohmilch können Verbraucher diese resistenten Keime aufnehmen (FRIEDRICH et al. 2011). Aufgrund der vorgeschriebenen Pasteurisierung sieht das BfR (2009) diese Gefahr allerdings als gering an. Kontaktinfektionen bei der Milchgewinnung und Milchverarbeitung sind möglich. Als wahrscheinlicher wird jedoch die Übertragung durch Rohmilch bzw. Rohmilchprodukte sowie durch direkten Kontakt zwischen Mensch und Kuh erachtet (TENHAGEN et al. 2008).

Verglichen mit der hohen Prävalenz beim Schwein werden MRSA beim Rind eher sporadisch nachgewiesen. Von 128 von MONECKE et al. (2007a) mittels DNA-Chip-Technologie untersuchten *Staphylococcus aureus* waren zwei Methicillin-resistent. VANDERHAEGHEN et al. (2010) wiesen in 11 (9,3 %) der untersuchten 118 *Staphylococcus aureus*-Kulturen, die aus Mastitismilch isoliert worden waren, das Gen *mecA* nach. Die MRSA-Prävalenz innerhalb der untersuchten Herden variierte dabei zwischen 0 % und 7,4 %. FRIEDRICH et al. (2011) untersuchten Tankmilchproben in Baden-Württemberg und ermittelten eine MRSA-Prävalenz von 2,2 %. In dieser Untersuchung deutete sich eine Korrelation zwischen der Dichte der Schweinepopulation und dem MRSA-Vorkommen in Milchviehbetrieben an.

Die Resistenzmechanismen von *Staphylococcus aureus* gegenüber Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika sind in Tab. 4 übersichtsartig dargestellt.

**Tab. 4:** Resistenzmechanismen gegenüber Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika in *Staphylococcus aureus*

AB	Wirkmechanismus	Resistenzmechanismus	Gen	Referenz
<b>TETRAZYKLINE</b>	Bindung an 30S-UE bakterieller Ribosomen ↓ Blockierung des Zugangs der Aminoacyl-tRNA zur ribosomalen Akzeptorstelle ↓ Hemmung der Proteinbiosynthese (bakteriostatisch)	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Effluxpumpen</b></li> <li><b>Ribosomale Schutzproteine</b> Konformitätsänderung des Ribosoms → herabgesetzte Tetrazyklin-Affinität</li> <li><b>Enzymatische Inaktivierung</b></li> </ol>	<i>tetK</i> <i>tetL</i> <i>tetM</i> -	- LYON und SKURRAY (1987) - YAMAGUCHI et al. (1995) - TAYLOR und CHAU (1996)
<b>AMINOGLYKOSIDE</b>	Bindung an 30S-UE bakterieller Ribosomen ↓ fehlerhafte Proteinsynthese ↓ Bildung von „Nonsense-Proteinen“ (bakterizid)	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Mutation der ribosomalen Gene</b></li> <li><b>Punktmutation der Zellwandporin-Gene</b> verminderte AB-Aufnahme</li> <li><b>Enzymatische Modifikation der AB</b></li> </ol>	- - <i>aacA</i> - <i>aphD</i>	- LYON und SKURRAY (1987) - ROUCH et al. (1987) - KROKER et al. (2002)
<b>MLS</b>	Bindung an 50S-UE bakterieller Ribosomen (kovalente Bindung der Peptidyltransferase) ↓ Hemmung der Proteinbiosynthese (bakteriostatisch)	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Veränderung der AB-Bindestelle durch Methyltransferasen</b></li> <li><b>Effluxpumpen</b></li> <li><b>Enzymatische Inaktivierung</b></li> </ol>	<i>ermA</i> - <i>ermC</i> <i>msrA</i> , <i>mefA</i> -	- LYON und SKURRAY (1987) - GEISS et al. (2003)
<b>FLUOR-CHINOLONE</b>	Inhibition der bakteriellen DNA-Gyrase (Topoisomerase II) und der Topoisomerase IV ↓ Hemmung der DNA-Synthese (bakterizid)	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Mutation der Gyrase-/Topoisomerase IV-Gene</b></li> <li><b>Effluxpumpen</b></li> </ol>	- <i>norA</i>	- MUÑOZ-BELLIDO (1999) - HOOPER (2001)
<b>SULFONAMIDE UND TRIMETHOPRIM</b>	<u>Sulfonamide:</u> Kompetitive Verdrängung der p-Aminobenzoensäure führt zur Inhibition der DHPS <u>Trimethoprim:</u> Hemmung der DHFR ↓ Inhibition der Folsäuresynthese (bakteriostatisch, in geeigneter Kombination bakterizid)	<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Mutation der DHPS- und/oder DHFR-Gene</b></li> <li><b>Produktion einer DHFR mit reduzierter Affinität gegenüber Trimethoprim</b></li> </ol>	- <i>dfrA</i>	- LYON und SKURRAY (1987) - SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA (2001) - KROKER et al. (2002)

AB = Antibiotikum/Antibiotika/Antibiotikagruppe; UE = Untereinheit;

MLS = Makrolide/Lincosamide/Streptogramine; DHPS = Dihydropteroinsäure-Synthetase

DHFR = Dihydrofolsäurereduktase

Mit Ausnahme der MRSA-Stämme ist die Resistenzsituation bei aus bovinen Milchproben isolierten *Staphylococcus aureus* in Deutschland als überwiegend günstig anzusehen, wobei die Resistenz gegenüber Penicillin in den verschiedenen Studien stark variiert (FEHLINGS et al. 2003, SCHRÖDER et al. 2005). SCHRÖDER et al. (2005) konnten bei der Auswertung von Antibiogrammen im norddeutschen Raum keine Resistenzen gegenüber Oxacillin, Cephalothin, Cefacetril, Cefquinom und Neomycin feststellen. 88 % der untersuchten *Staphylococcus aureus* waren sensibel gegenüber Penicillin, Ampicillin und Cefoperazon.

### 2.3 DNA-Microarrays

#### 2.3.1 Entwicklung der Microarray-Technologie

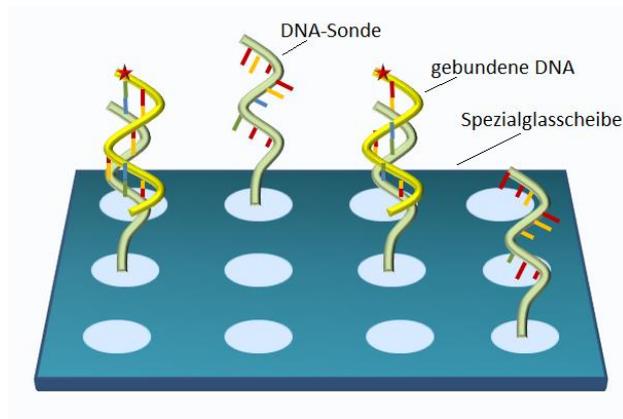
Die Entwicklung der Microarray-Technologie Mitte der 90er Jahre hat die Molekulargenetik im Bereich der Genexpressionsanalysen revolutioniert (MERK und MARTIN 2008). Anders als bei traditionellen Methoden wie dem „Northern-Blot“, die nur Daten zu einzelnen wenigen Genen liefern, ermöglichen Microarrays die simultane Untersuchung tausender Gene bei geringem Material-, Zeit- und Platzbedarf (BROWN und BOTSTEIN 1999).

Der Grundstein für die Microarray-Technologie wurde bereits 1975 gelegt, als Edwin Southern entdeckte, dass immobilisierte einzelsträngige DNA mit ihrer komplementären Sequenz hybridisieren kann (SOUTHERN 1975). Auf dieser Basis entwickelte der Wissenschaftler den „Southern Blot“, bei dem die zu untersuchende DNA auf einer Membran immobilisiert und mit einer markierten DNA bekannter Sequenz, einer sog. Sonde, hybridisiert wird.

Auch Microarrays basieren auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Im Gegensatz zum „Southern Blot“ wird jedoch die Sonde auf dem Trägermaterial fixiert und mit den markierten Genfragmenten der Probe hybridisiert (BROWN und BOTSTEIN 1999, CUZIN 2001, GABIG und WEGRZYN 2001, KODADEK 2001). Darüber hinaus sind Microarrays wesentlich leistungstärker als der „Southern Blot“. Während beim Blottingverfahren eine bestimmte Gensequenz nachgewiesen wird, kann bei der Microarray-Technologie eine Vielzahl molekularer Zielbereiche auf einer Grundfläche von wenigen mm<sup>2</sup> detektiert werden. Aus diesem Grund werden DNA-Microarrays auch als „DNA-Chips“ bezeichnet. (GABIG und WEGRZYN 2001, MONECKE et al. 2008a, MONECKE und EHRLICH 2005).

Als Trägermaterial dienen chemisch modifizierte Spezialglasscheiben, auf welche die Sonden unter Anwendung verschiedener Verfahren aufgebracht werden (Abb. 2). Weit verbreitet sind hierbei photolithographische Methoden, bei denen die Sonden direkt auf dem Chip erzeugt werden. Möglich ist außerdem das Aufbringen fertig präparierter DNA-Sonden auf die Matrix durch einen Spotting-Roboter oder durch ein Tintenstrahldrucker-ähnliches „Inkjet“-Verfahren (KODADEK 2001, HELLER 2002).

Stattfindende Hybridisierungen können auf verschiedene Weise sichtbar gemacht werden, wobei häufig Fluoreszenzfarbstoff-markierte Nukleotide zum Einsatz kommen. Bei der in dieser Untersuchung angewandten Technologie werden Hybridisierungen durch die Umsetzung eines Substrats durch ein zugeführtes Enzym sichtbar. Um Hybridisierungen zwischen Proben-DNA und Sonde lokalisieren zu können, liegen die Sonden in einer definierten Anordnung auf dem Trägermaterial vor (CUZIN 2001).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Arrayoberfläche

Die Anwendungsgebiete der Microarray-Technologie sind vielfältig und abhängig vom Charakter der zugrunde liegenden Nukleinsäure (CUZIN 2001). So wird bei DNA-Microarrays zwischen cDNA- und Oligonukleotid-Arrays unterschieden.

Bei cDNA-Microarrays werden relativ lange DNA-Moleküle als Sonde verwendet. Dieser Array-Typ kommt in erster Linie bei Expressionsanalysen zum Einsatz. Oligonukleotid-Arrays basieren auf wesentlich kürzeren Nukleinsäuresonden und werden unter anderem verwendet, um Mutationen aufzudecken, bestimmte Gene nachzuweisen oder ein Genom zu entschlüsseln (GABIG und WEGRZYN 2001).

Während mit dieser Technologie das genetische Potential eines *Staphylococcus aureus*-Isolates bestimmt werden kann, ist keine Aussage über die tatsächliche Virulenz- und Resistenzsituation möglich, da das Vorhandensein eines Gens nicht mit seiner Expression gleichzusetzen ist (BECKER et al. 2007). So wird ein Gen immer dann exprimiert, wenn bestimmte Bedingungen vorliegen, in denen das Genprodukt einen Beitrag zur Überlebensfähigkeit der jeweiligen Zelle liefert (BROWN und BOTSTEIN 1999).

### 2.3.2 Bisherige Untersuchungen zur Charakterisierung boviner *Staphylococcus aureus*-Isolate mittels DNA-Microarray-Technologie

HERRON-OLSON et al. (2007) nutzten die Microarray-Technologie für den Vergleich humaner und boviner *Staphylococcus aureus*-Isolate. Sie stellten dabei dem Stamm ST151, der in Untersuchungen von KAPUR et al. (1995) bei den bovinen Stämmen weltweit am häufigsten nachgewiesen wurde, andere bovine und humane Stämme gegenüber.

ST151-Isolate wiesen in dieser Untersuchung die geringste Ausstattung mit Resistenzgenen auf. Des Weiteren verfügten ST151-Isolate konstant über bestimmte mobile genetische Elemente (SaPIbov, SaPIbov3). Diese genaue Ausstattung fanden die Autoren auch in anderen bovinen Isolaten, die im Rahmen der Untersuchung sehr häufig im Zusammenhang mit bovinen Mastitiden auftraten und noch keinem MLST-Typ zugeordnet waren. Dagegen traten diese mobilen genetischen Elemente weder bei humanen Isolaten, noch bei solchen auf, die sporadisch bei bovinen Mastitiden gefunden wurden. Da die Funktion der Mehrzahl der kodierten Proteine unbekannt war, konnten die Autoren

den genetischen Elementen keine definitive Rolle im Mastitisgeschehen zuordnen. Sie vermuteten jedoch, dass eine spezifische Kombination der Gene ausschlaggebend für die Pathogenese der Mastitis ist.

MONECKE et al. (2007a) bezogen in ihre Microarray-basierten Untersuchungen 128 bovine *Staphylococcus aureus*-Isolate aus Deutschland und der Schweiz ein. Die Isolate, die aus dem Untersuchungsgut verschiedener Labore stammten, gehörten den *agr*-Typen I, II und III an und konnten sieben verschiedenen CC zugeordnet werden. Die Autoren stellten dabei kaum regionale Unterschiede fest. Enterotoxin-Gene wurden bei 94 Isolaten, das Gen für TSST-1 bei 23 Isolaten gefunden. Während PVL nicht nachgewiesen wurde, konnte bei über 50 % der Isolate das Gen für LukF-P83/LukM festgestellt werden. Die Isolate wiesen kaum Antibiotika-Resistenzgene auf. Lediglich zwei Stämme waren Methicillin-resistent.

In einer in England durchgeführten Untersuchung wurden 56 *Staphylococcus aureus*-Isolate aus Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden und einem Kamel mittels Microarray-Technologie näher charakterisiert und mit 161 humanen Isolaten verglichen (SUNG et al. 2008). Die Autoren konnten 61 % der tierischen Isolate Stämmen zuordnen, die beim Mensch nicht auftraten (ST151, ST771, ST130 und ST873). Andererseits wiesen sie einige CC nach, deren Vorkommen in erster Linie auf den Mensch beschränkt war (CC1, CC8 und CC22). Während der Großteil der bovinen Mastitisisolate den Stämmen ST151, ST771 und ST97 zugeordnet werden konnte, wurden einige wenige Mastitiden auf humane Isolate zurückgeführt. Die Ausstattung tierischer und humaner Isolate mit mobilen genetischen Elementen divergierte in dieser Studie. Im Gegensatz zu humanen *Staphylococcus aureus* wurden die für einen Komplement-Inhibitor (*scn*) und Staphylokinase (*sak*) kodierenden Gene in tierischen Isolaten kaum nachgewiesen.

SALAM et al. (2010) charakterisierten bovine *Staphylococcus aureus*-Isolate eines thüringischen Milchviehbestandes unter Verwendung der Microarray-Technologie und verglichen sie mit Staphylokokken-Kulturen aus Nasentupfern des Betreuungspersonals. Alle aus der Milch isolierten Stämme gehörten einem *agr*-Typ (*agr* III) und einem klonalen Komplex (CC1) an. Dagegen wiesen alle humanen Isolate den *agr*-Typ I auf. Die Autoren schlossen daraus, dass in dem von ihnen untersuchten Betrieb keine Übertragung zwischen Mensch und Tier stattgefunden hatte. Leukozidine und TSST-1 konnten in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, jedoch verfügte jedes Isolat über zumindest ein Enterotoxin-Gen. Alle untersuchten Isolate waren sensibel gegenüber Methicillin.

### **3 Material und Methoden**

Der vorliegenden Arbeit liegt das Projekt „Untersuchungen zur Prävalenz und Schädigung von Euterinfektionen durch *Staphylococcus aureus*“ der Thüringer Tierseuchenkasse AdÖR zugrunde, das durch die Thüringer Tierseuchenkasse und die Landesvereinigung Thüringer Milch e.V. finanziert wurde.

Die im Folgenden in den Punkten 3.3–3.5 sowie 3.7–3.8 beschriebenen Methoden wurden im Labor des Tiergesundheitsdienstes der Thüringer Tierseuchenkasse mit Unterstützung der dortigen Angestellten selbständig durchgeführt. Die Charakterisierung ausgewählter Isolate mittels Microarray-Technologie und die dazu erforderlichen vorbereitenden Arbeiten erfolgten im Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts, Standort Jena, und wurden mit Unterstützung der dortigen wissenschaftlichen Mitarbeiter ebenfalls eigenständig durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen, die in 3.9 dargelegt werden, leistete die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Stefan Monecke im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden, die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Hotzel im Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts, Standort Jena, sowie die Alere Technologies GmbH, Jena. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte selbständig unter fachlicher Beratung von Herrn Andreas Richter, Leipzig.

#### **3.1 Darstellung der teilnehmenden Bestände**

Am Projekt der Thüringer Tierseuchenkasse nahmen 34 Bestände aus 14 verschiedenen Landkreisen und kreisfreien Städten Thüringens teil.

Bei der Auswahl der Bestände wurde auf deren Heterogenität in Bezug auf Herdengröße, Management und Haltung Wert gelegt. Der kleinste Bestand umfasste 15, der größte 1229 zum Zeitpunkt der Untersuchung laktierende Tiere (Anhang 1). Während bei drei Beständen eine Anbindehaltung vorlag, verfügten die restlichen Bestände über Laufställe. Der überwiegende Teil der in diesen Beständen eingestellten Milchkühe gehörte der Rasse „Holstein-Friesian“ an. Lediglich ein Betrieb mit etwa 70 Kühen hielt ausschließlich Kühe der Rasse „Fleckvieh“.

#### **3.2 Milchprobenahme und Transport**

Die Milchproben wurden als Viertelanfängsgemelke entnommen.

Grundsätzlich wurden alle zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt laktierenden Tiere eines Bestandes beprobt. Eine Ausnahme stellten hierbei Tiere dar, die sich innerhalb der ersten fünf Tage nach der Abkalbung befanden, sowie Tiere, die aufgrund einer Erkrankung Arzneimittel erhalten hatten und sich noch innerhalb der Wartezeit für Milch für das jeweilige Präparat befanden. Die Tatsache, dass die Untersuchung nach drei bis sieben Monaten wiederholt wurde, sollte gewährleisten, dass Tiere, die zum Zeitpunkt der ersten Bestandsuntersuchung trocken gestanden hatten oder behandelt worden waren und infolgedessen nicht beprobt wurden, bei der zweiten Untersuchung miterfasst wurden. Auf diese Weise wurden Viertelgemelke von 14 157

unterschiedlichen Kühen entnommen, wobei 6681 Tiere doppelt und 7476 Tiere einmalig beprobt wurden. Die pro Untersuchungsdurchgang beprobten 10 421 bzw. 10 417 Tiere entsprechen dabei etwa einem Zehntel der im Jahr 2010 in Thüringen vorhandenen Milchviehpopulation (TVL 2010). Die Anzahl der im ersten und zweiten Untersuchungsdurchgang beprobten Kühe in den einzelnen Beständen ist in Anhang 1 dargestellt.

Die Entnahme der Milchproben erfolgte überwiegend durch betriebseigene Melker, die durch die Mitarbeiter des Tiergesundheitsdienstes der Thüringer Tierseuchenkasse eine Einweisung in die Probenahme entsprechend der Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen der DVG (2009) erhalten hatten. In einigen kleineren Beständen übernahmen Tierärzte des Tiergesundheitsdienstes die Probenahme.

Die Bestände wurden im Vorfeld mit einheitlichem laboreigenem Leergut ausgestattet. Jedes Milchproben-Röhrchen hatte ein Volumen von 10 ml und enthielt 1,2 ml Borsäure-Konservierungsmittel (5 g Borsäure + 1 g Glycerin in 100 ml A. dest.; NERBE PLUS GmbH, Winsen, Deutschland), das eine Lagerung über 24 h bei 5–20 °C ermöglichte (DVG 2009).

Das in Thüringen etablierte Kuriersystem des Thüringer Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz übernahm bei einem Großteil der Bestände den Transport des Leerguts in die Bestände sowie den Transport der Milchproben ins Labor der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena, wodurch das zeitnahe Eintreffen der Proben im Labor ermöglicht wurde. Im Falle einer Probenahme durch Tierärzte des Tiergesundheitsdienstes wurden die Proben im Anschluss an die Entnahme direkt von den Tierärzten zum Labor transportiert. Der Ansatz zur mikrobiologischen Untersuchung konnte daher in jedem Fall binnen 24 h nach Abschluss der Probenahme durchgeführt werden.

### 3.3 Durchführung der bakteriologischen Untersuchung

Die bakteriologische Untersuchung der insgesamt 81 567 entnommenen Milchproben erfolgte im Labor der Thüringer Tierseuchenkasse in Jena. Die angewandten Verfahren entsprachen den in den Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern (DVG 2009) beschriebenen Methoden, so dass sich die Untersuchung nicht auf den Nachweis von *Staphylococcus aureus* beschränkte. Auch Koagulase-negative Staphylokokken, Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* und andere Äskulin-positive Streptokokken), *Enterobacteriaceae*, *Arcanobacterium pyogenes*, Corynebakterien, Pseudomonaden, aerobe Sporenbildner, Hefen und Prototheken wurden mit diesem Verfahren erfasst.

Standardnährmedium war gebrauchsfertig bezogener Äskulin-Agar mit Schafblut (ESC SB; OXOID, Wesel, Deutschland). Das darin enthaltene Glykosid Äskulin zeigt im UV-Licht Fluoreszenz, was beim Nachweis Äskulin-positiver Streptokokken genutzt wird. Diese Streptokokken führen durch Abbau des Äskulins in Glucose und Äskuletin zu einem Verlust der Fluoreszenz in ihrer Umgebung, wodurch eine Braunfärbung der Kolonien eintritt (DVG 2009).

Vor dem Ausstreichen der Milchproben wurde ein  $\beta$ -hämolyzierender *Staphylococcus aureus*-Stamm (CC151) in vertikaler Linie auf den Agar aufgebracht. Dieser führte in Kombination mit einem im Inokulum vorkommenden *Streptococcus agalactiae* zum CAMP-Phänomen und ermöglichte so den leichteren Nachweis des letztgenannten Mastitiserregers.

Nach sorgfältiger Durchmischung der Proben wurde mittels Glasstab eine Sekretmenge von ca. 0,02 ml auf ein Viertel einer Agarplatte mäanderförmig ausgestrichen. Es folgte eine 20-24-stündige Inkubation bei 37 °C (KB240; BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Das Glasstäbchen mit anhaftendem Restsekret wurde direkt nach dem Ausstrich in 2 ml einer Glucose-Bouillon (OXOID, Wesel, Deutschland) gegeben. Letztere wurde als Trockennährboden bezogen, vor Gebrauch in A. dest. (23g/1l) gelöst, in Plastikröhrchen mit 10 ml Volumen (NERBE PLUS GmbH, Winsen, Deutschland) verteilt und 15 min bei 121 °C autoklaviert (HICLAVE HV-85-L; HMC, Engelsberg, Deutschland). Nach Beimpfung der Glucose-Bouillon wurde sie für 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend wie für die Milchproben beschrieben bakteriologisch untersucht. Die Nährbouillon diente dem Nachweis geschwächter oder in geringer Keimzahl vorhandener Mastitiserreger. Sie stellte keine spezifische Anreicherung für *Staphylococcus aureus* dar.

### 3.4 Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

Die Identifizierung der Bakterien erfolgte gemäß den Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern der DVG (2009). Bei dem beschriebenen Verfahren handelt es sich um den Nachweis Koagulase-positiver Staphylokokken. Neben *Staphylococcus aureus* werden daher auch andere Koagulase-positive-Staphylokokken wie *Staphylococcus intermedius* und einige Stämme von *Staphylococcus hyicus* miterfasst (PHILLIPS und KLOOS 1981); ihre Bedeutung im Mastitisgeschehen ist verglichen mit der von *Staphylococcus aureus* jedoch so gering, dass ihre gesonderte Angabe vernachlässigt werden kann (ROBERSON et al. 1992). Der Einfachheit halber soll im Folgenden immer von „*Staphylococcus aureus*“ gesprochen werden, auch wenn das Nachweisverfahren alle Koagulase-positiven-Staphylokokken erfasst.

#### 3.4.1 Identifizierung anhand Koloniemorphologie, Latexschnellagglutinationstest und Nachweis der Plasmakoagulase

Flache Kolonien von beiger bis goldgelber Farbe wurden als *Staphylococcus aureus* bezeichnet, wenn sie über eine  $\beta$ -Hämolyszone verfügten und 1–3 mm groß waren. Bei fraglichen Staphylokokken-Kolonien, die nicht alle aufgeführten Merkmale aufwiesen, wurde zur Identifizierung der Latexschnellagglutinationstest Staphaurex Plus® (Remel, Lenexa, USA) angewandt. Grundprinzip dieses Schnelltests ist die Agglutination zwischen *Staphylococcus aureus*-spezifischen Pathogenitätsfaktoren (Clumping-Faktor, Protein A und spezifischen Oberflächenantigenen) und Substanzen mit komplementären Strukturen im Testlatex. So kommt es zur Interaktion zwischen Clumping-Faktor und Fibrinogen, zwischen Protein A und IgG und zwischen Oberflächenantigenen und spezifischem IgG.

Die fraglichen Kolonien wurden mit einer Öse aufgenommen und auf einem schwarzen Reaktionskärtchen mit einem Tropfen Testlatex verrieben. Als Richtwert sollte eine Menge verwendet werden, die ungefähr sechs mittelgroßen Kolonien entsprach. Durch Schwenken der Emulsion auf der Karte kam es im positiven Fall binnen 30 Sekunden zu einer Agglutinationsreaktion, während andernfalls eine Verklumpung ausblieb. Die Absicherung des Ergebnisses erfolgte durch Wiederholung des Tests mit einem Kontrolllatex. Eine Agglutination des Testlatex bei gleichzeitigem Ausbleiben einer Agglutination des Kontrolllatex sprach für das Vorliegen von *Staphylococcus aureus*.

Bei nicht eindeutigen Agglutinationsreaktionen wurde unter Verwendung von Kaninchenplasma (STAPH-ASE; BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) die bakterielle Koagulase im Röhrchentest nachgewiesen. Die zu testenden Staphylokokken wurden hierbei zunächst in Peptonwasser überimpft und 18-24 h lang bei 37 °C inkubiert. Das lyophilisierte Plasma wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in A. dest. rekonstituiert und in gleicher Menge mit beimpftem Peptonwasser versetzt. Nach Bebrütung bei 37 °C erfolgte die Auswertung nach 4 h, wobei im positiven Falle eine Gerinnelbildung beobachtet werden konnte. Bei ausbleibender Gerinnelbildung wurde die Auswertung nach 24 h wiederholt.

### 3.4.2 Verwendung weiterer Tests zur Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

Bei Unsicherheiten bezüglich der Zugehörigkeit der jeweils vorliegenden Keime zur Familie der *Staphylococcaceae* wurde auf weitere Schnelltests zurückgegriffen. So kam zur Unterscheidung von Streptokokken und Staphylokokken der Katalase-Test zum Einsatz. Der Besitz des Atmungskettenenzym Katalase ermöglicht es Staphylokokken, Wasserstoffperoxid-Lösung in H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> zu spalten. Beim Test auf Vorhandensein der Katalase wird eine Öse Koloniematerial auf einen Objektträger aufgebracht und ein Tropfen einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (Bactident®; MERCK, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Bei Vorliegen von Staphylokokken bedingt der freiwerdende O<sub>2</sub> ein sofortiges Aufsteigen von Gasblasen, während diese Schaumbildung bei Streptokokken ausbleibt.

Zur Abgrenzung hämolysierender Staphylokokken von  $\beta$ -hämolysierenden *E. coli* wurde auf den KOH-Test zurückgegriffen. Der KOH-Test dient der Unterscheidung grampositiver und gramnegativer Erreger. Er stellt in dieser Hinsicht eine schnelle Alternative zur Gramfärbung dar.

Ein Tropfen 3%ige Kalilauge (MERCK, Darmstadt, Deutschland) wird auf einem Objektträger mit einer Öse Koloniematerial verrieben. Die in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorhandenen Lipopolysaccharide werden durch die Lauge aus ihrer Umgebung gelöst, wodurch die bakterielle DNA austreten kann. Letzteres führt zu einer zähen Konsistenz, die sich in einer Fadenbildung beim Abheben der Öse vom Objektträger äußert (RIEMELT et al. 2003)

Der Befund „*Staphylococcus aureus*-positives Viertel“ erfolgte entsprechend dem Laboratory Handbook on Bovine Mastitis des NMC (1999). Demzufolge weist *Staphylococcus aureus* auch im Keimgemisch eine hohe Signifikanz auf, so dass jede einzelne Kolonie sowohl in Rein- als auch in Mischkultur angegeben wurde.

### 3.5 Auswahl von *Staphylococcus aureus*-Isolaten für weiterführende Untersuchungen

Mit den beschriebenen Verfahren wurde in 1902 der untersuchten 81 567 Milchproben *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Eine detaillierte Übersicht der ermittelten Einzeltierprävalenzen der Bestände findet sich in Anhang 1.

Von diesen 1902 *Staphylococcus aureus*-Isolaten wurden 189 für weiterführende Untersuchungen herangezogen. Dabei wurde aus jedem Projektbestand pro Untersuchungsdurchgang ein Cluster von drei Isolaten ausgewählt.

Diese drei Isolate wurden im Falle gleicher Koloniemorphologie aller zum jeweiligen Untersuchungsdurchgang im Bestand nachgewiesenen *Staphylococcus aureus* zufällig aus dem Untersuchungsgut ausgewählt. Traten zwei morphologisch unterschiedliche *Staphylococcus aureus*-Typen auf, wurden zwei Vertreter des dominierenden Morphologietyps und ein Vertreter des weniger häufigen Typs weiterführend untersucht. Bei drei morphologisch unterschiedlichen Typen wurde ein Vertreter jedes Morphologietyps für die Untersuchung herangezogen. Mehr als drei Morphologietypen pro Untersuchungsdurchgang kamen in keinem Bestand vor.

Zur weiteren Untersuchung wurden dabei nur Staphylokokken verwendet, die in Reinkultur in einer Menge von mindestens 500 KbE/ml (10 Kolonien pro Ausstrich) vorlagen. Auf diese Weise sollten Kontaminationen als Ursprung der nachgewiesenen Staphylokokken limitiert werden.

Mit den beschriebenen Verfahren wurde ein repräsentativer Querschnitt der Isolate im Untersuchungsgut zusammengestellt. Alle ausgewählten Staphylokokken stammten dabei von unterschiedlichen Tieren. Bei Beständen mit weniger als drei Kühen mit *Staphylococcus aureus*-Nachweis wurde ein Isolat von jedem der positiv getesteten Tiere charakterisiert.

Die zwischenzeitliche Kryokonservierung (Cryobank<sup>TM</sup>; MAST DIAGNOSTIKA, Reinfeld, Deutschland) aller 189 Isolate ermöglichte eine spätere gleichzeitige Anzucht.

### 3.6 DNA-Microarray-basierte Genotypisierung

Die im Folgenden geschilderten Arbeitsschritte wurden im Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts, Standort Jena, durchgeführt.

#### 3.6.1 Extraktion der DNA

Jeweils eine Impföse einer Übernachtskultur der ausgewählten Isolate wurde in ein 2-ml-Tube (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Deutschland) überführt und mit 300 µl PBS vermengt. Im Anschluss erfolgte die Isolation der *Staphylococcus aureus*-DNA, für die Komponenten aus dem „StaphyType Kit“ (ALERE TECHNOLOGIES GmbH, Jena, Deutschland) und dem „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Deutschland) kombiniert wurden. Aus dem „StaphyType Kit“ wurden Lysis-Enhancer und Lysispuffer verwendet, während dem „High Pure Template Preparation Kit“ Bindungs-, Wasch- und Elutionspuffer entnommen wurden, deren Zusammensetzung im Anhang 3 aufgeführt ist. Die eingesetzten Tubes sowie die verwendete Proteinase entstammen ebenfalls dem „High Pure Template Preparation Kit“.

Von oben genannter Suspension wurden 100 µl in Tubes überführt, die Lysis-Enhancer enthielten. Zum Aufbrechen der bakteriellen Zellwand wurden 200 µl Lysispuffer zugegeben und nach Verwendung des Vortex Schüttlers (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) eine Stunde lang bei 37 °C und 75 x g´ im Thermomixer (TMix; Analytik Jena, Jena, Deutschland) homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Bindungspuffer und 40 µl Proteinase K erfolgte eine zehnmündige erneute Inkubation im Thermomixer bei 72 °C und 75 x g´.

An den Zusatz von 100 µl Isopropanol zur auf Raumtemperatur abgekühlten Suspension schloss sich eine weitere Homogenisierung im Vortex-Schüttler an. Die Auswirkungen des Alkohols auf die Hydrathülle der DNA führten dabei zu einer Abnahme der Löslichkeit mit der Folge einer Ausfällung der DNA (MATISSEK et al. 2010).

Der gesamte Inhalt eines Tubes wurde in ein High Tube Filtertube überführt, das zwei Lagen Glasfaservlies als DNA-Filter enthielt, und eine Minute bei  $1096 \times g'$  zentrifugiert (MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach Verwerfen des Inhalts des Auffanggefäßes folgten zwei Reinigungsschritte mit jeweils 500  $\mu$ l Waschpuffer, an die sich eine einminütige Zentrifugation bei  $1096 \times g'$  anschloss.

Zur Elution der gereinigten DNA vom Glasfaservlies wurden 200  $\mu$ l des auf 70 °C vorgewärmten Elutionspuffers hinzugegeben und nach Verbringen des Filtertubes in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß bei  $1096 \times g'$  eine Minute lang zentrifugiert.

### 3.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

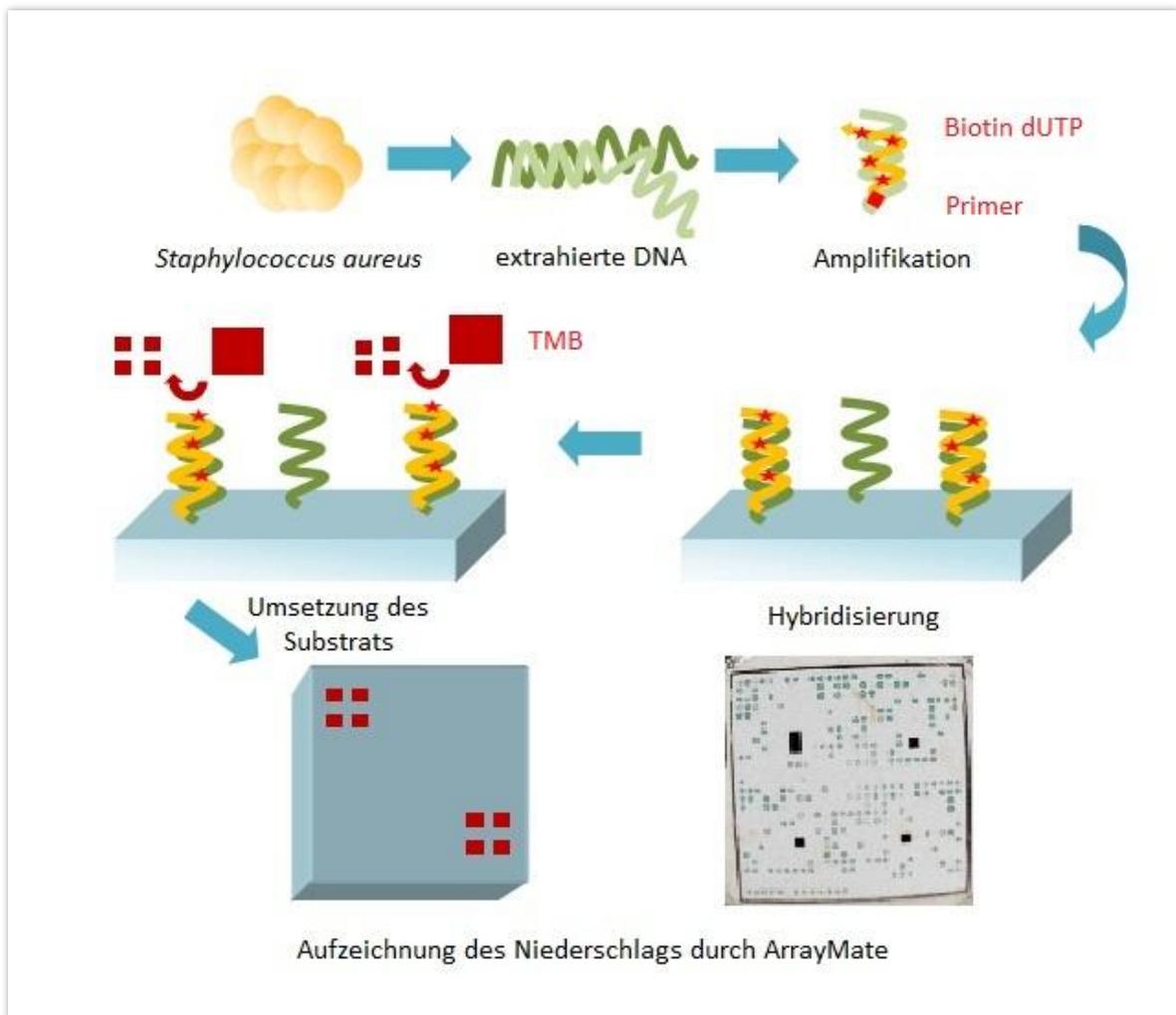
Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA erfolgte nach dem Prinzip der Absorptionsmessung mittels NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 3.6.3 Molekularbiologische Typisierung mittels Microarray-Technologie

#### 3.6.3.1 Prinzip der DNA-Microarray-Untersuchungen

Bei der Durchführung der Microarray-Untersuchungen kommt es zunächst zu einer PCR-ähnlichen linearen Amplifikation mit Markierung von 334 unterschiedlichen Zielbereichen, sog. Targets, die 185 klinisch relevanten Genen und Allelen entsprechen (MONECKE und EHRICHT 2005, MONECKE et al. 2009). Zur extrahierten DNA werden zu diesem Zweck neben einem Primergemisch, das pro zu untersuchendem Zielbereich (Target) einen Primer enthält, einer Polymerase und dNTPs auch biotinylierte dUTPs gegeben. Letztere werden wie die dNTPs in einem PCR-ähnlichen Schritt in die Amplifikate eingebaut und ermöglichen deren spätere Detektion auf dem Array.

Die mit Biotin-dUTP markierten entstandenen DNA-Einzelstränge hybridisieren mit spezifischen, kovalent auf der Arrayoberfläche gebundenen DNA-Strängen bekannter Sequenz, sog. DNA-Sonden. Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) wird hinzugegeben und zieht die Ausbildung von Streptavidin-HRP-Biotin-Komplexen nach sich. Wird nun TMB als Substrat der Peroxidase zugefügt, kommt es zur Ausbildung eines Niederschlages, der mithilfe eines speziellen Array Mate Readers aufgezeichnet wird. Über die Lokalisation des Niederschlages ist ein Rückschluss auf die biotinylierten DNA-Einzelstränge möglich und da die Anordnung der Sonden auf der Arrayoberfläche bekannt ist, kann nachvollzogen werden, zu welcher Sonde komplementäre Einzelstränge existieren. Das beschriebene Funktionsprinzip ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Funktionsweise eines Microarrays

Im Gegensatz zu einer konventionellen exponentiellen PCR sorgt die Abwesenheit eines zweiten Primers dafür, dass der Primer in jedem Zyklus an die Original-DNA binden muss. Dies ermöglicht es zum einen, viele Reaktionen gleichzeitig ablaufen zu lassen. Zum anderen führt es – bedingt durch zwei aufeinander folgende sequenzspezifische Hybridisierungen – zu einer hohen Spezifität. So bindet zunächst der Primer an die Original-DNA und im nächsten Schritt das entstandene Amplifikat an die entsprechenden Sonden. Der im Vergleich mit der gewöhnlichen PCR vorhandene Sensitivitätsverlust ist bei dieser Methode von untergeordneter Bedeutung, da eine Kultivierung des Erregers vorausgeht und die Anreicherung, die bei einer PCR durch die Amplifikation erreicht wird, bereits auf dem Nährmedium erfolgt (MONECKE und EHRICHT 2005, MONECKE et al. 2008a, MONECKE et al. 2009).

Mithilfe dieser Technologie war es möglich, in einem einzigen Untersuchungsgang die gesammelten *Staphylococcus aureus*-Isolate auf die bisher bekannten Toxin-, Adhäsionsfaktor- und Resistenzgene zu untersuchen (MONECKE et al. 2008a). Neben dem Nachweis klinisch und therapeutisch interessanter Gene konnte darüber hinaus eine Einordnung der Isolate in das MLST-

Klassifizierungsschema erfolgen. Die Übereinstimmung zwischen Hybridisierungsmuster und MLST-Typ wurde von MONECKE et al. (2008b) aufgezeigt.

### 3.6.3.2 Durchführung der DNA-Microarray-Untersuchungen

Bei der Umsetzung der Microarrays wurde die Anwendungsvorschrift des verwendeten „StaphyType Kit“ grundsätzlich befolgt. Eine Ausnahme stellte hierbei die Modifikation des Thermocycler-Protokolls dar, die in Absprache mit der Firma Alere Technologies GmbH, Jena, erfolgte. Da die verwendeten Array-Strips aus acht in einer Reihe angeordneten Tubes (Wells) bestanden, an deren Boden sich jeweils ein DNA-Chip befand, konnten immer acht Isolate gleichzeitig typisiert werden.

Für die Biotinylierung der extrahierten DNA wurde durch Vermengen von 4,9 µl Markierungspuffer und 0,1 µl DNA-Polymerase in einem 20 µl-Tube zunächst ein Mastermix für die anschließende PCR-ähnliche Amplifikation geschaffen. Anschließend wurden 5 µl der eluierten DNA hinzugegeben und folgendes Thermocycler-Protokoll (Mastercycler; EPPENDORF, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) durchlaufen:

300 sec bei 96 °C	
50 Zyklen mit	60 sec bei 96 °C
	20 sec bei 50 °C
	40 sec bei 72 °C

Zur Verhinderung einer Kondensation wurden die Deckel der Tubes während des ganzen Protokolls auf 105 °C erhitzt. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte eine Kühlung auf 4 °C.

Zur Vorbereitung der Proben auf die Hybridisierung wurden jeweils 90 µl Hybridisierungspuffer zu 10 µl der biotinylierten DNA gegeben, der die Entwindung der DNA bedingte.

Die Arrays selbst durchliefen zunächst zwei Waschschrte, wobei 200 µl A. dest. in jedes Well pipettiert wurden, die nach viermaligem Wiederaufnehmen in die Pipette und erneutem Abgeben in das Well wieder entfernt wurden. Anschließend wurden in jedes Well 100 µl Hybridisierungspuffer gegeben und die Arrays für 2 min bei 75 x g´ in den auf 55 °C vorgeheizten Thermomixer verbracht. Nach Entfernen des Puffers aus den Tubes wurde die Mischung aus biotinylierter DNA und Hybridisierungspuffer in die Tubes gegeben und die Array-Strips für weitere 60 min bei 55 °C und 75 x g´ in den Thermomixer gegeben.

Nach Verwerfen der DNA/Puffermischung erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl Waschpuffer 1. Die Pufferlösung wurde hierbei nach dem Pipettieren viermal erneut in die Pipette aufgenommen und wieder abgegeben, bevor der Puffer möglichst vollständig aus den Wells entfernt wurde.

Vor der Zugabe des Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugates wurde dieses im Verhältnis 1:100 mit Konjugationspuffer vermengt. 100 µl der entstandenen Lösung wurden in die einzelnen Wells pipettiert und für 10 min bei 30 °C und 75 x g´ im Thermomixer konjugiert. Anschließend wurde das Enzym/Puffergemisch entfernt und verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschrte, bei denen

genauso verfahren wurde wie nach Entfernung der DNA/Puffermischung, wobei an dieser Stelle Waschpuffer 2 zum Einsatz kam. In einem letzten Schritt wurden 100 µl Substrat in jedes Well pipettiert und nach 5 min bei Raumtemperatur wieder entfernt. Die Auswertung der Array Strips erfolgte im ArrayMate™ Reader.

### 3.6.3.3 Auswahl relevanter Pathogenitätsfaktor-Gene und Resistenzdeterminanten

Da in der vorliegenden Arbeit nicht auf alle im Microarray erfassten Targets Bezug genommen werden kann, wurde sich auf eine Auswahl von Pathogenitätsfaktor-Genen und Resistenzdeterminanten beschränkt. Relevant waren hierbei in erster Linie Gene, die in der Literatur mit der Pathogenese von *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen in Verbindung gebracht wurden oder die humanmedizinisch bedeutsam waren. Eine Auflistung der betrachteten Gene erfolgt in Tab. 5 und Tab. 6. Die zugehörigen Primer sind in Anhang 4 dargestellt. Eine Übersicht sämtlicher Targets, die durch den Array erfasst werden, bietet MONECKE et al. (2011a).

**Tab. 5:** Auswahl der im „StaphyType Kit“ erfassten Pathogenitätsfaktor-Gene

<b>Gruppe</b>	<b>Faktor</b>	<b>Targetbezeichnung</b>
Koagulase	Koagulase	<i>coA</i>
Protein A	Protein A	<i>spa</i>
Fibronectinbindende Proteine	Fibronectin-bindendes Protein A	<i>fnbA</i>
Hämolysine	Hämolysin $\alpha$	<i>hla</i>
	Hämolysin $\beta$	<i>hlb</i>
	Hämolysin $\gamma$	<i>lukF-hlg, hlgA, lukS-hlg</i>
	Hämolysin $\delta$	<i>hld</i>
Exfoliative Toxine	ET A	<i>etA</i>
	ET B	<i>etB</i>
	ET D	<i>etD</i>
Enterotoxine	SEA	<i>sea-320E, sea-N315</i>
	SEB	<i>seb</i>
	SEC	<i>sec</i>
	SED	<i>sed</i>
	SEE	<i>see</i>
	SEH	<i>seh</i>
	SEJ	<i>sej</i>
	SEK	<i>sek</i>
	SEL	<i>sel</i>
	SEQ	<i>seq</i>
	SER	<i>ser</i>
	SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, SEU	<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i> (= <i>egc</i> -Cluster)
	Toxic-shock-syndrom-Toxin	TSST-1
TSST-1 (bovine Variante)		<i>tst-RF122</i>
Leukozidine	Panton-Valentine-Leukozidin	<i>lukS-PV, lukF-PV</i>
	LukD/LukE	<i>lukD/lukE</i>
	LukF-P83/lukM	<i>lukF-P83/lukM</i>
Extrazelluläre Enzyme	Katalase	<i>katA</i>
	Thermonuklease	<i>nuc</i>
	Staphylokinase	<i>sak</i>

**Tab. 6:** Auswahl der im „StaphyType Kit“ erfassten Resistenzdeterminanten

Antibiotika-Gruppe	Bezeichnung des Resistenz-vermittelnden Gens
β-Laktam-Antibiotika	<i>mecA</i>
	<i>blaZ</i>
Tetrazykline	<i>tetK</i>
	<i>tetM</i>
Aminoglykoside	<i>aacA-aphD</i>
Makrolide/Lincosamide/Streptogramine	<i>ermA-C</i>
	<i>mefA</i>
	<i>msrA</i>
	<i>vatA</i>
	<i>vatB</i>
	<i>vgaA</i>
	<i>vgb</i>
Trimethoprim	<i>dfrA</i>
Chloramphenicol	<i>cat</i>
	<i>fexA</i>
	<i>cfr</i>
Glykopeptide	<i>vanA</i>
	<i>vanB</i>
	<i>vanZ</i>
Epoxyde	<i>fosB</i>
Fusidinsäure	<i>far</i>

### 3.7 Erfassung des Phänotyps

Die Beschreibung des Phänotyps der 189 Staphylokokken erfolgte nach gleichzeitiger Anzucht aller Isolate auf zwei unterschiedlichen Nährmedien mit Schafblut (Äskulin-Agar ESC SB und Columbia-Agar COL SB+; OXOID, Wesel, Deutschland). Nach einer Bebrütungszeit von 24 h bei 37 °C wurde jedes Isolat hinsichtlich Größe, Hämolyseverhalten, Pigmentierung, Querschnitt, Oberfläche und Rand auf beiden Medien beurteilt und die Ergebnisse in einem Erhebungsbogen festgehalten (Anhang 2). Während die Evaluierung des Hämolyseverhaltens im Durchlicht durchgeführt wurde, erfolgte die Beschreibung der anderen Eigenschaften unter Einsatz der Stereolupe (16fache Vergrößerung). Die Ergebnisse der vorausgehenden Microarray-Typisierung der 189 Isolate lagen bei der Beurteilung der Kolonien nicht vor und hatten daher keinen Einfluss auf die Beschreibung der Staphylokokken.

Zusätzlich zur Beschreibung des Hämolyseverhaltens wurde die Hämolyse nach einer von SKALKA et al. (1979) entwickelten Ausstrichmethode charakterisiert. Die zu prüfende Kultur wurde hierbei senkrecht zu einem β-hämolisierenden *Staphylococcus aureus* (CC151) auf Äskulin-Agar ausgestrichen und 24 h lang bei 37 °C bebrütet. Nach SKALKA et al. (1979) sowie HÉBERT und

HANCOCK (1985) liegt beim zu testenden Isolat eine  $\alpha$ -Hämolyse vor, wenn eine Zone vollständiger Hämolyse im Bereich des  $\beta$ -hämolisierenden Stammes gehemmt wird. Eine  $\beta$ -Hämolyse zeigt sich als eine Zone unvollständiger Hämolyse um den Staphylokokken-Impfstrich.  $\delta$ -Hämolyse stellt sich als schmale Zone vollständiger Hämolyse dar, die im Bereich des  $\beta$ -hämolisierenden Stammes eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse ausbildet.

### 3.8 Erstellung eines Antibiotogramms

Zur Bestimmung der *in vitro*-Empfindlichkeit der Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika kam der Agardiffusionstest zum Einsatz.

Die Resistenzbestimmung erfolgte gegenüber folgenden Wirkstoffen bzw. Wirkstoffkombinationen:

Penicilline	Amoxicillin/Clavulansäure
	Ampicillin/Cloxacillin
	Cloxacillin
	Oxacillin
	Penicillin
Cephalosporine	Cefacetril
	Cefalexin
	Cefazolin
	Cefapirin
	Cefoperazon
	Cefquinom
Aminoglykoside	Gentamicin
	Neomycin
Fluorchinolone	Danofloxacin
	Enrofloxacin
	Marbofloxacin
Makrolide	Erythromycin
	Tylosin
Lincosamide	Pirlimycin
Trimethoprim	Trimethoprim
Tetrazykline	Tetrazyklin
Kombinationen verschiedener Gruppen	Lincomycin/Neomycin
	Penicillin/Streptomycin/Nafcillin
	Cefalexin/Kanamycin

Zwei bis fünf Kolonien einer Reinkultur des Erregers wurden in 5 ml NaCl überführt, um eine Bakteriensuspension mit der Dichte „McFarland 0,5“ zu erhalten. Nach dem Aufbringen der Suspension auf vier Agarplatten (Mueller Hinton mit Schafblut; OXOID, Wesel, Deutschland) wurden

Mithilfe eines Andruckdispensers (OXOID, Wesel, Deutschland) jeweils sechs mit Antibiotika getränkte Filterpapierplättchen (OXOID, Wesel, Deutschland) auf den Nährböden platziert.

Durch die Diffusion des Antibiotikums in die Umgebung des Wirkstoffträgers kommt es zur Ausbildung eines Konzentrationsgefälles. Abhängig von der Empfindlichkeit des inokulierten Erregers wird das Wachstum der Bakterien während der 18- bis 20-stündigen Inkubation gehemmt und ein sog. Hemmhof entsteht. Die Größe dieses Hofes ist abhängig von der Empfindlichkeit des Erregers gegenüber dem jeweiligen Wirkstoff. Der Durchmesser des Hemmhofs wird mit einem Lineal gemessen und zur Resistenzbewertung herangezogen (DVG 2009).

Die Referenzdaten für die Einteilung der Hemmhofdurchmesser in die drei Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ entstammten den „Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals“ des CLSI (2008).

### 3.9 Weiterführende Untersuchungen

Bei der Aufarbeitung der Ergebnisse ergaben sich gezielte Fragestellungen, die die Durchführung weiterführender Untersuchungen notwendig machten.

So sollte bei einem Isolat ein ausbleibendes *lukF-P83/lukM*-Signal und daher die Abwesenheit dieser Genkombination bestätigt werden. Im Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts, Standort Jena, wurde aus diesem Grund eine PCR nach YAMADA et al. (2005) durchgeführt.

Außerdem sollte eine Antwort darauf gegeben werden, ob das Vorhandensein der Genkombination *lukF-P83/lukM* mit der Expression des kodierten Leukozidins einhergeht. Daher wurde in der Alere Technologies GmbH, Jena, bei 15 zufällig ausgewählten Isolaten eine Expressionsanalyse durchgeführt. Mithilfe von Protein-Arrays wurden dabei die translatierten funktionellen Genprodukte nachgewiesen und ihre Expression gemessen. Dieses Verfahren wird in EHRICHT et al. (2009) sowie in MONECKE et al. (2011b) ausführlich beschrieben.

Weiterhin erfolgte bei vier Isolaten neben dem Agardiffusionstest eine auf der Bouillon-Mikrodilution basierende Resistenzbestimmung mittels VITEK-2-Gerätesystem (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). Diese wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das getestete Antibiotikaspektrum ist in Anhang 10 dargestellt.

### 3.10 Statistische Methoden

Die Zusammenhänge zwischen der Zugehörigkeit zu bestimmten CC und dem Vorhandensein verschiedener Pathogenitätsfaktor-Gene, Resistenzdeterminanten sowie ausgewählter Morphologiekriterien wurden unter Verwendung der Statistiksoftware SPSS 15.0 für Windows (Fa. SPSS inc., Illinois, Chicago, USA) statistisch ausgewertet. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt. Werte von  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant, Werte von  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant erachtet.

Die Testung auf Abhängigkeit zwischen CC und *agr*-Gruppe, Pathogenitätsfaktor-Gen bzw. Resistenzdeterminante wurde nach Erstellung einer Kontingenztabelle mit dem  $\chi^2$ -Test vollzogen, wobei die zweiseitige exakte Signifikanz betrachtet wurde. Im Gegensatz zur asymptotischen

Standardmethode liefert diese unabhängig von der Größe, Verteilung und Ausgewogenheit der Daten zuverlässige Ergebnisse (DIEHL und STAUFENBIEHL 2002). Als Nullhypothese diente die Behauptung, dass CC und das jeweils betrachtete Gen stochastisch unabhängig seien. Diese statistische Methode fand außerdem Anwendung bei der Gegenüberstellung der vorhandenen Resistenzdeterminanten und der Ergebnisse des Agardiffusionstests sowie beim Vergleich von Resistenzhäufigkeiten.

Bei der Prüfung des Zusammenhangs zwischen CC und Hämolyseverhalten wurde auf das Monte-Carlo-Verfahren als Alternative zur Berechnung der exakten Signifikanz zurückgegriffen. Die Berechnung der exakten Signifikanz war in diesem Fall aufgrund der Rechenintensität des Verfahrens technisch nicht möglich. Im Gegensatz zur exakten Signifikanz, der die exakte Verteilung der Stichprobe zugrunde liegt, wird der Signifikanzwert beim Monte-Carlo-Verfahren aus einer Zufallsauswahl von standardmäßig 10 000 Stichproben aus der Verteilung der Prüfgröße festgelegt und ein 99 %-Konfidenzintervall angenommen (JANSSEN und LAATZ 2007).

In Fällen, in denen 185 (97,9 %) oder mehr der 189 Isolate über ein bestimmtes Gen verfügten, wurde wegen der fehlenden Diskrepanz der Daten auf eine statistische Auswertung verzichtet. Ebenso wenig wurde bei Genen, die bei fünf oder weniger Isolaten detektiert wurden, eine Statistik erhoben.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Bestätigung der Spezieszugehörigkeit**

Mittels Microarray-Technologie wurden in allen 189 Isolaten die *Staphylococcus aureus*-spezifischen Gene der Koagulase (*coA*), der Katalase (*katA*), des Protein A (*spa*), des Fibronectin-bindenden Proteins A (*fnbA*) und der Thernonuklease (*nuc*) detektiert. Das Vorhandensein dieser Markergene bestätigte die Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *Staphylococcus aureus*.

### **4.2 Zuordnung zu CC und agr-Gruppen**

Entsprechend dem MLST-Klassifizierungsschema konnten alle Isolate bestimmten CC zugeordnet werden, wobei elf verschiedene CC auftraten.

98 der 189 Isolate (51,9 %) gehörten dem Komplex CC151 an. 33 Isolate (17,5 %) zählten zu CC479 und 21 Isolate (11,1 %) zu CC133. Insgesamt waren 80,4 % der bei dieser Untersuchung aus Milchproben isolierten *Staphylococcus aureus* diesen drei CC zugehörig.

Die übrigen Isolate wurden CC97 (n=9; 4,8 %), CC398 (n=8; 4,2 %), CC9 (n=5; 2,6 %), CC20 (n=5; 2,6 %), CC45 (n=5; 2,6 %), CC101 (n=3; 1,6 %), CC7 (n=1; 0,5 %) und CC50 (n=1; 0,5 %) zugeordnet.

Das Verteilungsmuster der CC in den einzelnen Beständen wird in Tab. 7 aufgezeigt. Pro Bestand wurden bis zu vier verschiedene CC detektiert. In 18 der 34 Bestände gehörten alle typisierten Isolate den Komplexen CC151, CC479 und CC133 an. In einer einzigen Herde (Bestand 1) wurde keiner dieser drei CC detektiert. Alle in Bestand 1 untersuchten Staphylokokken gehörten dem Komplex CC97 an.

Tab. 7: Verteilung der CC in den 34 teilnehmenden Beständen

Herde	untersuchte Kühe n	Staphylococcus aureus- Prävalenz %	CC												
			CC151	CC479	CC133	CC97	CC398	CC9	CC20	CC45	CC101	CC7	CC50		
1	79	50,00				6									
2	273	18,38	3								3				
3	117	33,33	6												
4	322	9,91	5	1											
5	1156	6,32	4	1				1							
6	645	3,04	1	1	4										
7	1111	6,29	1		3							2			
8	2172	13,22	1	3				2							
9	1482	2,37			3			3							
10	699	2,40		4	2										
11	349	23,21	5		1										
12	75	4,00	1	1											
13	678	0,63	1		1						1				
14	773	8,29	5	1											
15	739	6,04		3					3						
16	125	6,98	6												
17	233	8,23	3	2	1										
18	354	16,80	3	1	2										
19	684	12,27	4	2											
20	714	11,31	6												
21	259	7,88	5		1										
22	1029	3,77	6												
23	194	8,47	3	3											
24	996	0,31		1										1	
25	1738	18,89		2	2					2					
26	749	14,12	1			2		2				1			
27	32	40,00	2								4				
28	863	14,71	4	1				1							
29	74	19,51	5												1
30	410	12,27		6											
31	332	0,84	1			1									
32	380	13,65	5					1							
33	666	4,71	5		1										
34	336	12,12	6												
Σ	20 838		98	33	21	9	8	5	5	5	3	1	1		
$\bar{X}$	528	9,19													

Eine Darstellung der geographischen Verteilung der CC bietet Anhang 5. Dabei wurden die in der vorliegenden Untersuchung häufigen Komplexe CC151, CC479 und CC133 ebenso wie die vergleichsweise sporadisch beobachteten Komplexe CC97, CC9, CC20, CC45, CC101, CC50 und CC7 zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst. Aufgrund seiner Bedeutung im Resistenzgeschehen wurde CC398 einzeln dargestellt.

Alle Isolate, die zu CC7, CC20, CC45, CC97, CC101, CC133 und CC398 zählten, wurden der *agr*-Gruppe I zugeordnet, wohingegen CC9-, CC151- und CC479- Isolate der *agr*-Gruppe II angehörten. Das CC50-Isolat gehörte zur *agr*-Gruppe IV. Es besteht daher eine hochsignifikante Abhängigkeit zwischen CC und *agr*-Gruppe ( $p < 0,01$ ).

### 4.3 Detektion von Pathogenitätsfaktor-Genen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung auf Pathogenitätsfaktor-Gene dargelegt, wobei neben Kapsel-, Hämolyisin-, Exfoliatin- und Leukozidin-Genen auch auf die Gene der Superantigene (Toxic-shock-syndrome-Toxin, Enterotoxine) eingegangen wird. Im Mittelpunkt der Betrachtung steht dabei der Bezug der vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Faktoren zu den verschiedenen CC. Einen Gesamtüberblick über sämtliche erfasste Pathogenitätsfaktorgene in den einzelnen CC bietet Anhang 6.

#### 4.3.1 Detektion von Kapsel-Genen

Polysaccharidkapsel-Gene wurden in sämtlichen untersuchten Isolaten detektiert, wobei Angehörige eines CC über identische Allele verfügten. So besaßen alle CC151-, CC479-, CC133-, CC45-, CC101-, CC7- und CC50-Isolate das den Kapseltyp 8-kodierende Gen *cap8*, während Isolate der Komplexe CC97, CC398, CC9 und CC20 über *cap5* verfügten.

Der Kapseltyp, hier repräsentiert durch die Gene *cap5* sowie *cap8*, und die CC-Zugehörigkeit waren stochastisch abhängig ( $p < 0,01$ ).

#### 4.3.2 Detektion von Hämolyisin-Genen

Das Hämolyisin  $\alpha$ -Gen *hla* war in 185 Isolaten vorhanden. Es fehlte lediglich in zwei CC398-Isolaten sowie in jeweils einem CC479- und CC20-Isolat (Tab 8).

*hlb*, das Hämolyisin  $\beta$ -kodierende Gen, wurde in 170 Isolaten nachgewiesen. Es war in allen Isolaten der Komplexe CC7, CC9, CC20, CC50, CC97, CC101 und CC151 sowie in 28 der 33 CC479- und 20 der 21 CC133-Isolate vorhanden. Dagegen kam es in keinem CC398- und CC45-Isolat vor (Tab. 8).

Die Unterschiede in der Verteilung des Hämolyisin  $\beta$ -Gens in den verschiedenen CC waren hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Das Vorhandensein dieses Gens und die CC-Zugehörigkeit waren daher voneinander abhängig.

*hlgA*, das Gen der S-Komponente HlgA, wurde in 180 Isolaten detektiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung innerhalb der verschiedenen CC ermittelt werden.

*lukF-hlg*, das im verwendeten Array das Gen der F-Komponente HlgB des  $\gamma$ -Hämolysins darstellt, war in 185 Isolaten vorhanden, das HlgC-Gen *lukS-hlg* wurde bei 188 Isolaten nachgewiesen.

Tab. 8 bietet einen Überblick über den Nachweis von Hämolysin-Genen in den untersuchten 189 Isolaten in Abhängigkeit vom CC. Auf die Darstellung des Hämolysin  $\delta$ -Gens *hld*, das in allen Isolaten detektiert wurde, wurde dabei verzichtet.

**Tab. 8:** Vorkommen der Hämolysin-Gene in Abhängigkeit vom CC

CC	n	Hämolysin $\alpha$		Hämolysin, $\beta$		Hämolysin $\gamma$								
		<i>hla</i>		<i>hlb</i>		<i>lukF-hlg</i>			<i>hlgA</i>			<i>lukS-hlg</i>		
		pos	neg	pos	neg	pos	neg	zw	pos	neg	zw	pos	neg	zw
CC151	98	98	0	98	0	98	0	0	92	4	2	98	0	0
CC479	33	32	1	28	5	32	1	0	32	1	0	33	0	0
CC133	21	21	0	20	1	20	0	1	20	1	0	21	0	0
CC97	9	9	0	9	0	7	1	1	9	0	0	9	0	0
CC398	8	6	2	0	8	8	0	0	7	1	0	8	0	0
CC9	5	5	0	5	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
CC20	5	4	1	5	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
CC45	5	5	0	0	5	5	0	0	5	0	0	5	0	0
CC101	3	3	0	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
CC7	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
CC50	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
$\Sigma$	189	185	4	170	19	185	2	2	180	7	2	188	1	0
%	100	97,8	2,2	89,9	10,1	97,8	1,1	1,1	95,2	3,7	1,1	99,5	0,5	0,0

$\alpha$  =  $\alpha$ -Hämololyse;  $\beta$  =  $\beta$ -Hämololyse;  $\alpha + \beta$ :  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämololyse; pos = positives Signal; neg = negatives Signal; zw = Signalintensität zweifelhaft

92,8 % der in dieser Untersuchung häufig aus Milchproben isolierten CC151-, CC479- und CC133-Isolate besaßen alle aufgeführten Hämolysin-Gene. Ein Fehlen dieser Gene wurde am häufigsten bei CC398 beobachtet. Keines der acht CC398-Isolate verfügte über das Gen *hlb*; zusätzlich fehlte *hla* in zwei Isolaten.

#### 4.3.3 Detektion von Genen des Exfoliativen Toxins

In keinem der untersuchten 189 Isolate wurden Exfoliatin-Gene nachgewiesen.

## 4.3.4 Detektion von Enterotoxin-Genen

Insgesamt verfügten 148 (78,3 %) der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Isolate über Enterotoxin-Gene. Dabei dominierten die Gene des *egc*-Clusters (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* und *seu*), die bei 147 Isolaten (77,8 %) detektiert wurden (Tab. 9).

**Tab. 9:** Verteilung der Gene des *egc*-Clusters innerhalb der CC

CC	<i>egc</i> -Cluster		$\Sigma$
	positiv	negativ	
CC151	98	0	98
CC479	33	0	33
CC133	0	21	21
CC97	0	9	9
CC398	0	8	8
CC9	5	0	5
CC20	5	0	5
CC45	5	0	5
CC101	0	3	3
CC7	0	1	1
CC50	1	0	1
$\Sigma$	147	42	189
%	77,8	22,2	100

Alle Angehörigen von CC151 und CC479, die in der vorliegenden Untersuchung am häufigsten aus *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen isoliert wurden, verfügten über die Gene des *egc*-Clusters. Dagegen wurden sämtliche Isolate des dritthäufigsten Komplexes CC133 negativ auf das *egc*-Cluster getestet. *egc*-Cluster-positive Isolate gehörten weiterhin den Komplexen CC9, CC20, CC45 und CC50 an, wobei alle Angehörigen der genannten CC über die Clustergene verfügten (Tab. 10). Mit Ausnahme eines CC151- und eines CC50-Isolates, in denen einzelne Clustergene nicht nachgewiesen wurden (Tab. 10) kamen die Gene des *egc*-Clusters immer gemeinsam vor. Die Verteilung der Clustergene innerhalb der CC ist als hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) zu werten.

Die Gene der „klassischen“ Enterotoxine B und C wurden bei 23 Isolaten (12,2 %) nachgewiesen. Am häufigsten trat hierbei das SEC-kodierende Gen *sec* auf, das bei 23 Isolaten (12,2 %) der Komplexe CC151 und CC45 festgestellt wurde (Tab. 11). Insgesamt verfügten 18,4 % der in der vorliegenden Untersuchung häufigen CC151-Isolate und 100 % der vergleichsweise sporadisch nachgewiesenen CC45-Isolate über das Gen *sec*, wobei in diesen Isolaten gleichzeitig die Gene des *egc*-Clusters detektiert wurden. Im  $\chi^2$ -Test wurde die Nullhypothese signifikant abgelehnt ( $p < 0,01$ ). Das Vorkommen des Gens *sec* und die CC-Zugehörigkeit waren daher voneinander abhängig.

Das Enterotoxin B-Gen *seb* wurde bei vier CC151-Isolaten detektiert, die gleichzeitig das Gen *sec* besaßen. Darüber hinaus wurde *sea-N315*, eine allelische Variante von *sea*, bei lediglich einem CC7-Isolat aus Bestand 24 nachgewiesen.

Die Gene von SED und SEE kamen im Untersuchungsgut nicht vor. Ebenso wenig wurden die Gene *seh*, *sej*, *sek*, *seq* und *ser* nachgewiesen. Lediglich *sel* kam als Angehöriger der „nicht-klassischen“ Enterotoxin-Gene bei 23 Isolaten vor, die identisch mit den *sec*-positiven Isolaten waren. Tab. 10 bietet eine Übersicht über die nachgewiesenen Enterotoxin-Gene sowie ihre Zugehörigkeit und ihr Vorkommen bei den unterschiedlichen CC.

**Tab. 10:** Anzahl, Zugehörigkeit und Vorkommen der detektierten Enterotoxin-Gene

CC	n	Gene der klassischen Enterotoxine			sonstige Enterotoxin-Gene						
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i> *	<i>sei</i> *	<i>sel</i>	<i>sem</i> *	<i>sen</i> *	<i>seo</i> *	<i>seu</i> *
		CC151	98	0	4	18	98	98	18	96	97
CC479	33	0	0	0	33	33	0	33	33	33	33
CC133	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC97	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC398	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC9	5	0	0	0	5	5	0	5	5	5	5
CC20	5	0	0	0	5	5	0	5	5	5	5
CC45	5	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5
CC101	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC50	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
<b>Σ</b>	189	1	4	23	146	147	23	145	146	146	146
<b>%</b>	100	0,5	2,1	12,2	77,2	77,8	12,2	76,7	77,2	77,2	77,2

\* Angehöriger des *egc*-Clusters

#### 4.3.5 Detektion von Genen des Toxic-shock-syndrome-Toxins

*tst-1*, das bei humanen *Staphylococcus aureus*-Isolaten für das Toxic-shock-syndrome-Toxin kodiert, wurde bei einem CC45-Isolat aus Bestand 13 nachgewiesen. Dieses Isolat verfügte gleichzeitig über die Gene *sec*, *sel*, *egc* sowie *sak*. Wesentlich häufiger wurde die allelische Variante *tst-RF122* detektiert. Letztere kam bei 19 CC151-Isolaten vor, von denen 18 gleichzeitig über das Gen *sec* verfügten.

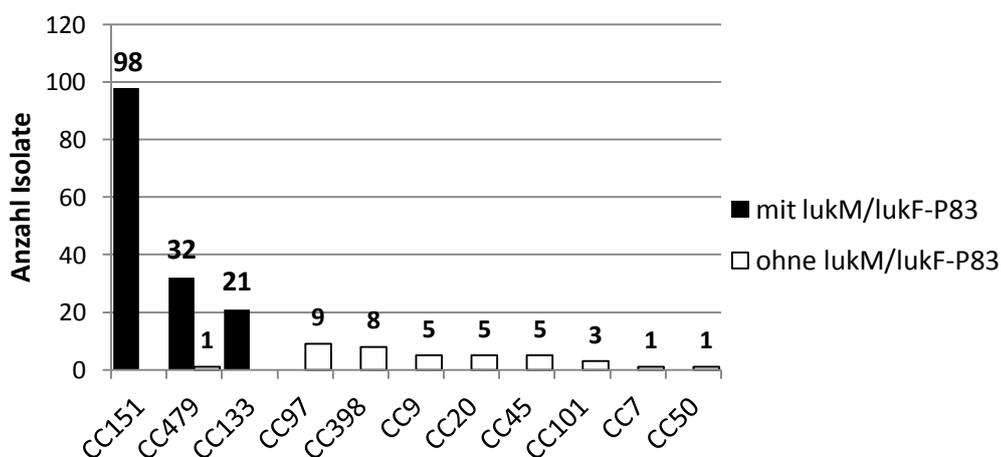
Bei der stochastischen Gegenüberstellung von *tst-RF122* und CC wurde die Unabhängigkeit der Variablen ermittelt.

## 4.3.6 Detektion von Leukozidin-Genen

Die Gene des humanmedizinisch bedeutsamen PVL wurden in keinem der Isolate gefunden. Dagegen wurde in 138 Isolaten die Kombination aus *lukD* und *lukE* nachgewiesen. Mit Ausnahme von neun Isolaten, die nur über eines der beiden Gene verfügten, während für das andere Gen schwache, zweifelhafte oder negative Signale gemessen wurden, kam *lukD/E* in allen CC7-, CC50-, CC97-, CC101-, CC151- und CC479-Isolaten vor. CC20-Isolate verfügten zwar über *lukE*, jedoch nicht über *lukD*, während Angehörige von CC133 *lukD*-positiv waren, aber nur in zwei von 19 Fällen *lukE* besaßen. Keines der beiden Gene wurde in CC398-, CC9- und CC45-Isolaten detektiert.

Sowohl der Zusammenhang zwischen *lukD* bzw. *lukE* und CC als auch der Zusammenhang zwischen der Genkombination *lukD/lukE* und CC waren hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).

In 151 Isolaten (79,9 %) konnte die Kombination aus *lukF-P83* und *lukM* detektiert werden, wobei die Anwesenheit der beiden Gene auf CC133, CC151 und CC479 beschränkt war. Mit Ausnahme eines einzigen CC479-Isolates aus Bestand 24 verfügten alle Angehörigen dieser drei in der vorliegenden Untersuchung dominierenden CC über *lukF-P83/lukM* (Abb. 4). Die Abwesenheit von *lukF-P83/lukM* in besagtem CC479-Isolat wurde dabei durch eine im Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts, Standort Jena, durchgeführte PCR bestätigt.



**Abb. 4:** Zusammenhang zwischen Vorhandensein von *lukF-P83/lukM* und CC

Nach Erstellung einer Kontingenztabelle (Tab. 11) wurde die Unabhängigkeit von CC und *lukF-P83/lukM* geprüft. Die exakte Signifikanz lag mit  $p < 0,01$  deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus. Das Vorkommen von *lukF-P83/lukM* und die CC-Zugehörigkeit waren daher voneinander abhängig.

**Tab. 11:** Verteilung der Kombination aus *lukF-P83* und *lukM* innerhalb der CC

CC	<i>lukF-P83/lukM</i>		$\Sigma$
	positiv	negativ	
CC151	98	0	98
CC479	32	1	33
CC133	21	0	21
CC97	0	9	9
CC398	0	8	8
CC9	0	5	5
CC20	0	5	5
CC45	0	5	5
CC101	0	3	3
CC7	0	1	1
CC50	0	1	1
$\Sigma$	151	38	189
%	79,9	20,1	100

Da die Anwesenheit von *lukF-P83/lukM* ein wesentliches Charakteristikum der in der vorliegenden Untersuchung häufig aus Milchproben isolierten CC151-, CC479- und CC133-Isolate darstellte, wurde die Expression dieser Genkombination überprüft. Bei allen untersuchten 15 *lukF-P83/lukM*-positiven *Staphylococcus aureus* aus dem Untersuchungsgut wurden im Zellüberstand nachweisbare Mengen von LukF-P83/LukM gemessen (Anhang 7). Die untersuchten CC133-Isolate produzierten dabei mehr Leukozidin als die CC151- und CC479-Isolate.

#### 4.3.7 Detektion von Genen extrazellulärer Enzyme

Das Staphylokinase-Gen *sak* kam in allen CC101-Isolaten (n=3) vor. Darüber hinaus wurde es jeweils in einem CC7- (Bestand 24), CC9- (Bestand 15) und CC45-Isolat (Bestand 13) detektiert, so dass dieses Gen insgesamt sechsmal nachgewiesen wurde.

Bei der Testung auf Unabhängigkeit zwischen *sak* und CC wurde eine exakte Signifikanz von  $p < 0,01$  ermittelt, so dass die Hypothese der Unabhängigkeit verworfen und die Abhängigkeit der beiden Variablen angenommen wurde.

#### 4.4 Detektion von Resistenzdeterminanten

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den detektierten Resistenzgenen dargelegt, wobei auch bei diesen Betrachtungen der Bezug zur CC-Zugehörigkeit im Vordergrund steht.

##### 4.4.1 Detektion des $\beta$ -Laktamase-Gens *blaZ*

Das Penicillin-Resistenz vermittelnde  $\beta$ -Laktamase-Gen *blaZ* wurde in 21 (11,1 %) der untersuchten 189 Staphylokokken nachgewiesen, wobei die Komplexe CC151, CC398, CC9, CC20, CC45 und CC7 (Tab. 12) und die Bestände 2, 5, 8, 9, 13, 12, 15, 24, 25, 26, 28 und 32 betroffen waren. In all diesen Beständen konnten neben *blaZ*-positiven Staphylokokken auch *blaZ*-negative Isolate detektiert werden. Nur ein einziges (CC151-) Isolat (0,7 %) der drei in der vorliegenden Untersuchung dominierenden CC war *blaZ*-positiv, während 54,1 % der Isolate der verbleibenden, sporadisch nachgewiesenen CC über *blaZ* verfügten.

**Tab. 12:** Vorkommen des  $\beta$ -Laktamase-Gens *blaZ* innerhalb der verschiedenen CC

CC	<i>blaZ</i>		$\Sigma$
	positiv	negativ	
<b>CC151</b>	1	97	98
<b>CC479</b>	0	33	33
<b>CC133</b>	0	21	21
<b>CC97</b>	0	9	9
<b>CC398</b>	8	0	8
<b>CC9</b>	5	0	5
<b>CC20</b>	5	0	5
<b>CC45</b>	1	4	5
<b>CC101</b>	0	3	3
<b>CC7</b>	1	0	1
<b>CC50</b>	0	1	1
$\Sigma$	21	168	189
%	11,1	88,9	100

Die Gegenüberstellung von CC und *blaZ* lieferte eine exakte Signifikanz von  $p < 0,01$ . Die Anwesenheit des Gens war daher abhängig vom CC.

##### 4.4.2 Detektion des Gens *mecA*

Das Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA* war bei vier (2,1 %) der untersuchten 189 Staphylokokken vorhanden, wobei diese *Staphylococcus aureus* in vier unterschiedlichen Herden isoliert worden waren (Bestand 5, 8, 28 und 32). Alle *mecA*-positiven Isolate gehörten zu CC398 und besaßen sowohl *blaZ* als auch *tetK*, das Gen einer Tetrazyklin-Effluxpumpe. *tetM*, ein weiteres Tetrazyklin-Resistenzgen, war bei drei der vier Isolate vorhanden. Darüber hinaus wurde in jeweils

einem *mecA*-positiven Isolat *vgaA*, ein Streptogramin-Resistenz-vermittelndes Gen, und *aacA-aphD*, das Aminoglykosid- (insbesondere Gentamicin-)Resistenz vermittelt, detektiert.

#### 4.4.3 Detektion weiterer Resistenzdeterminanten

In den untersuchten Isolaten kamen neben *blaZ* und *mecA* sowie den nur bei *mecA*-positiven Isolaten auftretenden Genen (*vgaA*, *aacA-aphD*) insgesamt noch sechs weitere Resistenzdeterminanten vor, deren Auftreten und Häufigkeit in Tab. 13 aufgeführt sind.

**Tab. 13:** Auftreten und Häufigkeit von Resistenzdeterminanten in den verschiedenen CC

CC	n	Tetrazykline				Fosfomycin/ Bleomycin		Chloramphenicol				MLS	
		<i>tetK</i>		<i>tetM</i>		<i>fosB</i>		<i>fexA</i>		<i>cat</i>		<i>msrA</i>	
		pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
CC151	98	0	98	0	98	3	95	0	98	1	97	1	97
CC479	33	0	33	0	33	2	31	2	31	0	33	0	33
CC133	21	0	21	0	21	20	1	3	18	0	21	0	21
CC97	9	0	9	0	9	2	7	0	9	0	9	0	9
CC398	8	3	5	7	1	0	8	3	5	0	8	0	8
CC9	5	0	5	0	5	5	0	0	5	0	5	0	5
CC20	5	0	5	0	5	5	0	0	5	0	5	0	5
CC45	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
CC101	3	0	3	0	3	3	0	0	3	0	3	0	3
CC7	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CC50	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Σ	189	3	186	7	182	40	149	8	181	1	188	1	188
%	100	1,6	98,4	3,7	96,3	21,2	78,8	4,2	95,8	0,5	99,5	0,5	99,5

pos = positiv; neg = negativ; MLS = Makrolide/Lincosamide/Streptogramine

Die beiden Gene *tetM* und *tetK* traten ausschließlich bei CC398-Isolaten auf, wobei sowohl *mecA*-positive als auch *mecA*-negative Isolate betroffen waren. Beide Variablen waren vom CC abhängig ( $p = 0,01$  bzw.  $p < 0,01$ ).

Bei 21,2 % aller untersuchten Staphylokokken kam die Fosfomycin/Bleomycin-Resistenz-vermittelnde Determinante *fosB* vor. Innerhalb der in der vorliegenden Arbeit dominierenden CC wurde sie vereinzelt bei CC151- und CC479-Isolaten detektiert; dagegen trat sie bei 20 (95,2 %) der 21 CC133-Isolate auf. Weiterhin war sie bei allen Angehörigen von CC9, CC20 und CC101 sowie bei zwei der neun (22,2 %) CC97-Isolate vorhanden. Der Zusammenhang zwischen CC und *fosB* war hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Das Chloramphenicol-Resistenz-vermittelnde *fexA* wurde in acht Isolaten (4,2 %) nachgewiesen, die zu CC479, CC133 und CC398 gehörten. Die Gegenüberstellung von CC und *fexA* ergab die Abhängigkeit der Variablen ( $p < 0,05$ ). Die zweite Chloramphenicol-Resistenzdeterminante *cat* wurde ebenso wie das Makrolid/Lincosamid/Streptogramin-Resistenz vermittelnde *msrA* lediglich in einem CC151-Isolat gefunden. Keine der übrigen mittels Microarray

detektierbaren Resistenzdeterminanten (*ermA–C*, *mefA*, *vatA*, *vatB*, *vgb*, *dfrA*, *cfr*, *vanA*, *vanB*, *vanZ*, *far*) wurde detektiert. In 135 (71,4 %) der 189 Isolate wurde keine einzige Resistenzdeterminante nachgewiesen.

#### 4.5 Erfassung des Phänotyps

Alle betrachteten Kulturen waren flach und von glatt-glänzender Oberfläche. Die Einzelkolonien waren nach einer Bebrütungszeit von 24 h ca. 2 mm groß und scharf begrenzt. Hämolyseverhalten und Pigmentierung der untersuchten Isolate variierten.

In Tab. 14 sind die Phänotypen der 189 untersuchten Isolate entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen CC aufgelistet. Die Angaben zum Hämolyseverhalten und der beobachteten Hämolysezone nach SKALKA (1979) stimmten dabei für beide herangezogene Nährmedien (Äskulin-Agar ESC SB und Columbia-Agar COL SB+) überein. Die in der Tab. 14 angegebenen Daten zur Pigmentierung wurden auf Äskulin-Agar erhoben. Kulturen auf Columbia-Agar waren grundsätzlich etwas weniger stark pigmentiert, verhielten sich aber untereinander identisch zu den auf Äskulin-Agar gewachsenen. So waren Kolonien, die auf Äskulin-Agar „maisgelb“ beurteilt wurden, auf Columbia-Agar von einem „hellen maisgelb“. Auf Äskulin-Agar „hellgelbe“ Kulturen wurden auf Columbia-Agar mit „eierschalenfarben“ angesprochen und auf Äskulin-Agar „eierschalenfarbene“ Kolonien waren auf Columbia-Agar „cremeweiß“.

**Tab. 14:** Phänotyp der 189 Isolate in Abhängigkeit vom CC

CC	n	Hämolyseverhalten			Hämolysezone nach Skalka			Pigmentierung		
		vH	uH	dzH	$\alpha$	$\beta$	$\alpha + \beta$	mg	hg	ei
<b>CC151</b>	98	0	3	95	0	3	95	97	1	0
<b>CC479</b>	33	0	2	31	0	2	31	33	0	0
<b>CC133</b>	21	21	0	0	21	0	0	0	21	0
<b>CC97</b>	9	0	0	9	0	0	9	0	9	0
<b>CC398</b>	8	0	0	8	0	0	8	0	0	8
<b>CC9</b>	5	1	0	4	1	0	4	4	1	0
<b>CC20</b>	5	5	0	0	5	0	0	3	0	2
<b>CC45</b>	5	0	0	5	0	0	5	0	5	0
<b>CC101</b>	3	3	0	0	3	0	0	0	3	0
<b>CC7</b>	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
<b>CC50</b>	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<b><math>\Sigma</math></b>	189	31	5	153	31	5	153	137	42	10
<b>%</b>	100	16,4	2,6	81,0	16,4	2,6	81,0	72,5	22,2	5,3

vH: vollständige Hämolyse; uH: unvollständige Hämolyse, dzH: doppelzonige Hämolyse;  $\alpha$ :  $\alpha$ -Hämolyse,  $\beta$ :  $\beta$ -Hämolyse; mg: maisgelb; hg: hellgelb; ei: eierschalenfarben

Sämtliche untersuchten Isolate waren hämolsierend. Der überwiegende Teil der betrachteten Staphylokokken (81,0 %) verfügte über eine doppelzonige Hämolyse, die sich aus einer vollständigen Hämolyse in unmittelbarer Umgebung des Impfstrichs und einer sich daran anschließenden Zone unvollständiger Hämolyse ergab. Unter Anwendung des von SKALKA et al. (1979) entwickelten Verfahrens wurden diese Zonen als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysezone identifiziert. 31 Isolate (16,4 %) wiesen eine Zone vollständiger Hämolyse unterschiedlichen Ausmaßes auf, die sich nach der Methode von SKALKA et al. (1979) als  $\alpha$ -Hämolyse herausstellte. Eine Zone unvollständiger Hämolyse ohne benachbarte vollständige Hämolyse wurde bei fünf Isolaten festgestellt. Nach Durchführung der von SKALKA et al. (1979) ermittelten Methode wurden diese unvollständigen Hämolysezonen als  $\beta$ -Hämolyse angesprochen. Eine  $\delta$ -Hämolysezone wurde bei keinem der untersuchten Isolate festgestellt.

Angehörige desselben CC verfügten in den durchgeführten Untersuchungen im Wesentlichen über identische phänotypische Merkmale (Tab. 14). Eine alleinige  $\alpha$ -Hämolyse trat bei sämtlichen Angehörigen von CC133, CC20, CC101 und CC7 auf. Mit Ausnahme eines Isolates waren die Hämolysezonen bei allen CC133-Staphylokokken mindestens 2 mm breit. Die Hämolysezonen der CC20- und der CC101-Isolate waren von unterschiedlichem Ausmaß, das CC50-Isolat verfügte über eine 1 mm breite Zone vollständiger Hämolyse. Fünf Isolate, die zu CC151 sowie CC479 gehörten, zeigten eine alleinige  $\beta$ -Hämolyse. Bei allen übrigen Isolaten wurde eine doppelzonige Hämolyse beobachtet.

Die Pigmentierung der untersuchten Kulturen variierte von „eierschalenfarben“ bis „maisgelb“, „reinweiße“ Kulturen wurden nicht beobachtet. Während CC398-Isolate grundsätzlich „eierschalenfarben“ waren, wurden alle Angehörigen von CC133, CC97, CC45, CC101, CC7 und CC50 als „hellgelb“ beurteilt. Bei den übrigen Isolaten dominierte eine „maisgelbe“ Pigmentierung.

Zur Beschreibung des Zusammenhang zwischen CC und Hämolyseverhalten wurde das Monte-Carlo-Verfahren angewandt, bei dem eine Signifikanz von  $p < 0,01$  und damit die Abhängigkeit der beiden Variablen ermittelt wurde. Bei der Testung auf Unabhängigkeit zwischen CC und Pigmentierung wurde eine exakte Signifikanz von  $p < 0,01$  eruiert, so dass auch hier die Hypothese der Unabhängigkeit verworfen wurde.

In der vorliegenden Untersuchung waren 130 (68,8 %) der charakterisierten 189 Isolate maisgelb und verfügten über eine doppelzonige Hämolyse. 126 (96,9 %) dieser 130 Isolate gehörten dabei zu CC151 und CC479. Andererseits gehörten 21 (80,8 %) der 26 „hellgelben“ Isolate mit vollständiger Hämolyse zu CC133. Alle acht „eierschalenfarbenen“ Isolate mit doppelzoniger Hämolyse waren Angehörige von CC398.

#### 4.6 Zusammenführung von Ergebnissen der Phänotypisierung und der Genotypisierung

Um abzuwägen, ob die verschiedenen beobachteten Phänotypen aus einer unterschiedlichen Ausstattung mit Hämolsin-Genen resultierten, wurde der Faktor „Hämolysezone“ den vorhandenen Hämolsin-Genen gegenübergestellt (Tab. 15). Da das Hämolsin  $\gamma$  durch Agar gehemmt wird (BLOBEL und SCHLIESSER 1994), entfällt die Gegenüberstellung von Hämolsin-Genen und

$\gamma$ -Hämolyszone. Auf die Darstellung des Hämolysin  $\delta$ -Gens, das bei allen untersuchten Staphylokokken vorhanden war, wurde verzichtet.

**Tab. 15:** Gegenüberstellung von Hämolysverhalten und Hämolysin-Genen

Hämolys- zone nach SKALKA (1979)	n	Hämolysin $\alpha$ <i>hla</i>		Hämolysin $\beta$ <i>hlb</i>		Hämolysin $\gamma$								
						<i>lukF</i>			<i>hlgA</i>			<i>lukS</i>		
		pos	neg	pos	neg	pos	neg	zw	pos	neg	zw	pos	neg	zw
$\alpha$	31	30	1	30	1	30	0	1	27	3	1	30	1	0
$\beta$	5	5	0	5	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
$\alpha + \beta$	153	150	3	135	18	150	2	1	148	4	1	153	0	0
$\Sigma$	189	185	4	170	19	185	2	2	180	7	2	188	1	0
%	100	97,8	2,2	89,9	10,1	97,8	1,1	1,1	95,2	3,7	1,1	99,5	0,5	0,0

$\alpha$  =  $\alpha$ -Hämolys;  $\beta$  =  $\beta$ -Hämolys;  $\alpha + \beta$ :  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolys; pos = positives Signal; neg = negatives Signal; zw = Signalintensität zweifelhaft

Sämtliche Ausprägungen der phänotypisch erfassten Faktoren kamen in Anwesenheit aller Hämolysin-Gene vor. Gleichzeitig resultierten aus der Abwesenheit der Hämolysin-Gene keine bestimmten Phänotypen. Es konnte keine Abhängigkeit der Variablen ermittelt werden.

#### 4.7 Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest

Einen Überblick über das im Agardiffusionstest ermittelte Resistenzverhalten der getesteten 189 Isolate bietet Tab. 16. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurde bei den einzelnen CC auf die Darstellung der intermediär getesteten Isolate verzichtet.

Bei 132 (69,84 %) der 189 Isolate konnten unter Anwendung des Agardiffusionstests keine Resistenzen oder intermediäre Empfindlichkeiten gegenüber den getesteten Substanzen festgestellt werden.

21 Isolate (11,1 %) zeigten eine Resistenz gegenüber Penicillin. Bei 15 dieser 21 Isolate war gleichzeitig eine Resistenz gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure ausgeprägt.

Resistenzen gegenüber Oxacillin, die einen Hinweis auf Methicillin-resistente Isolate dargestellt hätten, wurden im Agardiffusionstest nicht beobachtet.

Cephalosporin-Resistenzen waren selten. 184 Isolate wurden gegenüber allen getesteten Cephalosporinen als sensibel beurteilt. Einzelne Resistenzen bzw. intermediäre Empfindlichkeiten wurden gegenüber Cefacetril, Cefalexin, Cefazolin und Cefoperazon ermittelt, während alle Isolate sensibel gegenüber Cefapirin und Cefquinom waren.

Bei den getesteten Aminoglykosiden und Fluorchinolonen wurden ebenso wie beim Makrolidantibiotikum Erythromycin nur vereinzelt Resistenzen festgestellt. Hingegen wurden elf

Isolate resistent und 15 Isolate intermediär auf das zweite Makrolidantibiotikum Tylosin getestet. Nahezu so viele Resistenzen wurden auch bei Trimethoprim und Tetracyclin verzeichnet, während über 97 % der Isolate sensibel auf Pirlimycin und die Antibiotikakombinationen Penicillin/Streptomycin/Nafcillin sowie Cefalexin/Kanamycin getestet wurden.

Beim Vergleich des Resistenzverhaltens der verschiedenen CC fällt auf, dass Angehörige von CC398 im Agardiffusionstest wesentlich häufiger Resistenzen aufwiesen als Angehörige der übrigen CC. Alle acht CC398-Isolate wurden resistent gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Penicillin und Tetracyclin getestet; darüber hinaus wurden Resistenzen und intermediäre Empfindlichkeiten gegenüber allen übrigen getesteten Antibiotika bzw. Antibiotikakombinationen – mit Ausnahme von Oxacillin, Cefapirin, Cefquinom und Cefalexin/Kanamycin – beobachtet.

Andere CC verfügten nur vereinzelt über Resistenzen. Auffällig war hierbei vor allem das stammspezifische Verhalten gegenüber Penicillin. Während alle Angehörigen von CC9, CC20 und CC7 als Penicillin-resistent beurteilt wurden, waren alle CC479, CC133-, CC97-, CC101- und CC50-Isolate Penicillin-sensibel. Dieser Zusammenhang wurde als hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) beurteilt.

**Tab. 16:** Mittels Agardiffusionstest ermitteltes Resistenzverhalten der getesteten 189 Isolate in Abhängigkeit vom CC (Amox/Clav = Amoxicillin/Clavulansäure; Pen/Str/N = Penicillin/Streptomycin/Nafcillin)

CC	n		Amoxi/Clav	Ampicillin/ Cloxacillin	Cloxacillin	Oxacillin	Penicillin	Cefacetil	Cefalexin	Cefazolin	Cefapirin	Cefoper- azon	Cefquinom	Gentamicin	Neomycin	Dano- floxacin	Enro- floxacin	Marbo- floxacin	Erythro- mycin	Tylosin	Pirlimycin	Trimetho- prim	Tetracyclin	Lincomycin/ Neomycin	Pen/Str/N	Cefalexin/ Kanamycin
CC151	98	R	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0
		S	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	97	97	98	98	98	86	98	96	91	95	98
CC479	33	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
		S	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	32	32	32	32	33	33	33	32	33	28	32	32	33
CC133	21	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		S	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	19	21	21	19	20	21
CC97	9	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
		S	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	6	9	8	9
CC398	8	R	8	1	1	0	8	2	1	1	0	0	0	1	2	2	2	2	1	4	1	7	8	1	1	0
		S	0	7	7	8	0	4	3	6	8	7	8	6	6	6	6	6	6	7	2	7	1	0	4	4
CC9	5	R	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		S	0	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4	5	3	4	4	5
CC20	5	R	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	4	5	5
CC45	5	R	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		S	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5
CC101	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3
CC7	1	R	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CC50	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Σ	189	R	15	1	1	0	21	2	1	1	0	0	0	1	4	2	2	2	1	11	1	10	9	1	1	0
		I	0	0	0	0	0	2	4	1	0	1	0	3	0	2	1	0	1	15	0	11	11	10	3	0
		S	174	188	188	189	168	185	184	187	189	188	189	185	185	185	186	187	187	187	163	188	168	169	178	185

#### 4.8 Zusammenführung von Ergebnissen zur Antibiotikaresistenz

Im durchgeführten Agardiffusionstest wurde das Resistenzverhalten gegenüber Antibiotika getestet, die zum Zeitpunkt der Untersuchungen in Deutschland als für das Rind zugelassenes Arzneimittel im Handel waren, wohingegen die verwendeten DNA-Microarrays für den Einsatz in der Humanmedizin entwickelt wurden. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse des Agardiffusionstests und der Genotypisierung beschränkt sich daher auf neun verschiedene Wirkstoffe, die in Tab. 17 mit den entsprechenden Resistenzdeterminanten in Zusammenhang gebracht werden. Die Berechnung der exakten Signifikanz erfolgte bei Variablenpaaren, bei denen beide Variablen in zumindest zwei Ausprägungen (positiv/negativ bzw. resistent/intermediär/sensibel) auftraten.

Alle 21 *blaZ*-positiven Isolate wurden im Agardiffusionstest als Penicillin-resistent beurteilt, während alle *blaZ*-negativen Staphylokokken im Agardiffusionstest Penicillin-sensibel waren. Die exakte Signifikanz wurde mit  $p < 0,01$  angegeben.

Das *mecA*-Gen wurde bei vier CC398-Isolaten detektiert, obwohl kein Isolat resistent gegenüber Oxacillin getestet wurde. Zwar wurden bei diesen vier Isolaten Resistenzen und intermediäre Empfindlichkeiten gegenüber anderen penicillinasefesten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika beobachtet, jedoch traten diese nicht signifikant häufiger auf ( $p > 0,05$ ) als bei *mecA*-negativen CC398-Isolaten (Anhang 8 und Anhang 9). Unter Anwendung der Bouillon-Mikrodilution wurde bei allen vier Isolaten eine Oxacillin-Resistenz ermittelt (Anhang 10).

Das Aminoglykosid-Resistenzgen *aacA-aphD* war in einem Isolat vorhanden, das im Agardiffusionstest als resistent gegenüber beiden getesteten Aminoglykosid-Antibiotika getestet wurde. Bei drei weiteren Isolaten, die resistent gegenüber Neomycin waren, fehlte dieses Gen. Der überwiegende Teil (97,9 %) der Staphylokokken verfügte jedoch nicht über *aacA-aphD* und wurde als sensibel gegenüber beiden Substanzen bewertet.

Resistenzen gegenüber den getesteten Makroliden und Pirlimycin traten zwar auf, jedoch konnte nur bei einem Isolat eine entsprechende Resistenzdeterminante (*msrA*) detektiert werden. Dieses *msrA*-positive Isolat wies im Agardiffusionstest keinerlei Resistenzen auf.

21 Isolate wurden zwar als nicht-sensibel gegenüber Trimethoprim getestet, ein Nachweis von *dfrA* blieb jedoch aus.

Das Tetrazyklin-Resistenzgen *tetM* trat – teils in Kombination mit *tetK* – bei sieben der acht CC398-Isolate auf. Diese sieben Isolate wurden im Agardiffusionstest als resistent gegenüber Tetrazyklin bewertet. Bei einem weiteren CC398- sowie einem CC479-Isolat, die im Agardiffusionstest ebenfalls resistent gegenüber Tetrazyklin waren, wurde keine der beiden Resistenzdeterminanten festgestellt. Die exakte Signifikanz wurde mit  $p < 0,01$  angegeben.

**Tab. 17:** Gegenüberstellung der Ergebnisse des Agardiffusionstests und der detektierten Resistenzdeterminanten

Antibiotikum	Gen	Ergebnis Genotypisierung	Verhalten des Antibiotikums im Agardiffusionstest			Exakte Signifikanz p
			R	I	S	
Penicillin	<i>blaZ</i>	positiv	21	-	-	< 0,01
		negativ	-	-	168	
Oxacillin	<i>mecA</i>	positiv	-	-	4	entfällt
		negativ	-	-	185	
Gentamicin	<i>aacA-aphD</i>	positiv	1	-	-	< 0,01
		negativ	-	3	185	
Neomycin	<i>aacA-aphD</i>	positiv	1	-	-	< 0,05
		negativ	3	-	185	
Erythromycin	<i>msrA</i>	positiv	-	-	1	> 0,05
		negativ	1	1	186	
Tylosin	<i>msrA</i>	positiv	-	-	1	> 0,05
		negativ	11	15	162	
Pirlimycin	<i>msrA</i>	positiv	-	-	1	> 0,05
		negativ	1	0	187	
Erythromycin	<i>mefA</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	1	1	186	
Tylosin	<i>mefA</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	11	15	162	
Pirlimycin	<i>mefA</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	1	0	188	
Erythromycin	<i>ermA-ermC</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	1	1	186	
Tylosin	<i>ermA-ermC</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	11	15	162	
Pirlimycin	<i>ermA-ermC</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	1	0	188	
Trimethoprim	<i>dfrA</i>	positiv	-	-	-	entfällt
		negativ	10	11	168	
Tetrazyklin	<i>tetK</i>	positiv	3	-	-	< 0,01
		negativ	6	11	169	
	<i>tetM</i>	positiv	7	-	-	< 0,01
		negativ	2	11	169	

## **5 Diskussion**

### 5.1 Klassifizierung der 189 *Staphylococcus aureus*-Isolate

Der vorliegenden Studie zur weiterführenden Charakterisierung boviner *Staphylococcus aureus*-Isolate mittels Microarray-Technologie ging die Untersuchung von 81 567 Viertelgemelksproben voraus, von denen 1902 Proben als *Staphylococcus aureus*-positiv beurteilt wurden. Die Aussage zur Zugehörigkeit der angezüchteten Kulturen zur Spezies *Staphylococcus aureus* wurde dabei aufgrund phänotypischer Eigenschaften und der Ergebnisse einfacher biochemischer Reaktionen getroffen, wobei die verwendeten Methoden nur eine Unterscheidung zwischen Koagulase-positiven und Koagulase-negativen Staphylokokken zulassen. Im Rahmen der Routinediagnostik wird diese Differenzierung jedoch als hinreichend genau angesehen, weil *Staphylococcus aureus* wesentlich häufiger in Mastitismilch nachgewiesen wird als andere Koagulase-positive Staphylokokken (ROBERSON et al. 1992). Alle 189 als *Staphylococcus aureus* angesprochenen und für weiterführende Untersuchungen ausgewählten Isolate wurden mittels Microarray-Technologie in ihrer Spezieszugehörigkeit bestätigt. Dies unterstreicht die geringe Bedeutung anderer Koagulase-positiver Staphylokokken im bovinen Mastitisgeschehen.

Alle 189 Isolate konnten bekannten CC zugeordnet werden, wobei drei CC (CC151, CC479 und CC133) deutlich häufiger detektiert wurden als die übrigen vorkommenden Komplexe. In 18 der 34 teilnehmenden Bestände wurden nur diese drei CC nachgewiesen, während lediglich in einer Herde (Bestand 1) keiner dieser CC vorkam. Anhang 5 zeigt, dass diese 18 Bestände gleichmäßig über ganz Thüringen verteilt waren und das Vorkommen der drei dominierenden CC daher nicht auf bestimmte Regionen des Freistaats begrenzt war. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Studien, in denen wenige CC für den Großteil der bovinen *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen verantwortlich gemacht wurden. In einer von SMITH et al. (2005b) durchgeführten Untersuchung von 259 *Staphylococcus aureus*-Isolaten aus den USA, Großbritannien und Chile dominierte CC97 deutlich. Am zweithäufigsten in dieser Studie wurde CC151 nachgewiesen, der vor allem in Großbritannien detektiert wurde und innerhalb dieses Landes häufiger vorkam als CC97. SUNG et al. (2008) ordneten die Mehrzahl der von ihnen in Großbritannien untersuchten bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolate CC97, CC133 und CC151 zu, während sie andere CC nur sporadisch nachwiesen. HASMAN et al. (2010) konnten den Großteil ihrer 101 bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolate CC50, CC97 und CC151 zuordnen. Auch Autoren, die mit anderen Klassifizierungsschemata als der MLST-Klassifizierung arbeiteten und Studien in den USA, Norwegen und der Schweiz durchführten, berichteten von der Dominanz einiger weniger Genotypen bei bovinen Mastitiden (KAPUR et al. 1995, MØRK et al. 2005, FOURNIER et al. 2008).

Die in den aufgeführten Studien erfassten Komplexe CC151 und CC133 wurden in der Untersuchung häufig detektiert. Dagegen trat der vielfach genannte CC97 nur in einem der teilnehmenden 34 Herden (Bestand 1) auf, wobei ihm alle sechs typisierten Isolate angehörten.

Von den drei in der vorliegenden Untersuchung dominierenden CC gelten CC151, der nach neueren Erkenntnissen zum Ursprung des Komplexes auch als CC705 bezeichnet wird (WOLF et al. 2011), und CC479 als auf das Rind beschränkt (HERRON-OLSON et al. 2007, SUNG et al. 2008, HATA et al. 2010b,

VAN DEN BORNE et al. 2010). CC133 kommt darüber hinaus in Milchproben von Schafen und Ziegen vor (JOKIEL 2009, SMYTH et al. 2009, GUINANE et al. 2010). Das Wirtsspektrum der übrigen detektierten CC ist dagegen nicht auf Rinder bzw. Wiederkäuer begrenzt. So wurden CC7, CC9, CC20, CC45 und CC101 bisher vor allem aus dem Menschen isoliert (McCARTHY und LINDSAY 2010), darüber hinaus sind sie aber bei einer Vielzahl von Haus- und Nutztieren beschrieben (MONECKE et al. 2007a, HASMAN et al. 2010, MONECKE et al. 2011a). Ebenso kann CC50 sowohl aus humanen als auch aus tierischen Quellen isoliert werden (CONCEICAO et al. 2009, VAN DEN BORNE et al. 2010). CC398 kommt vor allem in Schweinehaltungen und Geflügelbetrieben große Bedeutung zu, wo er vereinzelt sogar aus der Abluft isoliert werden konnte (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11). Darüber hinaus kann er aber auch bei anderen Nutztieren, Pferden, Hunden und beim Mensch nachgewiesen werden (KADLEC et al. 2009, MONECKE et al. 2011a). Methicillin-resistente Stämme dieses CC bilden die Gruppe der laMRSA, die beim Tier keine Symptome hervorrufen, jedoch im Menschen Erkrankungen hervorrufen können (SCHWARZ et al. 2008). Tatsächlich sind aber nur vereinzelt laMRSA-Erkrankungen beim Menschen beschrieben (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11).

Der häufig in bovinen Milchproben detektierte CC97 tritt neben Rindern unter anderem in Menschen und Schweinen auf (SUNG et al. 2008, Monecke et al. 2011a). HATA et al. (2010b) wiesen CC97 in einem japanischen Milchviehbestand an den Pfoten von Stallkatzen, den Flotzmäulern von Färsen, der Einstreu von Milchrindern, der Melkmaschine und an Melkerhänden nach. Die Autoren verglichen *Staphylococcus aureus*-Isolate aus der Milch der Kühe dieses Bestandes mit den Isolat, die in der Umgebung der Tiere gefunden wurden und konnten aus beiden Quellen identische CC97-Staphylokokken gewinnen. Ebenfalls in dieser Studie detektierte CC151-Isolate waren dagegen auf die Kuhmilch beschränkt. Die Studie von HATA et al. (2010b) zeigt, dass bei der *Staphylococcus aureus*-Sanierung auch andere Erregerreservoirs als das infizierte Kuheuter in Betracht gezogen werden müssen. Diese Aussage wird von weiteren Autoren vertreten, die *Staphylococcus aureus* nicht als rein kontagiösen Mastitiserreger betrachten (MATOS et al. 1991, ROBERSON et al. 1998, ZADOKS et al. 2000, SMITH et al. 2005b, CAPURRO et al. 2010). Die Studie von HATA et al. (2010b) zeigt darüber hinaus, dass epidemiologische Unterschiede zwischen verschiedenen im Rind vorkommenden CC existieren. Diese epidemiologischen Unterschiede werden auch in der vorliegenden Untersuchung deutlich. Während CC151, CC479 und CC133, die zusammen 80,4 % der typisierten *Staphylococcus aureus* bildeten, als auf das Rind bzw. den Wiederkäuer beschränkt gelten, kommen alle anderen isolierten CC auch in anderen Wirten vor. Es lagen daher zwei epidemiologisch unterschiedliche Varianten von *Staphylococcus aureus* vor. Wegen der Wirtsspezifität der drei dominierenden CC können Nicht-Wiederkäuer in der Umgebung der Tiere (z.B. Melker, Hofhunde, Stallkatzen) eventuell gar nicht als Reservoir für diese *Staphylococcus aureus* fungieren. Einziges Erregerreservoir wäre in diesem Fall das infizierte Kuheuter und diese CC könnten daher als „euterassoziiert“ betrachtet werden. Dagegen zeigen die anderen in dieser Studie detektierten CC Eigenschaften „umweltassoziierter“ Keime. So weisen sie eine hohe genetische Variabilität auf und können auch in der Umgebung der Tiere nachgewiesen werden. Literaturangaben zu Reservoirs, Charakteristika und Übertragungswegen euter- und umweltassoziierter Mastitiserreger sind in Tab. 18 zusammengefasst.

**Tab. 18:** Reservoir, Charakteristika und Übertragungswege euter- und umweltassoziiertes Keime

	Mastitiserreger		Referenz
	euterassoziiert	umweltassoziiert	
<b>Reservoir</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- infiziertes Milchdrüsengewebe</li> <li>- Zitzenverletzungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Umwelt (Kot, Einstreu, Futter)</li> <li>- äußere Haut, Vagina, Darm</li> </ul>	GRANZ (2005)  TOLLE et al. (1977)
<b>Charakteristika</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kaum Überleben bzw. Vermehren außerhalb der Milchdrüse</li> <li>- kontagiöses Verhalten bei geringer Variabilität der Stämme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringe Prävalenz bei hoher Variabilität der Stämme</li> </ul>	STRIEZEL (2005)  HOEDEMAKER et al. (2007)
<b>Übertragungswege</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- beim Melken (Melkerhände, Zitzengummis, Milch, Fliegen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- jederzeit</li> <li>- im Liegebereich</li> <li>- in unhygienischen Melkständen durch Spritzwasser</li> </ul>	GRANZ (2005)

Sowohl kleine Bestände mit weniger als 100 Kühen als auch Bestände mit mehr als 300 Kühen verfügten über beide „epidemiologischen Varianten“. Weiterhin ließ die Betriebsgröße keinen Rückschluss auf die Anzahl der unterschiedlichen nachgewiesenen CC zu. So konnte sowohl in Bestand 1 mit 79 Kühen als auch in Bestand 22 mit 1029 Kühen beobachtet werden, dass alle charakterisierten Staphylokokken zum selben CC gehörten. Das verwendete Verfahren zur Auswahl von Isolaten für die weiterführende Charakterisierung legt nahe, dass die Dominanz eines einzigen CC sich hierbei nicht auf die untersuchten sechs Isolate beschränkt, sondern auch innerhalb der gesamten Herde fortbesteht. Einem innerhalb der Herde dominierenden CC muss es aufgrund unbekannter Faktoren oder aufgrund eines mangelnden Vorliegens anderer CC bzw. einer Kombination aus Beidem gelungen sein, sich im Bestand durchzusetzen. Andererseits kann ein gleichzeitiges Vorliegen mehrerer CC in einem Bestand durch den Zukauf von Tieren aus mehreren Beständen oder durch die schwache Tendenz der beteiligten CC, sich innerhalb der Herde zu profilieren, erklärt werden.

Die Dominanz eines CC geht dabei nicht zwangsweise mit einer hohen *Staphylococcus aureus*-Prävalenz einher. Zwar gehörten sowohl in Herde 1 als auch in Herde 3, die in der vorliegenden Untersuchung sehr hohe *Staphylococcus aureus*-Prävalenzen aufwiesen (50,00 % bzw. 33,33 % der untersuchten Tiere) alle Isolate zu einem CC (CC97 bzw. CC151), jedoch verfügte z.B. Bestand 22, in dem alle sechs typisierten Staphylokokken zu CC151 zählten, über eine Prävalenz von nur 3,77 %. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die *Staphylococcus aureus*-Prävalenz weniger von der Kontagiosität des Erregers, als vielmehr von Maßnahmen der Euter- und Melkhygiene beeinflusst wird.

*Staphylococcus aureus*-Isolate können insgesamt vier *agr*-Typen zugeordnet werden (JARRAUD et al. 2002). In der durchgeführten Studie waren CC-Zugehörigkeit und *agr*-Typ voneinander abhängig. Ohne Ausnahme gehörten Angehörige von CC7, CC20, CC45, CC97, CC101, CC133 und CC398 zum *agr*-Typ I und Angehörige von CC9, CC151 und CC479 zu *agr*-Typ II. Das detektierte CC50-Isolat zählte zum *agr*-Typ IV. Laut MONECKE et al. (2011a) können Angehörige eines CC und sogar eines ST grundsätzlich im *agr*-Typ divergieren, so dass der beobachtete Zusammenhang nicht selbstverständlich ist. Ein CC umfasst mehrere untereinander verwandte ST, wobei die Verwandtschaft zweier ST dadurch definiert ist, dass mindestens fünf der sieben betrachteten „housekeeping genes“ (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* und *yqiL*) identisch sind (FENG et al. 2008). Eventuell deutet die Konformität der CC hinsichtlich ihres *agr*-Typs auf eine enge Verwandtschaft der Isolate innerhalb eines CC hin. Die bei bovinen Mastitiden isolierten *Staphylococcus aureus* würden sich demnach noch weniger voneinander unterscheiden als die Aussage zur Zugehörigkeit zu identischen CC zulässt.

Mit Ausnahme eines CC50-Isolates gehörten alle untersuchten Staphylokokken zu *agr* I und II. Auch MELCHIOR et al. (2009) konnten das Überwiegen dieser zwei *agr*-Typen bei bovinen Mastitiden feststellen. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung bei subklinischen *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen, in der die beiden häufigsten CC und damit die Mehrheit der Isolate zu *agr*-Typ II gehörten, dominierte in Studien von GILOT et al. (2002), GILOT und VAN LEEUWEN (2004) und BUZZOLA et al. (2007) bei klinischen Mastitiden in Frankreich, den USA, Japan und Argentinien *agr* I. BUZZOLA et al (2007) konnten bei *agr* I-Isolaten eine gesteigerte Aufnahme in Epithelzellen und eine höhere Persistenz im Drüsengewebe feststellen als bei Isolaten anderer *agr*-Typen. Die Autoren leiteten daraus eine höhere Empfindlichkeit von *agr* II-, *agr* III- und *agr* IV-Isolaten gegenüber der wirtseigenen Abwehr ab. Auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung übertragen würde dies bedeuten, dass Angehörige von CC7, CC20, CC45, CC97, CC101, CC133 und CC398 für das wirtseigene Immunsystem schwieriger zu eliminieren wären als CC9-, CC151- und CC479-Staphylokokken. Weiterhin könnte die Tatsache, dass in den aufgeführten Studien bei klinischen Mastitiden vermehrt *agr* I isoliert wurde, während bei den subklinischen Mastitiden aus der vorliegenden Untersuchung vor allem *agr* II vorlag, auf eine höhere Pathogenität von *agr* I- und damit von CC7-, CC20-, CC45-, CC97-, CC101-, CC133- und CC398-Isolaten hindeuten.

## 5.2 CC-spezifische Ausstattung der 189 *Staphylococcus aureus*-Isolate mit Pathogenitätsfaktor-Genen

Durch die Typisierung der betrachteten Isolate mittels Microarray-Technologie war es möglich, die in Thüringer Milchviehherden auftretenden elf CC bzw. zwei epidemiologischen Varianten von *Staphylococcus aureus* weitgehend zu charakterisieren. So konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die verschiedenen CC bzw. die zwei epidemiologischen Varianten hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Pathogenitätsfaktorgen variieren.

Alle 189 Isolate verfügten ausnahmslos über die Kapselgene *cap5* oder *cap8*, die für die bei Euterinfektionen häufigsten Kapseltypen 5 und 8 kodieren (SALASIA et al. 2004). Die in der vorliegenden Untersuchung dominierenden CC (CC151, CC479 und CC133) besaßen dabei ebenso wie

CC7, CC45, CC50 und CC101 das Gen *cap8*, während bei den übrigen CC *cap5* nachgewiesen wurde. Da weder *cap5* noch *cap8* zu den „housekeeping genes“ zählen (FENG et al. 2008), liegt die Abhängigkeit zwischen CC und *cap* nicht in der CC-Definition der MLST-Klassifizierung begründet. Laut Monecke et al. (2011a) können Angehörige eines CC durchaus im Kapseltyp variieren. Die Tatsache, dass alle drei in Thüringer Milchviehherden dominierenden CC über *cap8* verfügen, lässt vermuten, dass der Kapseltyp 8 den Staphylokokken zu einem Selektionsvorteil verhilft. Eventuell ist der von KARAKAWA et al. (1988) und NILSSON et al. (1997) zugesprochene antiphagozytäre Effekt der Kapsel bei Kapseltyp 8 stärker ausgebildet als bei Kapseltyp 5. Alternativ kann die Abhängigkeit zwischen Kapseltyp und CC darauf hinweisen, dass die Kapselgene zu einem bestimmten Zeitpunkt in das *Staphylococcus aureus*-Genom integriert wurden und z.B. aufgrund einer Mutation in den entsprechenden Endonukleasen nicht mehr ausgeschleust werden können. In jedem Fall spricht die Assoziation zwischen CC und Kapseltyp dafür, dass die vorliegenden CC sich untereinander stark ähneln.

Die Hämolysin-Gene *hla* und *hlb* konnten bei 97,8 % bzw. bei 89,9 % der untersuchten Isolate detektiert werden. Die Komponenten des  $\gamma$ -Hämolysins (*lukF-hlg*, *hlgA*, *lukS-hlg*) wurden bei 97,8 %, 95,2 % bzw. 99,5 % der Isolate nachgewiesen. Alle Isolate waren *hld*-positiv.

Mit Ausnahme des  $\gamma$ -Hämolysins, das durch Agar gehemmt wird (BLOBEL und SCHLIESSER 1994), kann die Produktion der Toxine durch die Beurteilung des Hämolyseverhaltens geprüft werden, weshalb in 5.4 eingehend auf die Hämolysine eingegangen werden soll. Laut LARSEN et al. (2002) ist vor allem das Vorhandensein von Betatoxin typisch für bovine *Staphylococcus aureus*. In mehreren Studien konnte das entsprechende Gen bei einem Großteil der bovinen Isolate detektiert werden. So fand CABRAL (2003) *hlb* bei 84 (96,6 %) der 87 in Brasilien aus subklinischen bovinen Mastitiden isolierten *Staphylococcus aureus*. FUEYO et al. (2005) untersuchten ebenfalls subklinische Mastitiden und wiesen *hlb* bei 76 (90,5 %) der 84 typisierten *Staphylococcus aureus* nach. EISSA (2007) konnte *hlb* in einer hessischen Studie bei 60 (78,9 %) der untersuchten 76 *Staphylococcus aureus*-Kulturen detektieren. Leider erfolgte in dieser Studie keine Angabe zum Schweregrad der Mastitiden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine ähnliche Nachweisrate von *hlb* ermittelt. Das Gen war bei 96,1 % der „euterassoziierten“ CC151-, CC479- und CC133-Isolate vorhanden, fehlte jedoch bei CC398- und CC45-Staphylokokken, die über ein breites Wirtsspektrum verfügen. Diese Beobachtung könnte auf eine untergeordnete Bedeutung des Betatoxins bei anderen Tierarten als dem Rind sowie beim Menschen hinweisen. Diese Hypothese wird von AARESTRUP et al. (1999) untermauert, die bovine und humane *Staphylococcus aureus* verglichen und in bovinen Isolaten signifikant mehr *hlb* nachwies als in humanen Isolaten. Eventuell liegen bei CC398 und CC45 aber auch Sequenzvariationen des Gens vor, die durch eine PCR abgeklärt werden könnten. Dies würde erklären, warum andere Autoren bei bovinen *Staphylococcus aureus* dieser CC das Hämolysin  $\beta$ -Gen detektieren konnten (GÓMEZ-SANZ et al. 2010, ARGUDIN et al. 2011).

Im Gegensatz zu *hlb* konnte für *hla* sowie für die Gene des Hämolysins  $\gamma$  keine CC-spezifische Abhängigkeit ermittelt werden.

Konform zu Studien von AKINEDEN et al. (2001) und HAVERI et al. (2007) wurden in keinem der 189 untersuchten *Staphylococcus aureus* die Gene der Exfoliatine detektiert. Selbst das zu *agr* IV-

zählende CC50-Isolat besaß kein Exfoliatin-Gen, obwohl laut JARRAUD et al. (2000) eine Korrelation zwischen der *agr*-Interferenzgruppe IV und Exfoliatin-produzierenden Stämmen existiert. Aus diesen Beobachtungen kann auf eine geringe Bedeutung des Exfoliativen Toxins im bovinen Mastitisgeschehen geschlossen werden. Demnach ist auch die Gefahr, durch bovine *Staphylococcus aureus* Exfoliatin-bedingte Dermatosen im Menschen hervorzurufen, als gering einzuschätzen.

Im Großteil der untersuchten bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolate war grundsätzlich das Vermögen zur Enterotoxinbildung vorhanden. 78,3 % der Staphylokokken verfügten über mindestens ein Enterotoxin-Gen. Die Nachweisrate war damit deutlich höher als bei ZSCHÖCK et al. (2005) und HAVERI et al. (2007), die in 58,7 % bzw. 44,8 % der untersuchten bovinen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin-Gene detektierten. Allerdings handelte es sich in der vorliegenden Untersuchung weniger um die Gene der „klassischen“ Enterotoxine A–E, als vielmehr um die Gene des *egc*-Clusters (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*), deren Zusammenhang mit humanen Lebensmittelintoxikationen noch nicht eindeutig geklärt ist. Zwar berichteten MUNSON et al. (1998) von einer emetischen Aktivität von SEG und SEI im Primatenmodell, jedoch werden mindestens 95 % der durch *Staphylococcus aureus* bedingten Lebensmittelvergiftungen durch SEA-SEE verursacht (OMOE et al. 2002).

Die Gene des *egc*-Clusters sind auf einem gemeinsamen Operon lokalisiert und treten mit Ausnahme von sehr selten auftretenden Deletionen gemeinsam auf (JARRAUD et al. 2001). Insofern sind die beiden Fälle in der vorliegenden Untersuchung, in der Signale einzelner Gene ausblieben, sehr wahrscheinlich auf Sequenzvariationen oder zu schwache Signalintensitäten (z.B. infolge einer grenzwertigen DNA-Konzentration) zurückzuführen.

Alle CC9-, CC20-, CC45-, CC50-, CC151- sowie CC479-Isolate und damit 77,8 % aller untersuchten Staphylokokken verfügten über die *egc*-Cluster-Gene. Dagegen wurden nur bei 12,7 % der Isolate die Gene „klassischer“ Enterotoxine nachgewiesen. Auch in anderen Untersuchungen zum Vorkommen von Enterotoxinen in bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolaten wurden die Gene des *egc*-Clusters wesentlich häufiger detektiert als andere Enterotoxin-Gene (EISSA 2007, MONECKE et al. 2007a). Die hohe Prävalenz der *egc*-Cluster-Gene lässt vermuten, dass sie *Staphylococcus aureus* bei der Kolonisation bzw. Invasion unterstützen. Der Superantigencharakter der Clustergene, der im Gegensatz zum emetischen Potential unbestritten ist (ARGUDIN et al. 2010), könnte durch den lokalen Verbrauch von Zytokinen zur Immunsuppression des Wirts führen (FERENS und BOHACH 2000), die eine Ausbildung persistierender Infektionen erleichtern könnte.

Bei CC7-, CC97-, CC101-, CC133- und CC398-Isolaten wurden keine Clustergene detektiert. Mit Ausnahme des CC7-Isolates, das über *sea-N315* verfügte, wurden in diesen CC auch keine anderen Enterotoxin-Gene nachgewiesen. Von besonderer Bedeutung ist diese Tatsache für die Angehörigen von CC398, zu denen vier MRSA-Isolate gehörten. Zahlreiche Studien berichteten von der Abwesenheit der Enterotoxin-Gene bei MRSA CC398 (MONECKE et al. 2007a, WALTHER et al. 2009, FEßLER et al. 2010, TENHAGEN et al. 2010, ARGUDIN et al. 2011, HUBER et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der bei CC398 weder Enterotoxine, noch Leukozidine oder Exfoliatine detektiert wurden, untermauern die Beobachtung von TENHAGEN et al. (2010), dass dieser MRSA-Typ nur schwach mit virulenzassoziierten Genen ausgestattet ist. Dies könnte einen Grund dafür darstellen, dass die Besiedlung mit MRSA CC398 bei Mensch und Tier nicht immer und nicht unmittelbar zur klinischen Erkrankung führt. Die Abwesenheit der Gene und damit die Abwesenheit

der verschiedenen Pathogenitätsfaktoren bedingt dabei eine Reduktion des krankmachenden Potentials. Eventuell bringt die geringe Ausstattung mit Pathogenitätsfaktor-Genen dabei sogar einen evolutionären Vorteil für MRSA CC398 mit sich. Das Ausbleiben von Krankheitssymptomen führt zu einer stillen Trägerschaft, die eine Ausbreitung innerhalb einer Tiergruppe möglich macht.

Bei den übrigen nachgewiesenen Enterotoxin-Genen handelte es sich vor allem um *sec*, das auf CC45-Isolate sowie einige CC151-Isolate beschränkt war und bei 12,2 % der Isolate detektiert wurde. Diese Isolate verfügten gleichzeitig über das Gen *sel* und in 19 von 23 Fällen zusätzlich über *tst-RF122* bzw. *tst-1*, was durch das Vorkommen der Gene auf einer gemeinsamen Pathogenitätsinsel zu erklären ist (FITZGERALD et al. 2001). MATSUNAGA et al. (1993) und HAVERI et al. (2007) konnten ein vermehrtes Auftreten des SEC-Gens im Zusammenhang mit akuten und perakuten bovinen Mastitiden nachweisen. Auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie übertragen würde dies bedeuten, dass Tiere mit einer Infektion durch CC45-Staphylokokken schwerwiegendere Mastitissymptome zeigen als Tiere, die mit Staphylokokken anderer CC infiziert sind. In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch nur subklinisch infizierte Tiere beprobt. Es kann daher nur spekuliert werden, ob das Gen *sec* bei einem anderen Beprobungsverfahren häufiger detektiert worden wäre. Für eine derartige Aussage müsste der Zusammenhang zwischen *sec* und dem Schweregrad einer Mastitis weiter untersucht werden.

Während die Relevanz der klassischen Enterotoxine im Mastitisgeschehen fragwürdig ist, sind diese aus lebensmittelhygienischer Sicht von hoher Bedeutung. SEC ist wie SEB, dessen Gen ebenfalls detektiert wurde, in der Lage, Lebensmittelvergiftungen hervorzurufen (OMOE et al. 2002). Damit hatten zumindest 23 (12,2 %) der typisierten 189 Staphylokokken das Vermögen, Erkrankungen im Menschen hervorzurufen.

Das emetische Potential des durch *sea-N315* kodierten Toxins ist anders als das von SEA fraglich. Diese allelische Variante von *sea* wurde erstmals aus dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stamm N315 isoliert (KURODA et al. 2001) und ist auch als *sep* bekannt (MONECKE et al. 2009). Bisher konnte lediglich gezeigt werden, dass SEA-N315 in Moschusspitzmäusen gastrointestinale Symptome hervorruft, ein Nachweis der Symptomatik im Primaten steht dagegen noch aus (OMOE et al. 2005b, ARGUDIN et al. 2010).

Festgehalten werden muss in jedem Fall, dass die Ergebnisse der verwendeten DNA-Chips keine Aussage zu den tatsächlich exprimierten Enterotoxinen zulassen. Selbst bei Vorhandensein der entsprechenden Gene kann bei Optimierung der Verarbeitung und Lagerung des Lebensmittels Milch keine Enterotoxin-Produktion erfolgen, da die hierfür nötige Vermehrung der Staphylokokken auf Keimzahlen von mindestens  $10^5$ /g in diesem Fall ausbleibt (BLOBEL und SCHLIESSER 1994, BECKER et al. 2007).

Das humane Allel des Toxic-shock-syndrome-Toxins *tst-1* wurde nur in einem einzigen CC45-Isolat nachgewiesen, so dass die Gefahr eines Kuhmilch-assoziierten Toxic-Shock-Syndroms vernachlässigbar klein erscheint. Dieses Isolat verfügte gleichzeitig über *sec*, *sel*, *egc* sowie *sak* und besaß damit wesentlich mehr Pathogenitätsfaktor-Gene als andere Isolate. Das gemeinsame Vorkommen der Gene *tst-1*, *sec* und *sel* liegt in der Lokalisation auf einer gemeinsamen Pathogenitätsinsel begründet (FITZGERALD et al. 2001). Da das Staphylokinase-Gen *sak* in humanen Isolaten hochprävalent ist, während es in bovinem Material kaum gefunden wird (MONECKE et al.

2007b), könnte die Anwesenheit von *sak* in Kombination mit dem Vorliegen von *tst-1* auf ein ursprünglich humanes Isolat hindeuten. Die Übertragung vom Mensch auf das Tier wird dadurch gestützt, dass CC45 vor allem aus humanen Quellen isoliert wird (McCARTHY und LINDSAY 2010) und daher keinen „rein euterassoziierten“ CC darstellt. Alternativ kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem nachgewiesenen Isolat um eine Kontamination handelt und der Ursprung dieses Isolates nicht im bovinen Euter liegt. Durch das angewandte Auswahlprinzip der *Staphylococcus aureus*-Isolate wird diese Möglichkeit jedoch unwahrscheinlich.

Wesentlich häufiger als *tst-1* wurde die allelische Variante *tst-RF122* detektiert, die bei 19 CC151-Isolaten auftrat. Mit einer ermittelten Prävalenz von 10,1 % wurde in der vorliegenden Untersuchung seltener *tst-RF122* nachgewiesen als in Studien von SUTRA und POUTREL (1994) und LARSEN et al. (2002), die Produktionsraten von 20 % bzw. 25 % ermittelten. Leider erfolgt in beiden Studien keine Aussage zum Schweregrad der bovinen Mastitis, so dass nur unzureichende Vergleichsmöglichkeiten bestehen. Unter der Annahme, dass *tst-RF122* zu einer starken Entzündungsreaktion führt (KENNY et al. 1993), könnte die niedrigere Prävalenz der vorliegenden Untersuchung darin begründet liegen, dass Ergebnisse anhand subklinischer Mastitiden erhoben wurden.

Mit einer Ausnahme verfügten *tst-RF122*-positive Isolate gleichzeitig über *sec* und *sel*, wofür wiederum das gemeinsame Vorliegen auf einer Pathogenitätsinsel verantwortlich ist (FITZGERALD et al. 2001). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dem TSST zugesprochene Entzündungsreaktionen (KENNY et al. 1993) durch *sec* oder *sel* verursacht werden.

Der Zusammenhang zwischen *tst-RF122* und CC151 liegt darin begründet, dass das Allel auf *Staphylococcus aureus*-RF122 beschränkt ist, der CC151 zugerechnet wird (GUINANE et al. 2010). Da CC151 nur im Rind vorkommt (HERRON-OLSON et al. 2007, SUNG et al. 2008) besteht nicht die Möglichkeit eines durch *tst-RF122* verursachten toxischen Schocksyndroms beim Menschen.

Lediglich in 3,2 % der Isolate wurde das Staphylokinase-Gen *sak* detektiert. Dieses Gen war auf CC7, CC9, CC45 und CC101 beschränkt und wurde in keinem der CC nachgewiesen, die ausschließlich beim Rind vorkommen. Auch SUNG et al. (2008) berichteten von der Absenz des Staphylokinase-Gens in CC151. Die Autoren verglichen *Staphylococcus aureus*-Isolate aus humanen und tierischen Quellen hinsichtlich *sak* und stellten eine deutliche Häufung in humanen Isolaten fest. Sie machten damit dieselben Beobachtungen wie MONECKE et al. (2007a). In humanen Stämmen führt die Insertion von *sak*-tragenden Phagen, auf denen zum Teil zusätzlich *sea* vorhanden ist, in das Hämolyisin  $\beta$ -Gen zur Inaktivierung von *hly* (GOERKE et al. 2006). Vermutlich bietet Hly, das funktionell eine Phospholipase C darstellt, den Staphylokokken im bovinen Mastitisgeschehen einen größeren Selektionsvorteil als der Plasminogen-Aktivator Staphylokinase. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Gen *hly* bei 89,9 % der Staphylokokken detektiert, wobei es bei 96,1 % der „euterassoziierten“ Komplexe CC151, CC479 und CC133 auftrat. Die Tatsache, dass die in Thüringer Milchviehherden dominierenden Komplexe CC151, CC479 und CC133 nicht über *sak* verfügten, stützt die aufgestellte These eines durch *hly* bedingten Selektionsvorteils.

Andererseits wurde *sak* in fünf Isolaten gemeinsam mit *hly* detektiert. Dies könnte auf eine andere Integrationsstelle des *sak*-tragenden Phagen hinweisen. Desweiteren könnte die Ursache für ein simultanes Vorkommen von *hly* und *sak* in der *hly*-Sonde begründet liegen. Da die Array-Sonden immer nur einen kleinen Abschnitt des jeweiligen Gens umfassen, könnte dieser Abschnitt abseits

von der Integrationsstelle liegen. Selbst bei Integration des Phagen, in deren Folge es zur Veränderung des intakten Gens kommt, würde der Array dann ein positives Signal liefern. Diese Möglichkeit müsste durch eine PCR oder eine DNA-Sequenzierung abgeklärt werden.

Als wichtige Erkenntnis der vorliegenden Untersuchung erwies sich die CC-spezifische Ausstattung mit Leukozidin-Genen. Die 189 Isolate verfügten über eine umfangreiche Ausstattung mit den Leukozidin-Genen *lukD/lukE* sowie *lukF-P83/lukM*, wohingegen die Gene des PVL nicht nachgewiesen wurden.

Auch in anderen Studien, in denen Isolate von Nutztieren betrachtet wurden, konnten *lukF-PV* und *lukS-PV* nicht detektiert werden (VAN LEEUWEN et al. 2005, JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. 2007, MONECKE et al. 2007a, LEWIS et al. 2008). Dagegen tritt PVL laut DINGES et al. (2000) in 2–3 % aller humanen Isolate auf. Die Anwesenheit der PVL-Gene ist allerdings nicht auf humane Isolate beschränkt. PVL-positive MRSA wurden auch in einer Reihe von Heimtieren nachgewiesen (RANKIN et al. 2005). Hierbei führt der intensive Kontakt zum Besitzer zur Übertragung der PVL-positiven Staphylokokken vom Mensch auf das Tier (und umgekehrt) und bedingt das Auftreten identischer Stämme in Mensch und Heimtier (RUTLAND et al. 2009). Bei Nutztieren hingegen treten eigene *Staphylococcus aureus*-Stämme auf, bei denen humane Gene fehlen (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11).

Mit Ausnahme der CC398-, CC9- und CC45-Isolate wurde *lukD/lukE* in allen CC nachgewiesen. Das vereinzelte Auftreten schwacher, zweifelhafter oder negativer Signale bei jeweils einer der beiden Komponenten liegt vermutlich in Sequenzvariationen begründet, die durch eine PCR oder eine DNA-Sequenzierung abzuklären wären. Für den Aufbau des kodierten Zwei-Komponenten-Toxins LukD/LukE, das dem PVL sehr ähnlich ist und mit postantibiotischer Diarrhoe sowie Dermatosen in Verbindung gebracht wird, sind die Genprodukte beider Gene nötig (MORINAGA et al. 2003). Das alleinige Auftreten einer Komponente wäre daher ohne Vorteil für die Staphylokokken bzw. würde durch das Auftreten überflüssiger DNA sogar einen evolutionären Nachteil bedingen.

Das Fehlen von *lukD/lukE* in deutschen CC398-Isolaten wurde auch von MONECKE et al. (2007a) und KÖCK et al. (2009) beobachtet. Eventuell liegen bei CC398-, CC9- und CC45-Isolaten grundsätzlich Sequenzvariationen vor, die mit den Sonden der verwendeten Microarray-Technologie nicht erfasst werden können. In Studien anderer Autoren wird beim Nachweis der Genkombination nicht zwischen verschiedenen CC unterschieden, so dass keine Aussagen zu einem CC-spezifischen Verhalten der CC möglich sind. So fanden FUEYO et al. (2005) bei 83 der 84 (98,8 %) aus subklinischen bovinen Mastitiden isolierten *Staphylococcus aureus* die Genkombination *lukD/lukE*. HAVERI et al. (2007) konnten *lukD/lukE* bei 96,6 % aller Mastitisisolate nachweisen.

Die Genkombination *lukF-P83/lukM*, die für das Leukozidin LukF-P83/LukM kodiert, trat bei 151 (79,9 %) der untersuchten 189 Isolate auf. Die beiden Gene wurden damit deutlich häufiger detektiert als in einer von MONECKE et al. (2007a) in Deutschland und der Schweiz durchgeführten Studie, in der 53,1 % der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Isolate aus bovinem Material über die Gene verfügten.

Laut FROMAGEAU et al. (2010) kommt die Genkombination in 27–86 % aller bovinen *Staphylococcus aureus* vor. Gleichzeitig ist das Vorkommen von *lukF-P83/lukM* auf bovine, caprine und ovine *Staphylococcus aureus* beschränkt (SMELTZER et al. 2009, YAMADA et al. 2005). Bisher ist es jedoch fraglich, warum manche Isolate boviner Herkunft die beiden Gene besitzen und andere nicht (RAINARD et al. 2003, YAMADA et al. 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können diese Frage unter Umständen beantworten. Nahezu alle Isolate der dominierenden CC (CC151, CC479 und CC133) verfügten über *lukF-P83/lukM*, wohingegen diese Genkombination bei keinem Isolat der übrigen nachgewiesenen CC auftrat. Lediglich ein einziges *lukF-P83/lukM*-negatives CC479-Isolat bildete die Ausnahme dieses CC-spezifischen Vorliegens der beiden Gene. Die Anwesenheit von *lukF-P83/lukM* stellte damit ein wesentliches Charakteristikum derjenigen CC dar, die in Thüringer Milchviehherden deutlich erfolgreicher waren als andere CC. Dies lässt vermuten, dass *lukF-P83/lukM* bzw. dem kodierten Leukozidin eine essentielle Rolle in der Ätiologie boviner Mastitiden zukommt.

CC151, CC133 und CC479 stellen gleichzeitig die Komplexe dar, die auf das Rind bzw. den Wiederkäuer beschränkt sind (HERRON-OLSON et al. 2007, SUNG et al. 2008, SMYTH et al. 2009, GUINANE et al. 2010, HATA et al. 2010b, VAN DEN BORNE et al. 2010). Die konsequente Anwesenheit von *lukF-P83/lukM* in diesen CC könnte daher in einer Marker-Funktion der Genkombination resultieren. Die Detektion von *lukF-P83/lukM* in ausgewählten Isolaten eines Milchviehbestandes würde daher auf das Vorliegen „rein euterassoziierter“ *Staphylococcus aureus* hindeuten, die in Sanierungsprogrammen gezielt bekämpft werden können (SOMMERHÄUSER et al. 2003). Andererseits müssen bei Abwesenheit von *lukF-P83/lukM* in ausgewählten Isolaten auch andere Eintragsquellen für *Staphylococcus aureus* in Betracht gezogen werden als das infizierte Euter.

Die Betrachtung früherer Studien, in denen zwar die MLST-Klassifizierung zum Einsatz kam und *lukF-P83/lukM* detektiert wurde, aber kein Zusammenhang zwischen CC und *lukF-P83/lukM* hergestellt wurde, zeigt, dass die dargestellte Relation nicht nur für die untersuchten Isolate aus Thüringer Milchviehherden gilt. So fanden MONECKE et al. (2007a), die bovine Milchproben aus Deutschland und der Schweiz untersuchten, die Leukozidin-Gene ebenfalls bei CC133- und CC151-Isolaten. Die Autoren konnten die Genkombination weiterhin bei einem CC20-Isolat nachweisen, wohingegen ein weiteres CC20-Isolat negativ getestet wurde. Ebenso besaßen die CC20-Isolate der vorliegenden Untersuchung kein *lukF-P83/lukM*. Vermutlich ist diese Diskrepanz innerhalb eines CC auf die Zugehörigkeit zu unterschiedlichen ST zurückzuführen. Zwar ist das Vorkommen von CC20 bei Mensch und Tier beschrieben, jedoch ist es fraglich, ob das *lukF-P83/lukM*-positive CC20-Isolat auch das Potential hat, außerhalb von Wiederkäuern vorzukommen. Bisher wurde die Genkombination nur bei bovinen, ovinen und caprinen Isolaten detektiert (SMELTZER et al. 2009, FROMAGEAU et al. 2010). Selbst bei japanischen CC151-Isolaten konnte die Anwesenheit von *lukF-P83/lukM* ermittelt werden (HATA et al. 2010a). Darüber hinaus wurde die Genkombination in CC97-Isolaten detektiert, wofür dieselben Ursachen in Frage kommen wie bei dem CC20-Isolat aus der Studie von MONECKE et al. (2007a).

Die Detektion eines *lukF-P83/lukM*-negativen CC479-Isolates in der vorliegenden Untersuchung zeigt, dass die Absenz der Genkombination in „euterassozierten“ CC grundsätzlich möglich ist, wobei die tatsächliche Abwesenheit der Gene durch die durchgeführte PCR bestätigt wurde.

Die Genkombination *lukF-P83/lukM* ist auf dem Genom eines Prophagen lokalisiert und gilt daher als mobil (KANEKO und KAMIO 2004). Es ist zu erwarten, dass die Vergrößerung des *Staphylococcus aureus*-Genoms durch die Integration eines Bakteriophagen mit einer langsameren Replikation der Bakterien und damit mit einem evolutionären Nachteil einhergeht. Würde das Vorhandensein der auf dem Phagen lokalisierten Gene nicht mit einem Selektionsvorteil einhergehen, der diesen Nachteil ausgleicht, sollte es daher zur Ausschleußung des Gens aus dem Genom kommen. Grundvoraussetzung ist dabei, dass die Integration des Phagen einen reversiblen Prozess darstellt. Falls die Integration des Phagen weder einen Vorteil, noch einen Nachteil für die Staphylokokken darstellen würde, wäre mit einer geringeren Frequenz von *lukF-P83/lukM* zu rechnen, da sowohl die spontane Zunahme als auch der Verlust von Erbsubstanz selten sind (ENDER et al. 2004).

Das *lukF-P83/lukM*-negative CC479-Isolat wurde in Bestand 24 detektiert. In dieser Herde wurden in zwei Untersuchungsdurchgängen insgesamt nur zwei Kühe als *Staphylococcus aureus*-positiv identifiziert, wobei in der Milch eines Tieres CC7, in der anderen CC479 isoliert wurde. Damit wurde in dieser Herde mit 0,31 % gleichzeitig die niedrigste *Staphylococcus aureus*-Prävalenz der vorliegenden Untersuchung festgestellt. Das offensichtliche Unvermögen des *lukF-P83/lukM*-negativen CC479-Isolates, sich innerhalb des Bestandes auszubreiten, lässt wiederum auf eine Relevanz der Genkombination in der Ätiologie boviner Mastitiden schließen.

Für eine Bedeutung der Genkombination *lukF-P83/lukM* im Mastitisgeschehen sprechen weiterhin die Ergebnisse der Expressionsanalyse. Die Anwesenheit der beiden Gene ging in allen 15 getesteten Kulturen mit der Produktion von LukF-P83/LukM einher. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von RAINARD et al. (2003), die ebenfalls die Expression des Leukozidins durch *lukF-P83/lukM*-positive Isolate nachwiesen.

LukF-P83/LukM stellt ein Leukozidin dar, dessen Aufbau dem des PVL gleicht (KANEKO und KAMIO 2004). Theoretisch bedingt der porenbildende Charakter dieses Toxins wie beim PVL die Lyse von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die zur Freisetzung chemotaktisch wirksamer Faktoren führt. Der hervorgerufene Einstrom von Leukozyten zieht durch die Abgabe degradierender Enzyme und reaktiver O<sub>2</sub>-Verbindungen die Zerstörung des Gewebes nach sich (FERRY et al. 2005).

Bisher liegen lediglich *in vitro*-Untersuchungen zur Pathogenität von LukF-P83/LukM vor. So verglichen RAINARD et al. (2003) das leukotoxische Potential verschiedener *Staphylococcus aureus*-Stämme gegenüber aus Wiederkäuern stammenden neutrophilen Granulozyten. Stämme, die über *lukF-P83/lukM* verfügten, wiesen eine signifikant höhere Leukotoxizität auf als *lukF-P83/lukM*-negative Stämme. Im Kuheuter könnte diese Eigenschaft bestimmter *Staphylococcus aureus*-Stämme einen entscheidenden Selektionsvorteil darstellen. Eine auch *in vivo* existierende Leukotoxizität würde die Wirtsabwehr reduzieren und zur schnelleren Besiedlung des Euters führen. RAINARD et al. (2003) stellten weiterhin fest, dass der leukotoxische Charakter oviner und capriner *lukF-P83/lukM*-positiver-Isolate wesentlich ausgeprägter war als der boviner Staphylokokken und sahen dies als möglichen Grund für die beim kleinen Wiederkäuer häufiger vorkommenden klinischen Mastitiden. Auch in der vorliegenden Untersuchung lagen Unterschiede hinsichtlich des

leukotoxischen Potentials vor. CC133-Isolate produzierten wesentlich mehr LukF-P83/LukM als CC151- und CC479-Isolate (Anhang 7). Gleichzeitig stellt CC133 den CC dar, der beim kleinen Wiederkäuer am häufigsten isoliert wird (JOKIEL 2009, GUINANE et al. 2010). Eventuell handelte es sich bei den von RAINARD et al. (2003) beobachteten Isolaten von Schaf und Ziege um CC133. Das erhöhte leukotoxische Potential von CC133-Isolaten könnte daher direkt in Verbindung mit der ausgeprägteren Klinik von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden bei Schaf und Ziege stehen.

Aus den geschilderten Sachverhalten ergeben sich Parallelen zwischen LukF-P83/LukM und PVL. PVL-positive *Staphylococcus aureus* breiteten sich in den letzten Jahren weltweit aus (MONECKE et al. 2007b). Während Infektionen, die durch PVL-negative Staphylokokken verursacht werden, bei immunkompetenten Personen oft symptomlos verlaufen, geht die Infektion mit PVL-positiven Stämmen bei Kindern und jungen Erwachsenen im Allgemeinen mit schwerwiegenden Infektionen einher (ZETOLA et al. 2005). Ähnlich PVL könnte auch LukF-P83/LukM darüber entscheiden, ob sich ein *Staphylococcus aureus*-Isolat innerhalb eines Betriebes ausbreitet oder auf vereinzelte Tiere beschränkt bleibt.

### 5.3 Resistenzverhalten der untersuchten 189 Isolate

Die Kenntnis der in *Staphylococcus aureus* vorliegenden Resistenzdeterminanten ist entscheidend für die Therapie der verursachten Mastitiden. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass Resistenzdeterminanten über das Lebensmittel Milch in den Menschen gelangen und dort auf andere Bakterien übertragen werden (TENHAGEN et al. 2009).

Von den 189 untersuchten Staphylokokken verfügten 21 (11,1 %) über das Gen der  $\beta$ -Laktamase. Zurückliegende Studien zum Nachweis von *blaZ* basieren meist auf *Staphylococcus aureus*-Isolaten, die entweder aus akuten klinischen Mastitiden isoliert wurden oder in phänotypischen Resistenztests vermehrt Resistenzen aufwiesen. Aus diesem Grund sind Untersuchungen von VESTERHOLM-NIELSEN et al. (1999), HAVERI et al. (2007), PITKÄLÄ et al. (2007) und ASFOUR und DARWISH (2011) mit *blaZ*-Prävalenzen zwischen 27,4 % und 100 % kaum mit der vorliegenden Untersuchung vergleichbar. Lediglich MONECKE et al. (2007a) verwendeten Staphylokokken aus dem Routinematerial von deutschen und schweizerischen Untersuchungsämtern und wiesen *blaZ* mittels Microarray-Technologie in 21,1 % der Isolate nach. Weiterhin konnte *blaZ* unter Anwendung der PCR von EISSA (2007) in 59,2 % der untersuchten *Staphylococcus aureus* detektiert werden, wobei die zugehörigen Milchproben den Routineeinsendungen eines hessischen Milchlabors entstammten. Allerdings ist zu erwarten, dass bei akuten Mastitiden entnommene Milchproben einen hohen Anteil der Routineeinsendungen eines Milchlabors darstellen, so dass auch die Untersuchungen von MONECKE et al. (2007a) und EISSA (2007) nicht unmittelbar mit der vorliegenden Studie vergleichbar sind.

Die Anwesenheit von *blaZ* war an sechs verschiedene CC gebunden (CC7, CC9, CC20, CC45, CC398, CC151). Mit Ausnahme eines CC151-Isolates wurde *blaZ* daher nur in CC detektiert, die sich nicht wirtsspezifisch verhalten. Damit verfügten 54,1 % der Isolate der sporadisch nachgewiesenen, nicht

wirtsspezifischen CC über *blaZ*, während das Gen nur in 0,7 % der zu den „euterassozierten“ CC zählenden Isolate nachgewiesen wurde.

Bei Betrachtung des *agr*-Typs der verschiedenen CC fällt weiterhin auf, dass *blaZ*-positive Isolate vorrangig dem *agr*-Typ I zugeordnet werden konnten. So gehörten 15 *blaZ*-positive Isolate dem *agr*-Typ I und nur sechs Isolate dem *agr*-Typ II an. Eine Korrelation von *blaZ* und *agr*-Typ I wurde bereits von MELCHIOR et al. (2009) beschrieben. Die Autoren führten dies auf eine nur schwach ausgebildete Fähigkeit des *agr*-Typs II zurück, das Penicillin-Resistenzgen zu akkomodieren.

Die Tatsache, dass alle *blaZ*-positiven Isolate im durchgeführten Agardiffusionstest Penicillin-resistent waren, zeigt, dass die Anwesenheit des Resistenzgens in den untersuchten Isolaten mit seiner Expression einherging. Weiterhin spricht diese Beobachtung für die Eignung des verwendeten Agardiffusionstests bei der Ermittlung der Penicillin-Resistenz.

Nach Ansicht einiger Autoren ist das Verhalten eines *Staphylococcus aureus* gegenüber Penicillin relevant für den Heilungserfolg der verursachten Mastitis (SOL et al. 2000, BARKEMA et al. 2006, HAVERI 2008). Demnach kommt es selbst unter Verwendung von Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei Mastitiden durch Penicillin-sensible *Staphylococcus aureus* häufiger zur Ausheilung als bei Mastitiden durch Penicillin-resistente Stämme. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang unbekannt (KAPUR et al. 1995, BARKEMA et al. 2006), wird aber in der Koexistenz von *blaZ* und (bisher unbekanntem) Mastitis-verursachenden Faktoren vermutet. Die vorliegende Untersuchung stellt einen Zusammenhang zwischen *blaZ* und bestimmten CC und damit zwischen *blaZ* und *agr*-Typ I her. Da keine Aussagen zum Behandlungserfolg der untersuchten Kühe vorliegen, kann nur spekuliert werden, dass Mastitiden, die durch *Staphylococcus aureus*-Isolate bestimmter „umweltassoziierter“ CC verursacht werden, mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang stehen als solche durch „euterassozierte“ CC.

Zusätzlich zur Penicillin-Resistenz konnte bei 15 der 21 *blaZ*-positiven Isolate im Agardiffusionstest eine Resistenz gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure beobachtet werden. Die Anwesenheit von Clavulansäure, die die  $\beta$ -Laktamase kompetitiv hemmt (KROKER et al. 2002), sollte dagegen die Stabilität und daher die Wirksamkeit der Verbindung in Anwesenheit des Enzyms erwarten lassen. Bei vier der 15 Isolate wurde zusätzlich zu *blaZ* das Methicillin-Resistenzgen *mecA* nachgewiesen, das die Resistenz gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika vermittelt. Die Resistenz der übrigen elf Isolate gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure ist möglicherweise auf Messungenauigkeiten bei der Bestimmung des Hemmhofdurchmessers zurückzuführen. Bei dieser Antibiotikakombination entscheidet ein Unterschied von 1 mm im Hemmhofdurchmesser über die Einordnung in „resistent“ oder „sensibel“. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Dichte der auf die Agarplatten aufgetragenen Bakteriensuspension zu gering war. Aufgrund der Komplexität des Verfahrens ist der Agardiffusionstest relativ fehleranfällig. Allerdings werden auch andere phänotypische Resistenzverfahren wie die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von vielen äußeren Faktoren (z.B. Temperatur, pH-Wert) beeinflusst und sind daher fehlerbehaftet (WITTE et al. 2004).

Von besonderer lebensmittelhygienischer Relevanz ist das Auftreten von MRSA in Rohmilch. Die vier detektierten *mecA*-positiven Isolate stellen 2,1 % aller untersuchten Staphylokokken dar. Verglichen mit Untersuchungen zum Vorkommen von MRSA in Geflügelfleisch, bei denen Prävalenzen von bis zu

37,2 % ermittelt wurden (DE BOER et al. 2009, FEßLER et al. 2011a), ist die festgestellte Prävalenz sehr gering. Auch im Vergleich mit anderen Studien zum Vorkommen von MRSA beim Rind ist die in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Prävalenz niedrig. JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al. (2007) stellten in Ungarn bei 27 (7,2 %) der untersuchten 375 aus subklinischen Mastitiden isolierten *Staphylococcus aureus mecA* fest. In einer belgischen Studie fanden VANDERHAEGHEN et al. (2010) das Methicillin-Resistenz-Gen bei 11 (9,3 %) der 118 aus klinischen Mastitiden isolierten *Staphylococcus aureus*. NAM et al. (2011) ermittelten bei 402 aus Korea stammenden bovinen Mastitisproben eine MRSA-Prävalenz von 6,2 %.

Die *mecA*-positiven Isolate der vorliegenden Untersuchung stammten aus vier unterschiedlichen Beständen, so dass in 11,8 % der 34 teilnehmenden Herden MRSA nachgewiesen wurde. Da jeweils nur sechs Isolate typisiert wurden, kann diese Zahl lediglich als Näherungswert gelten. In Baden-Württemberg stellten FRIEDRICH et al. (2011) in Tankmilchproben eine MRSA-Prävalenz von 2,2 % fest. In dieser Untersuchung deutete sich eine Korrelation zwischen der Dichte der Schweinepopulation und dem MRSA-Vorkommen in Milchviehbetrieben an. Ein derartiger Zusammenhang kann auch für die untersuchten Thüringer Herden nicht ausgeschlossen werden, insbesondere weil alle Isolate zu dem bei Nutztieren bedeutendsten Komplex CC398 gehörten, der über ein breites Wirtsspektrum verfügt (TENHAGEN et al. 2008, MONECKE et al. 2011a). Im Rahmen einer telefonischen Befragung der Betriebsleiter wurde ermittelt, dass drei der vier MRSA-Bestände in räumlicher Nähe zu Schweinebeständen des eigenen Betriebes oder anderer landwirtschaftlicher Betriebe liegen. Die Frage nach betrieblichen Beziehungen der MRSA-Bestände untereinander wurde hingegen verneint.

Obwohl Oxacillin üblicherweise für die MRSA-Diagnostik herangezogen wird (BECKER 2004), gab der durchgeführte Agardiffusionstest keinen Hinweis auf Methicillin-resistente Isolate. Alle vier *mecA*-positiven Staphylokokken waren laut Agardiffusionstest Oxacillin-sensibel. Darüber hinaus war die zu erwartende Resistenz gegenüber allen anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nur sporadisch ausgebildet. Lediglich gegenüber Penicillin und Amoxicillin/Clavulansäure waren alle Isolate resistent (Anhang 8). Um sicherzustellen, dass *mecA* vollständig vorlag und eine Expression erfolgen konnte, wurden die vier Isolate mittels Bouillon-Mikrodilutionstest erneut auf ihr Verhalten gegenüber Oxacillin geprüft. Alle Isolate wurden dabei als Oxacillin-resistent getestet (Anhang 8). Diese Beobachtungen bestätigen Erfahrungen von FERNANDES et al. (2005), die die Detektion von MRSA in routinemäßig eingesetzten Resistenzprüfungsverfahren wie dem verwendeten Agardiffusionstest als problematisch bezeichneten. Die Autoren führten nötige Abweichungen vom Standard-Protokoll wie die Zugabe von NaCl zum Testmedium und die Absenkung der Bebrütungstemperatur auf, die eine gesteigerte Expression von *mecA* bedingen. Das Ausbleiben zu erwartender Resistenzreaktionen im durchgeführten Agardiffusionstest kann daher auf eine unter den gegebenen Bedingungen verminderte *mecA*-Produktion zurückzuführen sein. Alternativ zur *mecA*-Bestimmung als Goldstandard empfahlen FERNANDES et al. (2005) die mit geringem Aufwand verbundene Resistenztestung gegenüber Cefoxitin. Als Konsequenz der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sollte diese für alle Penicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Isolate in Erwägung gezogen werden, auch wenn in Deutschland gegenwärtig kein Mastitispräparat mit diesem Wirkstoff zugelassen ist.

Neben *mecA* und *blaZ* besaßen alle MRSA der durchgeführten Untersuchung Tetrazyklin-Resistenzgene (*tetK*, *tetM*), deren Anwesenheit sowohl im Agardiffusionstest als auch im Mikrodilutionsverfahren in einer Tetrazyklin-Resistenz resultierte. Das Vorkommen von Tetrazyklin-Resistenzgenen ist typisch für CC398 (ASPIROZ et al. 2010, ALT et al. 2011) und steht in direktem Zusammenhang mit dem häufigen Einsatz von Tetrazyklinen in der Veterinärmedizin (VAN DUIJKEREN et al. 2007). Gerade in der Schweineproduktion findet diese Antibiotikagruppe häufig Anwendung und bedingt einen starken Selektionsdruck hin zu Tetrazyklin-resistenten MRSA (KIETZMANN 2003). Ausgehend von Schweinemastbetrieben, die zu 60 % MRSA-positiv sind (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11), können die Staphylokokken über verschiedene Wege ins Rind und andere Wirte gelangen.

Abgesehen von *blaZ*, *tetK* und *tetM* wurden in den MRSA-Isolaten der vorliegenden Untersuchung kaum Resistenzgene detektiert. Zwei der vier MRSA (Isolat 2 und 4) besaßen keine weitere Resistenzdeterminante, obwohl bei einem dieser Isolate sowohl im Agardiffusionstest als auch der Mikrodilution eine Resistenz gegenüber Trimethoprim bzw. Trimethoprim/Sulfamethoxazol vorlag. Da beide phänotypische Resistenzprüfungsmethoden identische Ergebnisse lieferten, scheint diese Resistenz tatsächlich vorzuliegen. Allerdings wurde sie nicht durch *dfrA* vermittelt, dessen Sonde auf dem Array ein negatives Signal lieferte. Neben dem Vorliegen von *dfrA*, das plasmidkodiert ist, kann Trimethoprim-Resistenz auch auf das chromosomal liegende *dfrB* zurückzuführen sein, dessen Anwesenheit durch den Array nicht geprüft wurde. Beide Gene kodieren für eine Dihydrofolatreduktase mit verminderter Affinität für Trimethoprim (LYON und SKURRAY 1987, DALE et al. 1993). Weitere *dfr*-Gene (*dfrD*, *dfrG*, *dfrK*) wurden in den letzten Jahren beschrieben (KADLEC und SCHWARZ 2009). Möglich ist darüber hinaus das Vorliegen unspezifischer Resistenzmechanismen oder die Messung eines falsch-negativen Signals durch den ArrayMate Reader, was unter anderem auf eine grenzwertige DNA-Konzentration zurückgeführt werden kann. In jedem Fall lagen bei den MRSA-Isolaten 2 und 4 Resistenzen gegen weniger als fünf Wirkstoffgruppen vor, weshalb sie nicht als „multiresistente“ Isolate gelten (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11).

In jeweils einem der verbleibenden zwei MRSA-Isolate wurden *vgaA* und *aacA-aphD* nachgewiesen. Das Genprodukt von *vgaA* ist ein Transportprotein, das an der Ausschleusung von Streptograminen, Pleuromutilinen und Lincosamiden beteiligt ist (HAUSCHILD et al. 2011), *aacA-aphD* vermittelt Gentamicin-, Tobramycin- und Kanamycin-Resistenz (ROUCH et al. 1987). Beide Gene wurden auch in anderen MRSA-Studien detektiert (GÓMEZ-SANZ et al. 2010, KADLEC und SCHWARZ 2010).

Das *vgaA*-positive Isolat (Isolat 1) zeigte im Agardiffusionstest eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber der Lincosamid/Aminoglykosid-Kombination Lincomycin/Neomycin, in der Mikrodilution war jedoch keine Resistenz gegenüber dem einzigen getesteten Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin feststellbar. Eine Expression des Gens ist daher fraglich. Das zusätzliche Auftreten einer im Agardiffusionstest und im Mikrodilutionsverfahren beobachteten Fluorchinolon-Resistenz in Isolat 1 kann nicht auf das Vorhandensein bestimmter Gene zurückgeführt werden, da im verwendeten Array kein Fluorchinolon-Resistenzgen überprüft wurde.

Die Tatsache, dass die Anwesenheit von *aacA-aphD* in Isolat 3 mit einer im Agardiffusionstest beobachteten Gentamicin- und Neomycin-Resistenz sowie einer in der Mikrodilution festgestellten Gentamicin- und Tobramycin-Resistenz einherging, legt die Expression des Gens nahe.

Sowohl bei Isolat 1 als auch bei Isolat 3 trat zusätzlich in beiden phänotypischen Resistenzprüfungsverfahren eine Resistenz gegenüber Trimethoprim auf, die nicht mit einem positiven *dfrA*-Signal einherging. Die möglichen Ursachen dafür entsprechen denen, die für das MRSA-Isolat 2 beschrieben wurden.

Es bleibt festzuhalten, dass bei den vier MRSA-Isolaten eine gute Übereinstimmung zwischen den vorliegenden Resistenzdeterminanten und den phänotypischen Resistenzprüfungsverfahren vorhanden war. Durch die Kombination der drei Methoden wurde sowohl das Verhalten gegenüber veterinärmedizinisch eingesetzten Substanzen als auch gegenüber humanmedizinischen Antibiotika inkl. Reserveantibiotika erfasst. Die vier aus Kuhmilch isolierten MRSA zeigten dabei keine Resistenzen gegenüber humanmedizinischen Reserveantibiotika und waren in ihrem Resistenzspektrum eher eingeschränkt. Eine Infektion des Menschen durch den Verzehr MRSA-haltiger Lebensmittel wurde bislang nicht nachgewiesen (persönliche Mitteilung: ALEXANDRA FETSCH, Berlin, 23.11.11), doch selbst wenn Rohmilch als Vehikel für MRSA nicht ausgeschlossen werden kann, ist das Potential dieser bovinen MRSA begrenzt. Sie verfügen nur über wenige Resistenzen und weisen zudem kaum Pathogenitätsfaktoren auf. Bovine MRSA sind daher kaum vergleichbar mit multiresistenten Staphylokokken aus der Humanmedizin.

Die *mecA*-negativen Isolate verfügten mit Ausnahme von *fosB* nur sporadisch über Resistenzdeterminanten. Das Fosfomycin-Resistenz vermittelnde *fosB* wurde in 40 (21,2 %) der 189 untersuchten *Staphylococcus aureus* detektiert, wobei das Gen in 20 der 21 CC133-Isolate auftrat und in der vorliegenden Studie daher als Charakteristikum dieses CC betrachtet werden kann. Weiterhin war *fosB* in allen CC9, CC20 und CC101-Isolaten vorhanden und kam vereinzelt bei CC97, CC151 und CC479 vor.

Das zugehörige Genprodukt FosB ist eine Metallothiol-Transferase, die die Thiol-Gruppe von Cystein auf Fosfomycin überträgt und damit zur Inaktivierung des Antibiotikums führt (ALLOCATI et al. 2009). Fosfomycin gilt in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum bei MRSA-Infektionen und gewinnt als Alternativsubstanz zunehmend an Bedeutung. Gleichzeitig wird immer häufiger vom Auftreten Fosfomycin-resistenter Bakterien berichtet (FAHRBACH 2010).

Vergleichbar mit der vorliegenden Studie berichteten auch MONECKE et al. (2008b) von einem CC-spezifischen Auftreten von *fosB*. Bei der Typisierung von 100 *Staphylococcus aureus*-Referenzstämmen mittels Microarray stellten die Autoren die Anwesenheit von *fosB* in CC5-, CC8-, CC12-, CC15-, CC20-, CC25-, CC30- und ST75-Isolaten fest. Bei anderen Resistenzdeterminanten konnten MONECKE et al. (2008b) dagegen kein CC-spezifisches Verhalten feststellen. Da CC133 keinen humanen CC darstellt und Fosfomycin nicht im Wiederkäuer eingesetzt wird, ist die Bedeutung von *fosB* in CC133 fraglich. Denkbar ist jedoch, dass auf dem *fosB*-tragenden Plasmid (ALLOCATI et al. 2009) gleichzeitig andere (bisher unbekannte) Determinanten vorliegen, die CC133 im Gegensatz zu *fosB* zu einem Selektionsvorteil verhelfen. Diese Kopplung von Resistenzdeterminanten wird als Koselektion bezeichnet (FEßLER et al. 2011b). Möglich ist weiterhin, dass *fosB* zu einem bestimmten Zeitpunkt in das Genom von CC133, CC9 und CC20 integriert wurde und aufgrund einer Mutation in den entsprechenden Endonukleasen nicht mehr ausgeschleust werden kann.

In neun der 189 aus Kuhmilch isolierten Staphylokokken wurden Chloramphenicol-Resistenzgene (*cat*, *fexA*) detektiert, obwohl die Verwendung von Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren nach der VO(EU) Nr. 37/2010, ehemals VO(EWG) Nr. 2377/90 seit August 1994 untersagt ist. Ein Verbot des Antibiotikums lässt einen Wegfall der Selektionsvorteile Chloramphenicol-resistenter Keime erwarten. Unter der Voraussetzung, dass die entsprechenden Gene das Genom verlassen können, sollten *cat* und *fexA* nicht mehr in bovinen Isolaten vorkommen. Ein Gentransfer von nicht-lebensmittelliefernden Tieren kann im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden, da neben CC398 nur wiederkäuerspezifische CC (CC133, CC151, CC479) über die Resistenzgene verfügten.

Vermutlich handelt es sich hierbei um koselektierte, persistierende Gene, die gemeinsam mit anderen, evtl. unbekanntem Resistenzdeterminanten auf einem mobilen genetischen Element lokalisiert sind. Solche Resistenzdeterminanten werden immer gemeinsam selektiert, selbst wenn nur eines der Gene einen Selektionsvorteil mit sich bringt (FEßLER et al. 2011b). Der Selektionsdruck, der durch den Einsatz eines einzigen Antibiotikums erzeugt wird, reicht damit aus, um in einer Population mehrere Resistenzdeterminanten zu profilieren. Laut STEFAN SCHWARZ (persönliche Mitteilung: BERLIN, 23.11.11) werden Chloramphenicol-Resistenzgene sehr häufig koselektiert.

Identisch zu den detektierten MRSA kamen auch in den *mecA*-negativen CC398-Isolaten Tetrazyklin-Resistenzen vor. Alle vier CC398-MSSA wurden im Agardiffusionstest als Tetrazyklin-resistent getestet. Allerdings wurde *tetM* nur in drei Isolaten nachgewiesen. Vermutlich lag beim *tetM*-negativen Isolat ein falsch-negatives Signal vor. Möglich ist weiterhin das Vorliegen einer Tetrazyklin-Resistenzdeterminante, die durch den Array nicht detektierbar war. So kann neben *tetK* und *tetM* auch *tetL* Ursache für eine Tetrazyklin-Resistenz sein (JIN et al. 2002). Alternativ kann ein Fehler im Agardiffusionstest vorliegen.

Laut DAVIES et al. (2011) sind nahezu alle aus Nutztieren isolierten CC398 mit einer Tetrazyklin-Resistenz ausgestattet. Vermutlich sind CC398-*Staphylococcus aureus* besser als andere CC zur Akkumulation von Resistenzen fähig. So wird angenommen, dass CC398-MRSA durch die effektive Aufnahme der *SCCmec*-Kassette aus CC398-MSSA hervorging (HASMAN et al. 2010)

Als weitere Resistenzdeterminante wurde das Makrolid-Resistenz vermittelnde *msrA* in einem CC151-Isolat detektiert. Im Agardiffusionstest wurde bei diesem Isolat keine Resistenz gegenüber Erythromycin und Tylosin festgestellt. Möglich ist daher das Ausbleiben einer Expression von *msrA* oder das Vorliegen eines falsch-positiven Signals.

Keine der übrigen durch den verwendeten Array detektierbaren Resistenzdeterminanten (*ermA-C*, *mefA*, *vatA*, *vatB*, *vgb*, *dfrA*, *cfr*, *vanA*, *vanB*, *vanZ*, *far*) wurde in den 189 aus Kuhmilch isolierten Staphylokokken nachgewiesen. Dennoch waren im Agardiffusionstest bei einigen Isolaten weitere Resistenzen zu verzeichnen.

Dies betrifft insbesondere festgestellte Resistenzen gegenüber Trimethoprim, auf deren mögliche Ursachen bereits eingegangen wurde. Auffällig war zudem, dass elf Isolate eine Resistenz und 15 Isolate eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber Tylosin aufwiesen, obwohl in den betreffenden Isolaten keine Makrolid-Resistenzdeterminanten gefunden wurden.

Der parenterale Einsatz von Tylosin wird von einigen Autoren zur Behandlung von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden empfohlen (BOLOURCHI et al. 1995, WINTER und ZEHLE 2009c). Insofern ist das Vorhandensein von Resistenzen in den vorliegenden Isolaten nicht abwegig. Mehrere Autoren berichteten bereits von Tylosin-Resistenzen boviner *Staphylococcus aureus*. Laut BgVV (1998) lag 1995 bei 27 % und 1996 bei 23 % der in Deutschland untersuchten *Staphylococcus aureus* aus bovinem Material eine Tylosin-Resistenz vor. TROLLDENIER und WAGNER (2001) stellten ebenfalls in Deutschland bei 11,6 % der 125 aus Kuhmilch isolierten *Staphylococcus aureus*-Isolaten eine Resistenz gegenüber Tylosin fest. Eine deutlich höhere Resistenzrate wurde von WANG et al. (2008) beobachtet, die in China bei 40,3 % der untersuchten 72 *Staphylococcus aureus*-Isolate aus klinischen bovinen Mastitiden eine Tylosin-Resistenz verzeichneten.

Als Makrolid-Antibiotikum bindet Tylosin an die 50S-UE der Ribosomen und hemmt dadurch die Proteinbiosynthese. Da die 50S-UE auch die Bindungsstelle der Lincosamide und Streptogramine darstellt, treten Resistenzen in der Regel gleichzeitig gegenüber allen drei Substanzgruppen auf (GEISS et al. 2003). Am häufigsten werden Resistenzen durch Methyltransferasen vermittelt, die zur Modifikation der Antibiotika-Bindestelle führen und damit eine Anlagerung verhindern (LECLERCQ 2002). Die untersuchten 189 Isolate wurden negativ auf die Gene der drei wichtigsten Methyltransferasen (*ermA*, *ermB*, *ermC*) getestet, jedoch existieren über 40 verschiedene solche Enzyme. Weiterhin können Effluxpumpen vorliegen, die zur Ausschleusung des Antibiotikums führen und z.B. durch *msrA*, *msrB* und *mefA* kodiert werden. Im verwendeten Array wurde dabei nur auf *msrA* und *mefA* getestet. Außerdem ist die enzymatische Inaktivierung der Antibiotika möglich (GEISS et al. 2003). Neben den durch den Microarray detektierbaren Genen kann daher eine Reihe anderer Faktoren für eine Tylosin-Resistenz verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass bei insgesamt 132 (69,8 %) der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Isolate im Agardiffusionstest keine Resistenz zu verzeichnen war und bei 135 Isolaten (71,4 %) kein einziges Resistenzgen detektiert wurde, deutet erneut darauf hin, dass bovine Isolate gegenwärtig nur über ein begrenztes Resistenzpotential verfügen. Es zeigt weiterhin, dass eine weite Ausbreitung von *Staphylococcus aureus* als Mastitiserreger auch ohne den Besitz der untersuchten Resistenzgene möglich ist. Allerdings stellen die durchgeführten Untersuchungen keine abschließende Betrachtung zum gegenwärtigen Resistenzspektrum von *Staphylococcus aureus*-Stämmen aus Thüringer Milchviehherden dar. Da der verwendete Microarray auf humanmedizinische Fragestellungen ausgerichtet ist, kann die Anwesenheit weiterer, durch den verwendeten Array nicht detektierbarer tierspezifischer Allele nicht ausgeschlossen werden. Die festgestellten Inkongruenzen zwischen vorhandener *in vitro*-Resistenz und Abwesenheit eines Resistenzgens sollten bei einer eventuellen Entwicklung veterinärmedizinisch ausgerichteter DNA-Microarrays berücksichtigt werden. In jedem Fall sollten auf der Oberfläche solcher Arrays Fluorchinolon-Resistenzdeterminanten immobilisiert sein, da diese Antibiotika-Gruppe in der Veterinärmedizin häufig Anwendung findet und *in vitro*-Resistenzen festgestellt wurden. Gleiches gilt für Trimethoprim und Tylosin, bei denen im Agardiffusionstest aufgetretene Resistenzen nicht auf entsprechende Resistenzdeterminanten zurückgeführt werden konnten.

#### 5.4 Phänotypisierung der 189 Isolate mit Bezug zu den einzelnen CC

Alle Isolate der vorliegenden Untersuchung waren hämolysierend, obwohl mit den beschriebenen Methoden des *Staphylococcus aureus*-Nachweises auch Isolate ohne Hämolysezone erfasst werden. Am häufigsten wurde eine doppelzonige Hämolyse beobachtet, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Hämolysezone zusammensetzte und bei 81,0 % der Isolate vorhanden war. Dieses Ergebnis ist nahezu identisch mit dem von CABRAL (2003), der bei 81,6 % der untersuchten 87 bovinen *Staphylococcus aureus*-Kulturen das gemeinsame Auftreten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse feststellte.

Von den 185 Staphylokokken, bei denen *hla* detektiert wurde, zeigten 180 (97,3 %) eine  $\alpha$ -Hämolysezone. Bei 150 dieser Isolate war gleichzeitig eine  $\beta$ -Hämolysezone vorhanden. Vier *hla*-negative Isolate verfügten ebenfalls über  $\alpha$ -Hämolyse. Das Hämolysin  $\beta$ -Gen *hnb* wurde bei 170 Isolaten nachgewiesen, von denen 140 (82,4 %) auch phänotypisch eine  $\beta$ -Hämolyse zeigten. Bei 135 Isolaten ging diese mit dem gleichzeitigen Auftreten einer  $\alpha$ -Hämolysezone einher. Darüber hinaus verfügten 15 *hnb*-negative Isolate ebenfalls über eine  $\beta$ -Hämolysezone. Die Expressionsrate des  $\gamma$ -Hämolysins konnte nicht überprüft werden, da Agar und andere in Blutagarplatten enthaltene sulfonierte Polymere die Ausprägung des Toxins hemmen (BLOBEL und SCHLIESSER 1994). Eine  $\delta$ -Hämolyse wurde bei keinem Isolat festgestellt, obwohl das zugrunde liegende Gen *hld* in allen Isolaten detektiert wurde.

Es lagen daher deutliche Diskrepanzen zwischen der detektierten Anwesenheit der Hämolysin-Gene und deren Expression vor. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht, die bovine *Staphylococcus aureus*-Isolate phänotypisch und genotypisch untersuchten. So detektierte CABRAL (2003) bei 98,9 % der betrachteten 87 bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolate *hla*, beobachtete jedoch nur bei 96,6 % der Isolate eine  $\alpha$ -Hämolyse. Das Hämolysin  $\beta$ -Gen wies der Autor bei 96,6 % der Isolate nach, eine  $\beta$ -Hämolyse zeigten aber nur 83,9 % der Staphylokokken. Weiterhin berichtete CABRAL (2003) von Isolaten, die eine  $\beta$ -Hämolyse ausbildeten, ohne *hnb* zu besitzen. EISSA (2007) detektierte *hla* bei 94,7 % der untersuchten *Staphylococcus aureus*-Kulturen, stellte jedoch nur bei 39,5 % eine  $\alpha$ -Hämolyse fest. Ebenso waren 31,5 % der von EISSA (2007) typisierten Kulturen *hnb*-positiv, ohne eine  $\beta$ -Hämolyse auszubilden.

Die Ergebnisse können zum einen auf die ausbleibende Expression der Gene unter den gegebenen Bedingungen zurückgeführt werden. Eine auf dem Agarmedium fehlende Expression ist dabei nicht unbedingt mit einer *in vivo* ausbleibenden Expression gleichzusetzen. Umgekehrt sagt die Ausbildung einer Hämolysezone auf dem Nährmedium lediglich aus, dass das entsprechende Gen vorhanden und funktionstüchtig ist, jedoch nicht, dass es auch im Euter exprimiert wird. Die Abwesenheit einer  $\delta$ -Hämolyse trotz der Anwesenheit des Gens *hld* kann außerdem dadurch erklärt werden, dass die schmale  $\delta$ -Hämolysezone durch gleichzeitig auftretende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolyse nicht erkennbar ist.

Das vereinzelte Auftreten einer Hämolyse ohne die Anwesenheit des jeweiligen Gens könnte auf Sequenzvariationen des Gens zurückzuführen sein, die die Anlagerung der DNA an die auf dem Array immobilisierte Sonde verhindern. Aufschluss in Bezug auf diesen Punkt würde eine PCR oder DNA-Sequenzierung geben.

Neben Unterschieden im Hämolyseverhalten divergierten die betrachteten Isolate auch hinsichtlich ihrer Pigmentierung. Die Pigmentierung der Staphylokokken wird durch membrangebundene Carotinoide verursacht, deren Hauptvertreter das orange Staphyloxanthin darstellt (CLAUDITZ et al. 2006). Staphyloxanthin fungiert als Antioxidationsmittel und verhindert die Reaktion mit reaktiven O<sub>2</sub>-Verbindungen, die im Rahmen der unspezifischen Abwehr vom wirtseigenen Immunsystem gebildet werden (LIU et al. 2008). LIU et al. (2005) konnten zeigen, dass Pigment-Mangelmutanten von *Staphylococcus aureus* im Gegensatz zum Wildtyp eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einem Angriff durch neutrophile Granulozyten aufwiesen.

Die Pigmentierung von *Staphylococcus aureus* kann durch die Zugabe bestimmter Substanzen zum Nährmedium beeinflusst werden. So führen z.B. fermentierbare Kohlenhydrate, NaCl und Glycerinmonoacetat, aber auch Kuhmilch zu einer stärker ausgeprägten Färbung der Kolonien (WILLIS et al. 1966). Dies könnte erklären, warum auf Äskulin-Agar gewachsene Kolonien grundsätzlich stärker pigmentiert waren als solche, die auf Columbia-Agar wuchsen. Der verwendete Äskulin-Agar enthält mehr NaCl als der verwendete Columbia-Agar, woraus die ausgeprägtere Pigmentierung resultieren könnte. Alternativ kommen auch die anderen Komponenten der Nährmedien als Ursache für die unterschiedliche Pigmentierung in Frage.

Sowohl die Hämolyse als auch die Pigmentierung von bovinen *Staphylococcus aureus*-Isolaten konnten in der vorliegenden Untersuchung in Zusammenhang mit dem CC der Isolate gebracht werden. Isolate eines CC verfügten grundsätzlich über einheitliche phänotypische Merkmale hinsichtlich Hämolyse und Pigmentierung. Insbesondere CC133 und CC398 setzten sich dabei deutlich von den anderen CC ab.

Zu CC133 zählende Staphylokokken waren auf Äskulin-Agar „hellgelb“ und verfügten mit Ausnahme eines Isolates über eine breite Zone vollständiger Hämolyse. Isolate, die zu CC398 gehörten, waren selbst auf Äskulin-Agar kaum pigmentiert und verfügten alle über eine doppelzonige Hämolyse. Sie unterschieden sich damit deutlich von CC151- und CC479-Isolaten, die zwar in aller Regel ebenfalls eine doppelzonige Hämolyse ausbildeten, aber als „maisgelb“ beurteilt wurden. Phänotypische Unterschiede zwischen CC398-MRSA und CC398-MSSA konnten nicht festgestellt werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die goldgelbe Pigmentierung der Kolonien ein wichtiges Identifikationsmerkmal für *Staphylococcus aureus* ist und eines der klassischen Kriterien darstellt, *Staphylococcus aureus* von Koagulase-negativen Staphylokokken zu unterscheiden (WIELAND et al. 1994), kann darüber spekuliert werden, ob die mangelnde Pigmentierung der CC398-Staphylokokken einen Selektionsvorteil darstellt, obwohl diese *Staphylococcus aureus* anfälliger gegenüber einem Angriff durch O<sub>2</sub>-Radikale sind. Werden *Staphylococcus aureus*-Isolate fälschlicherweise als Koagulase-negative Staphylokokken angesprochen, wird im Falle subklinischer Mastitiden seltener eine antibiotische Behandlung bzw. die Merzung des Tieres erfolgen. Beide Bekämpfungsmaßnahmen würden *Staphylococcus aureus* an einer weiteren Verbreitung hindern. Eine schwach ausgeprägte Pigmentierung könnte dem Erreger daher einen evolutionären Vorteil einbringen.

In jedem Fall sollte überprüft werden, ob die festgestellten CC-spezifischen Phänotypen auch in anderen Regionen existieren, da dies z.B. eine gezieltere Testung auf CC398 ermöglichen würde. Es

könnten dann bevorzugt Isolate gescreent werden, die von der klassischen goldgelben Pigmentierung abweichen.

Die festgestellten CC-spezifischen Phänotypen bestätigen weiterhin die Richtigkeit des verwendeten Verfahrens zur Auswahl der zu typisierenden Isolate. Um möglichst viele verschiedene CC zu detektieren, wurden bevorzugt Isolate unterschiedlicher Kolonimorphologie typisiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte lediglich angenommen werden, dass unterschiedliche CC hinsichtlich Hämolyse und Pigment variieren. Die Ergebnisse der Phänotypisierung bestätigen diese Vermutung.

### 5.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass in Thüringer Milchviehherden mindestens elf verschiedene CC von *Staphylococcus aureus* auftraten, die zwei epidemiologisch unterschiedlichen Typen zugerechnet werden konnten. Diese zwei *Staphylococcus aureus*-Typen unterschieden sich zum einen in ihrem Wirtsspektrum, darüber hinaus aber auch hinsichtlich der Ausstattung mit Virulenzfaktoren und Resistenzdeterminanten.

Der Großteil der typisierten Isolate gehörte den Komplexen CC133, CC151 und CC479 an. Diese drei CC konnten in 33 der 34 Betriebe detektiert werden, wobei sie bei 18 Herden die einzigen nachgewiesenen CC darstellten. Da CC133, CC151 und CC479 bisher nicht außerhalb des Rinder- bzw. Wiederkäuer-Euters gefunden wurden (HERRON-OLSON et al. 2007, SUNG et al. 2008, GUINANE et al. 2010), können diese CC als „euterassoziert“ betrachtet werden. Dagegen traten die acht anderen in der vorliegenden Untersuchung detektierten CC (CC7, CC9, CC20, CC45, CC50, CC97, CC101, CC398) vergleichsweise sporadisch auf. Im Gegensatz zu CC133, CC151 und CC479 besitzen diese CC ein breites Wirtsspektrum und kommen auch in der Umgebung der Tiere vor. Sie zeigen daher auch Charakteristika umweltassoziierter Keime.

Entsprechend den Ergebnissen der durchgeführten Studie kann durch den Nachweis von *lukF-P83/lukM* mit hoher Sicherheit zwischen beiden epidemiologischen Varianten unterschieden werden. Die Detektion dieser Genkombination in ausgewählten Isolaten eines Milchviehbestandes würde daher auf das Vorliegen „euterassoziierter“ *Staphylococcus aureus* hindeuten, während andernfalls „umweltassozierte“ *Staphylococcus aureus* am Infektionsgeschehen der Herde beteiligt wären.

Da die Microarray-Technologie ein sehr kostenintensives Verfahren darstellt, um den „Marker“ *lukF-P83/lukM* zu detektieren, wäre die Entwicklung eines preiswerten Schnelltests von Bedeutung. Statt des Gens könnte dabei ebenso das Genprodukt nachgewiesen werden, da gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von *lukF-P83/lukM* mit seiner Expression einhergeht. Ein solcher Schnelltest existiert bereits für das humanmedizinisch bedeutsame PVL (MONECKE et al. 2011b). Eine Modifizierung des Tests für den Nachweis eines dem PVL verwandten Zwei-Komponenten-Toxins sollte daher möglich sein.

Die durchgeführte Microarray-Untersuchung zeigte darüber hinaus, dass beide epidemiologischen Typen Unterschiede in der Ausstattung mit Resistenzdeterminanten aufwiesen. Sie unterschieden sich vor allem in der Anwesenheit des  $\beta$ -Laktamase-Gens *blaZ*, das bei lediglich 0,7 % der „euterassozierten“, aber bei 54,1 % der „umweltassozierten“ Isolate auftrat. Laut Ansicht einiger

Autoren geht die Anwesenheit von *blaZ* mit einer schlechteren Prognose für *Staphylococcus aureus*-infizierte Tiere einher (BARKEMA et al. 2006, HAVERI 2008).

Sowohl das unterschiedliche Wirtsspektrum als auch die unterschiedliche Ausstattung mit Resistenzdeterminanten, insbesondere *blaZ*, müssen bei der Konzeption von Sanierungsmaßnahmen zur Bekämpfung von *Staphylococcus aureus*-Euterinfektionen in einer Herde berücksichtigt werden. Daher ergeben sich für beide epidemiologischen Typen unterschiedliche Sanierungs-Schwerpunkte, die in Abb. 5 dargestellt werden.

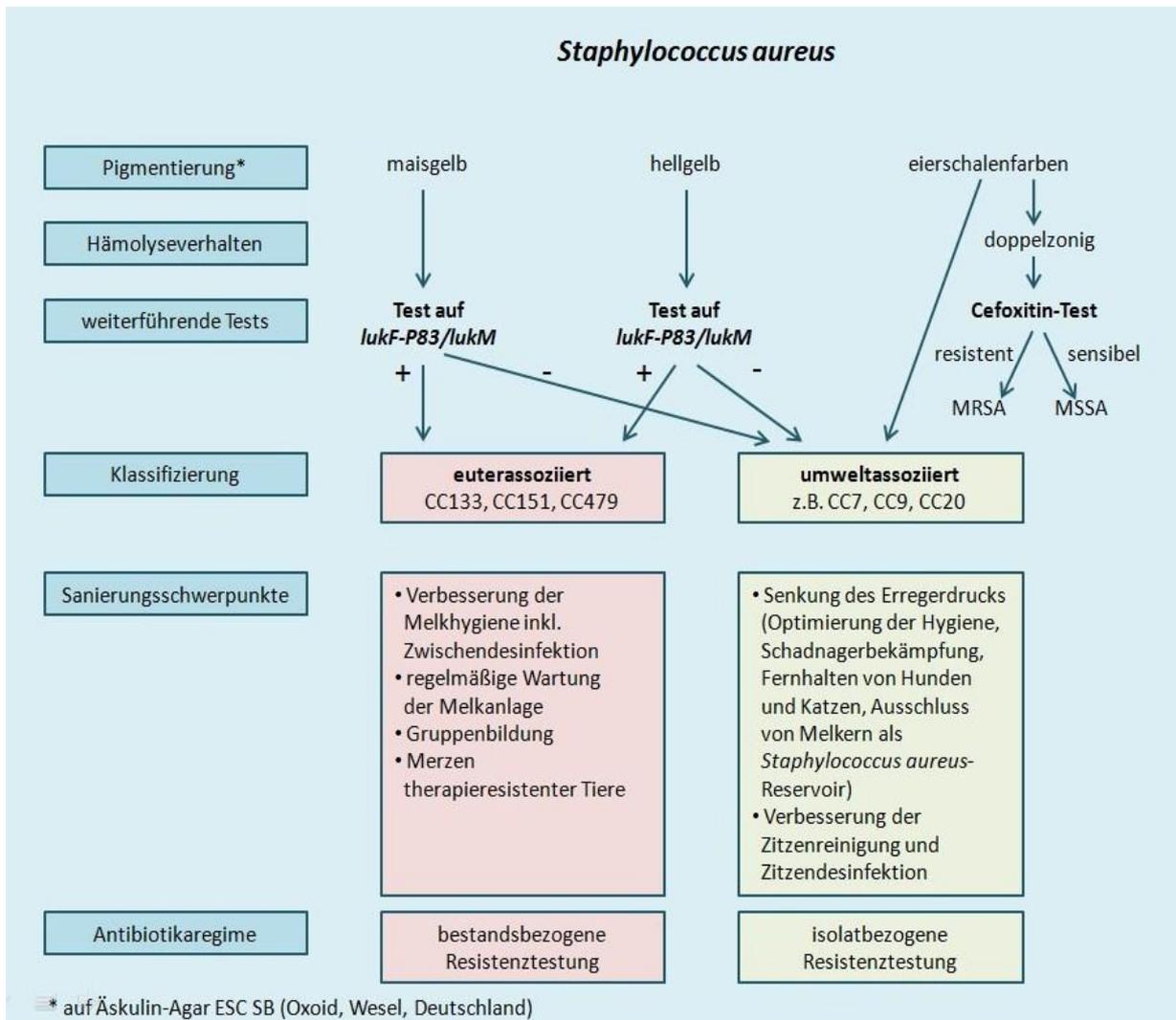
Als weitere wichtige Erkenntnis der vorliegenden Studie erwies sich die geringe MRSA-Prävalenz von *Staphylococcus aureus*-Isolaten aus Rohmilch, die vor allem aus lebensmittelhygienischer Sicht bedeutsam ist. Neben einer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verfügten die vier detektierten MRSA über eine Tetrazyklin-Resistenz, waren darüber hinaus jedoch nur mit wenigen weiteren Resistenzen ausgestattet. Wichtige humanmedizinisch relevante Pathogenitätsfaktor-Gene wie Enterotoxin-, Exfoliatin- oder PVL-Gene wurden in den vier Isolaten nicht nachgewiesen. Da die vorliegende Untersuchung nur subklinisch infizierte Tiere umfasst, sollten bei möglichen Folgestudien auch klinisch erkrankte Tiere berücksichtigt werden, um die Gültigkeit der dargestellten Sachverhalte auch für Isolate aus klinisch kranken Tieren zu überprüfen. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass klinische *Staphylococcus aureus*-Mastitiden hinsichtlich der Erregerverbreitung ein geringeres Problem darstellen als subklinische Euterinfektionen, da sie erkannt und bekämpft (Antibiotika-Therapie, Merzung) werden können.

Die Methicillin- bzw. Oxacillin-Resistenz der Isolate wurde im Agardiffusionstest nicht erkannt. Als Konsequenz dieser Beobachtung sollte zumindest bei Penicillin-resistenten Isolaten eine zusätzliche Testung auf Cefoxitin-Resistenz zum MRSA-Nachweis in Erwägung gezogen werden. Eine Penicillin-Resistenz wurde im durchgeführten Agardiffusionstest ebenso wie eine Resistenz gegenüber Tetrazyklinen sicher erkannt und auch bei Resistenzen gegenüber anderen Antibiotikagruppen lieferte der Agardiffusionstest gute Ergebnisse.

Lebensmittelhygienisch bedeutsam ist weiterhin die Ausstattung der untersuchten Staphylokokken mit Enterotoxin-Genen. Während die Gene von SED und SEE nicht nachgewiesen wurden, traten *seb* und *sec* bei 23 Isolaten auf. Ein weiteres Isolat verfügte über das SEA-Allel *sea-N315*, dessen Beteiligung bei humanen Lebensmittelintoxikationen fraglich ist. Damit hatten zumindest 12,2 % der typisierten *Staphylococcus aureus* das Vermögen, durch die Expression der Toxine Erkrankungen im Menschen hervorzurufen. Der Großteil der untersuchten 189 Isolate besaß jedoch lediglich die Gene des *egc*-Clusters, deren Zusammenhang mit gastrointestinalen Symptomen noch nicht eindeutig geklärt ist. In jedem Fall schützt der verantwortungsbewusste Umgang mit dem Lebensmittel Milch vor einer Vermehrung der Staphylokokken auf Keimzahlen von  $10^5$ /g und damit vor einer Toxinproduktion.

Diagnostisch nutzbar ist die Beobachtung, dass verschiedene CC sich phänotypisch voneinander unterschieden. Die typisierten Isolate divergierten zum einen hinsichtlich ihres Hämolyseverhaltens, wobei nur ein mäßiger Zusammenhang zwischen Hämolysezone und vorhandenen Hämolysin-Genen festgestellt wurde. Zum anderen unterschieden sich die Isolate in ihrer Pigmentierung. Abb. 5 zeigt

ein Diagnostik-Schema, das auf den Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung basiert. Es ist durch Ergebnisse von Folgestudien zu überprüfen und zu vervollständigen.



**Abb. 5:** Diagnostisches Flussdiagramm zur Identifizierung „euterassoziierter“ und „umweltassoziierter“ *Staphylococcus aureus* und resultierende Sanierungsschwerpunkte

Mit den dargelegten Ergebnissen könnte die durchgeführte Untersuchung dazu beitragen, das komplexe Geschehen der *Staphylococcus aureus*-Mastitis fassbarer zu machen.

## 6 Zusammenfassung

Anna Katharina Schlotter

Phänotypisierung und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*-Isolaten aus Rohmilchproben  
Thüringer Milchviehherden

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der  
Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2012

(91 Seiten, 18 Tabellen, 5 Abbildungen, 418 Literaturstellen, 10 Anhänge)

Schlüsselwörter:

*Staphylococcus aureus*, Mastitis, Microarray, Pathogenitätsfaktoren, Resistenzdeterminanten

*Staphylococcus aureus* ist einer der bedeutendsten Erreger boviner Mastitiden. Die Vielgestaltigkeit der Resistenzmuster und Virulenzfaktoren seiner Stämme macht ihn zu einem Problemkeim aus therapeutischer und prophylaktischer Sicht. Seine Fähigkeit zur Bildung hitzestabiler Enterotoxine verleiht ihm lebensmittelhygienische Relevanz. Mehrfachresistente Stämme stellen gefährliche Zoonose-Erreger dar. Ziel der durchgeführten Untersuchung war es daher, Aufschluss über Resistenzdeterminanten und Virulenzfaktoren der in Thüringer Milchviehherden vorkommenden *Staphylococcus aureus* zu erhalten, wobei eine Microarray-gestützte Genotypisierung zum Einsatz kam. Weiterhin sollte analysiert werden, ob der Genotyp der Isolate mit dem Phänotyp korreliert.

In 34 Thüringer Milchviehherden wurde der gesamte Bestand der laktierenden Kühe zweimal auf Basis von Viertelgemelksproben bakteriologisch untersucht. Die Beurteilung der Kulturen erfolgte im Nativausstrich nach 48-stündiger Bebrütung und zusätzlich nach Voranreicherung in einer Glucose-Bouillon mit anschließender 24-stündiger Bebrütung. *Staphylococcus aureus*-positiv waren 1902 von insgesamt 81 567 Milchproben. Aus diesen wurden 189 für die Herden repräsentative Isolate ausgewählt und mittels Microarray-Technologie umfassend charakterisiert und klassifiziert. Zudem wurde der Phänotyp der Isolate auf Äskulin- und Columbia-Blutagar erfasst und das Resistenzverhalten mittels Agardiffusionstest ermittelt.

Die 189 typisierten *Staphylococcus aureus* konnten elf verschiedenen klonalen Komplexen (CC) zugeordnet werden. Der Großteil der Isolate (80,4 %) zählte zu CC133, CC151 und CC479. Diese Isolate besaßen mit einer Ausnahme das Leukozidin-Gen *lukF-P83/lukM*. Die übrigen Isolate, die negativ auf *lukF-P83/lukM* getestet wurden, gehörten acht vergleichsweise sporadisch vorkommenden CC (CC7, CC9, CC20, CC45, CC50, CC97, CC101, CC398) an.

In nur 0,7 % der zu den drei dominanten CC zählenden Isolate war das  $\beta$ -Laktamase-Gen *blaZ* vorhanden, während es bei 54,1 % der sporadisch vorkommenden CC detektiert wurde. Das Methicillin-Resistenzgen *mecA* wurde bei lediglich vier Isolaten (2,1 %) nachgewiesen, die alle CC398 angehörten. Sie verfügten neben Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika über eine Tetrazyklin-Resistenz. Darüber hinaus wurde in einem Isolat das Makrolid/Lincosamid/Streptogramin-Resistenz vermittelnde *vgaA* und in einem Isolat das Aminoglykosid-Resistenz vermittelnde *aacA-aphD* detektiert. Humanmedizinisch relevante Enterotoxin-, Exfoliatin- oder PVL-Gene wurden in den vier Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) nicht gefunden. Im Agardiffusionstest zeigten diese Isolate eine Penicillin- und eine Tetrazyklin-Resistenz, jedoch keine Resistenz gegenüber Oxacillin, welches als MRSA-Marker gilt.

Die Gene der klassischen, humanmedizinisch bedeutsamen Enterotoxine A, B und C waren bei 12,7 % der Isolate vorhanden, wohingegen die Gene von Enterotoxin D und E nicht vorkamen. Insgesamt fanden sich Enterotoxin-Gene bei 78,3 % der typisierten *Staphylococcus aureus*, wobei die für Enterotoxin G, I, M, N, O und U kodierenden dominierten.

Phänotypisch unterschieden sich die CC bezüglich Hämolyse und Pigmentierung, wobei alle CC398-Isolate als eierschalenfarben mit doppelzoniger Hämolyse auftraten. Hämolysin-Gene besaßen alle Isolate, ein Zusammenhang zu den phänotypisch ausgeprägten Hämolysezonen bestand jedoch nicht.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass in Thüringer Milchviehbeständen zwei epidemiologisch unterschiedliche Varianten von *Staphylococcus aureus* existieren. Die in dieser Studie dominierenden, *lukF-P83/lukM*-positiven CC133, CC151 und CC479 verursachten einen Großteil der Infektionen und gelten als auf das Euter beschränkte Erreger. Sie können daher als „euterassoziiert“ angesehen werden. Dagegen verfügten die anderen in dieser Untersuchung detektierten, *lukF-P83/lukM*-negativen CC über Charakteristika „umweltassoziiertes“ Keime. Sie besitzen ein breites Wirtsspektrum und treten auch außerhalb des bovinen Euters in der Umgebung der Kühe auf. Die Prüfung auf *lukF-P83/lukM* erwies sich als zuverlässige Methode, zwischen beiden epidemiologischen Varianten zu unterscheiden. Folglich lässt die An- oder Abwesenheit dieser Genkombination einen Rückschluss auf die in der Herde verbreiteten CC zu. Das ermöglicht die Berücksichtigung der CC-spezifischen Erreger-Eigenschaften bei der Etablierung von Sanierungsprogrammen, die somit effizient gestaltet werden können.

MRSA waren in Thüringer Milchviehbeständen wenig verbreitet und nur schwach mit Resistenzdeterminanten und humanmedizinisch bedeutsamen Pathogenitätsfaktoren ausgestattet. Diese MRSA aus Rohmilchproben sind daher nicht mit multiresistenten Isolaten aus der Humanmedizin zu vergleichen.

Gene für humanmedizinisch relevante Enterotoxine, für die ein Zusammenhang mit Lebensmittelintoxikationen belegt ist, wurden selten, andere Enterotoxin-Gene jedoch häufig nachgewiesen.

## 7 Summary

Anna Katharina Schlotter

### **Phenotyping and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk of Thuringian dairy herds**

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in May 2012

(91 pages, 18 tables, 5 figures, 418 references, 10 appendices)

Keywords:

*Staphylococcus aureus*, mastitis, microarray, pathogenicity factors, resistance determinants

*Staphylococcus aureus* is one of the most important agents of bovine mastitis. The diversity of resistance pattern and virulence factors of the different strains makes this agent to a problematic germ in therapeutics and prophylaxis. Its ability to produce heat stable enterotoxins confers relevance in food hygiene. Multiresistant strains are dangerous zoonotic agents. Therefore, the aim of this study was to get information about resistance determinants and virulence factors of *Staphylococcus aureus* occurring in Thuringian dairy herds using microarray-based genotyping. Furthermore it should be analysed whether there are parallels between phenotype and genotype of the isolates.

In 34 Thuringian dairy herds all lactating cows were bacteriologically investigated twice based on quarter milk samples. The evaluation of cultures was done in smear of culture after 48 h of incubation and after an additional pre-enrichment in glucose bouillon with a following 24 h incubation period. Altogether 1,902 out of 81,567 milk samples were *Staphylococcus aureus* positive. Out of these, 189 isolates, which were representative of the herds, were selected and comprehensively characterized and classified using microarray technology. Furthermore the phenotype of the isolates was gathered on esculin and Columbia blood agar and their resistance to antibiotics was determined using agar diffusion test method.

The typed 189 *Staphylococcus aureus* isolates could be clustered into eleven different clonal complexes (CC). The majority of them (80.4 %) were counted among CC133, CC151, and CC479. Except one isolate these isolates harboured the leukocidin gene *lukF-P83/lukM*. The other ones, which were *lukF-P83/lukM*-negative, belonged to eight comparatively sporadically occurring CC (CC7, CC9, CC20, CC45, CC50, CC97, CC101, CC398).

Only 0.7 % of the three dominating CC possessed the  $\beta$ -lactamase gene *blaZ*, whereas the gene was detected in 54.1 % of the sporadically occurring CC. The methicillin resistance gene *mecA* was only found in four isolates (2.1 %), which all belonged to CC398. Besides resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics they also possessed a resistance to tetracyclines. Beyond that the macrolid/lincosamid/streptogramin-resistance gene *vgaA* was detected in one isolate and the aminoglycosid-resistance gene *aacA-aphD* was found in another isolate. Enterotoxin, exfoliatin or PVL genes, which are relevant in humane medicine did not occur in the four methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In agar diffusion tests these isolates showed a resistance to penicillin and tetracyclines, but no resistance to oxacillin, which is regarded as a marker for MRSA.

The genes encoding for the classical enterotoxins A, B, and C were detected in 12.7 % of the isolates, whereas the genes for enterotoxin D and E were not present. Altogether enterotoxin-genes were found in 78.3 % of typed *Staphylococcus aureus*, in which those encoding for enterotoxin G, I, M, N, O, and U dominated.

Phenotypically, the CC differed in haemolysis and pigmentation, whereas all CC398 isolates were eggshell coloured with a double haemolysis zone. Haemolysin genes were present in all of the isolates, but there was no connection to the phenotypically zones of haemolysis.

The current investigation demonstrates the existence of two epidemiological different variants of *Staphylococcus aureus* in Thuringian dairy herds. The dominating, *lukF-P83/lukM*-positive CC133, CC151, and CC479 were responsible for the majority of infections and are regarded as agents, which are restricted to the udder. Therefore, they can be considered as “udder associated”. In contrast, the other *lukF-P83/lukM*-negative CC detected in this study showed characteristics of “environmental associated” germs. They possessed a wide host range and were also present in the environment of the cows beyond the bovine udder. The test for *lukF-P83/lukM* proved to be a reliable method for the discrimination between the two epidemiological variants. Hence the presence or absence of this gene combination leads to conclusions to the CC in the herd. This offers the observance of the CC specific properties in the establishment of treatment programs, which thereby can be organized efficient.

MRSA were still present at a low level in Thuringian dairy herds and were rarely equipped with resistance determinants and pathogenicity factors, which show great importance in human medicine. Therefore they cannot be compared to multiresistant germs in human medicine.

Genes responsible for relevant enterotoxins in human medicine, which can be related to food poisoning, were detected rarely, other enterotoxin genes, however, were determined frequently.

## 8 Literaturverzeichnis

Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NHR, Elsberg CS, Jensen NE. Frequency of  $\alpha$ - and  $\beta$ -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. APMIS 1999;107:425–30.

Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler C, Wolter W, Zschöck M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8:959–64.

Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C. Glutathione transferases in bacteria. FEBS J. 2009;276:58-75.

Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 1996;79:1021–26.

Alt K, Fetsch A, Schroeter A, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, Senkov N, Geinets A, Mueller-Graf C, Braeunig J, Kaesbohrer A, Appel B, Hensel A, Tenhagen BA. Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany. BMC Vet Res. 2011;7:69.

Anderson JC. Mechanism of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. Br Vet J. 1976;132:229–45.

Anderson JC. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy. Vet Rec. 1982;110:372–6.

Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect. 1984;2:85–91.

Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins 2010;2:1751–73.

Argudin MA, Tenhagen BA, Fetsch A, Sachsenröder J, Käsbohrer A, Schroeter A, Hammerl JA, Hertwig S, Helmuth R, Bräunig J, Mendoza MC, Appel B, Rodicio MR, Guerra B. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. Appl Environ Microbiol. 2011;77:3052–60.

Asfour HAE, Darwish SH. Phenotypic and genotypic detection of both *mecA*- and *blaZ*-Genes mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis. Global Veterinaria 2011;6:39–50.

Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1, MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:157–9.

Atalla H, Gyles C, Mallard B. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 2010;143:319–28.

Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000;61:1–10.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:463–72.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 2006;89:1877–95.

Barrio M, Rainard P, Prévost G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin in bovine neutrophils. *Microbes infect.* 2006;8:2068–74.

Barto PB, Bush LJ, Adams GD. Feeding milk containing *Staphylococcus aureus* to calves. *J Dairy Sci.* 1982;65:271–4.

Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol.* 1989;171:4799–806.

Becker H, Bürk C, Märtlbauer E. Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. *J Verbr Lebensm.* 2007;2:171–89.

Becker K. Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen. Teil 2. Nachweis der Methicillin/Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiologie* 2004;14:41-50.

Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 1981;317:1017–21.

Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev.* 1991;55:733–51.

Bigger JW, Boland CR, O'Meara AR. Variant colonies of *Staphylococcus aureus*. *J Pathol Bacteriol.* 1927;30:261–9.

Blobel H, Schließer T. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/1 Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine. 2.Aufl. Stuttgart: Gustav-Fischer; 1994.

Boden MK, Flock JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 1989;57:2358–63.

Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol. 2003;41:767–71.

Bolourchi M, Hovareshti P, Tabatabayi AH. Comparison of the effects of local and systemic dry cow therapy for staphylococcal mastitis control. Prev Vet Med. 1995;25:63–7.

Borja CR, Fanning E, Huang IY, Bergdoll MS. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. J Biol Chem. 1972;247:2456–63.

Bownik A, Siwicki AK, Rymuszka A, Sieroslawska A. Influence of staphylococcal leukocidins on phagocyte and lymphocyte activity-a comparative study. Pol J Food Nutr Sci. 2004;13:5–8.

Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest. 2007;87:3–9.

Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 2002;164:116–28.

Brammer H. Untersuchungen zum Vorkommen von *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* in Tonsillen und Lymphknoten gesunder Kälber und Jungrinder unter Berücksichtigung der peripartalen Mastitis bei Erstkalbinnen [Dissertation med. vet]. Hannover: Stiftung Tierärztl. Hochschule Hannover; 1981.

Brentrup H. Euterinfektionen bei Erstkalbinnen: Vorkommen, Bedeutung, prophylaktische Maßnahmen. Tierärztl. Umschau 1998;53:15–8.

Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Genet. 1999;21:33–7.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV). Resistenzsituation von Tylosin. Bundesgesundheitsblatt 1998;41:91–2.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Menschen können sich über den Kontakt mit Nutztieren mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) infizieren. Stellungnahme Nr. 014/2009 des BfR vom 15. März 2009, <[www.bfr.bund.de/cm/343/menschen\\_koennen\\_sich\\_ueber\\_den\\_kontakt\\_mit\\_nutztieren\\_mit\\_mrsa\\_infizieren.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/menschen_koennen_sich_ueber_den_kontakt_mit_nutztieren_mit_mrsa_infizieren.pdf)>.

Burke FM, McCormack N, Rindi S, Speziale P, Foster TJ. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 2010;10:160.

Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1085–9.

Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LPN, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino L, Sordelli DO. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun*. 2007;75:886–91.

Cabral G. Phäno-und Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*, isoliert von Rindermastitiden aus dem Bundesstaat Sao Paulo [Diss med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 2003.

Capurro A, Aspán A, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Artursson K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *J Dairy Sci*. 2010;93:180–91.

Capurro A, Concha C, Nilsson L, Ostensson K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand*. 1999;40:315–21.

Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:781–91.

Chang HC, Bergdoll MS. Purification and some physiochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry* 1979;18:1937–42.

Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog*. 2010; 6:e1001036.

Choorit W, Kaneko J, Muramoto K, Kamio Y. Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or  $\gamma$ -hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett*. 1995;357:260–4.

Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun*. 2006;74:4950–3.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals. 3. Aufl. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.

Conceição T, de Sousa MA, de Lencastre H. Staphylococcal interspersed repeat unit typing of *Staphylococcus aureus*: Evaluation of a new multilocus variable-number tandem-repeat analysis typing method. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1300–8.

Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW. The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun*. 1993;61:768–71.

Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*. 1988;170:2954–60.

Craven N, Anderson JC. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. *J Dairy Res*. 1984;51:513–23.

Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trottonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004;72:2177–85.

Cuzin, M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus Clin Biol*. 2001;8:291-6.

Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, Ferreras M, Baba-Moussa L, Colin DA, Menestrina G, Bhakdi S, Prevost G. *Staphylococcus aureus* bicomponent gamma-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model*. 2005;45:1539-45.

Dancer SJ, Garratt R, Saldanha J, Jhoti H, Evans R. The epidermiolytic toxins are serine proteases. *FEBS Lett*. 1990;268:129–32.

Dale GE, Then RL, Stuber D. Characterization of the gene for chromosomal trimethoprim-sensitive dihydrofolate reductase of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1400–5

Daley MJ, Coyle PA, Williams TJ, Furda G, Dougherty R, Hayes PW. *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 beta and interleukin-2. *J Dairy Sci*. 1991;74:4413–24.

Davies PR, Wagstrom EA, Bender JB. Lethal necrotizing pneumonia caused by a ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1152.

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol*. 2009;134:52–6.

Deluyker HA, Van Oye SN, Boucher JF. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J Dairy Sci*. 2005;88:604–14.

de Neeling AJ, van den Broek MJM, Spalburg EC, van Santen-Verheuvél MG, Dam-Deisz WDC, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Huijsdens XW. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 2007;122:366–72.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. 2. Aufl. Gießen: Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; 2009.

Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, DeGraef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:1569–73.

Diehl JM, Staufenbiel T. Zusatzmodul “Exakte Tests”. In: Diehl JM, Staufenbiel T, Hrsg. Statistik mit SPSS, Version 10 + 11. 1. Aufl. Eschborn: Klotz; 2002. p. 688–92.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32:114–32.

Dinges MM, Orwin PO, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:16–34.

Dingwell RT, Leslie KE, Duffield TF, Schukken YH, DesCoteaux L, Keefe GP, Kelton DF, Lissemore KD, Shewfelt W, Dick P, Bagg R. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. *J Dairy Sci.* 2003;86:159–68.

Doery HM, Magnusson BJ, Cheyne IM, Gulasekharan J. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. *Nature* 1963;198:1091–2.

Duthie ES. Evidence for two forms of Staphylococcal coagulase. *J Gen Microbiol.* 1954;10:427–36.

Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bavles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun.* 1999;67:4673–8.

Eberhart RJ, LeVan PL, Griel LC Jr, Kessler EM. Germicidal teat dip in a herd with low prevalence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 1983;66:1390–5.

- Ehricht R, Adelhelm K, Monecke S, Huelseweh B. Application of protein arraytubes to bacteria, toxin, and biological warfare agent detection. In: Bilitewski U, Hrsg. Microchip Methods in Diagnostics. 1. Aufl. Berlin: Springer; 2009. p. 85–105.
- Eissa NMB. Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus*-Kulturen, isoliert von Rindermastitiden [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 2007.
- Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bächi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2295–7.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:7687–92.
- Erskine RJ, Bartlett PC, Crawshaw PC, Gombas DM. Efficacy of intramuscular oxytetracycline as a dry cow treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci. 1994;77:3347–53.
- Erskine RJ, Bartlett PC, Tavernier SR, Fowler LH, Walker RD, Seguin JH, Shuster D. Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: Efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation. J Dairy Sci. 1998;81:107–15.
- Essers L, Radebold K. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test. J Clin Microbiol. 1980;12:641–3.
- Fahrbach J. *In vitro* Aktivität von Fosfomycin gegenüber Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (MRSA) aus deutschen Intensivstationen [Dissertation med.]. Freiburg: Univ. Freiburg; 2010.
- Fehlings K, Wittkowski G, Deneke J. Vorkommen von Mastitis-Erregern in Bayern und ihre Resistenzeigenschaften. Vet-MedReport 2003;V4:6
- Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NPJ. How clonal is *Staphylococcus aureus*?. J Bacteriol. 2003;185:3307–16.
- Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. FEMS Microbiology Reviews 2008;32:23–37.
- Ferens WA, Bohach GA. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. J Lab Clin Med. 2000;135:225–30.
- Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000-2006. J Dairy Sci. 2007;90:5798–813.

Fernandes CJ, Fernandes LA, Collignon P. Cefoxitin resistance as a surrogate marker for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2005;55:506–10.

Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. Curr Infect Dis Rep. 2005;7:420–8.

Feßler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. Appl Environ Microbiol. 2011a;77:7151–7.

Feßler AT, Kadlec K, Schwarz S. Novel apramycin resistance gene *apmA* in bovine and porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2011b;55:373–5.

Feßler AT, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Analysis of bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 strains from cases of clinical mastitis. Proceedings der Tagung der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie; 2010 Jun 22-24; Jena, Deutschland. Gießen: DVG-Verlag;2010.

Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiol Infect. 1997;119:261–9.

Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J Bacteriol. 2001;183:63–70.

Fleischer B, Bailey CJ. Recombinant epidermolytic (exfoliative) toxin A of *Staphylococcus aureus* is not a superantigen. Med Microbiol Immunol. 1992;180:273–8.

Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber HU. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Res Vet Sci. 2008;85:439–48.

Fox LK, Gay JM. Contagious mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1993;9:475–87.

Freer JH, Birkbeck TH. Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. J Theor Biol. 1982;94:535–40.

Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15:60–4.

Friedrich A, Rau J, Horlacher S, Spohr M. Verbreitung von Methicillin-resistenten Staphylokokken in Tankmilch und Mastitismilchproben aus Nord-Württemberg. Tierärztl Umschau 2011;66:195–200.

Frick J. Prävalenz Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bayerischen Schweinebeständen [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2010.

Fritsche D. Untersuchungen zur Funktion des  $\beta$ -Hämolysins von *Staphylococcus aureus*. Zbl Bakt Hyg I Orig. 1970;213:348–55.

Fromageau A, Gilbert FB, Prévost G, Rainard P. Binding of the *Staphylococcus aureus* leukotoxin LukM to its leucocyte targets. Microb Pathog. 2010;49:354–62.

Frost AJ. Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. Infect Immun. 1975;12:1154–6.

Fueyo JM, Mendoza MC, Radicio MR, Muniz J, Alvarez MA, Martin MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with macrorestriction genomic profiles. J Clin Microbiol. 2005;43:1278–84.

Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. Acta Biochim Pol. 2001;48:615–22.

Ganesh VK, Rivera JJ, Smeds E, Ko YP, Bowden MG, Wann ER, Gurusiddappa S, Fitzgerald JR, Höök M. A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interactions opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. PLoS Pathog. 2008;4:e1000226.

Gatermann S, Miksits K. Staphylokokken. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6.Aufl. Heidelberg: Springer; 2009.

Geiss HK, Mack D, Seifert H. Konsensuspapier zur Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und Interpretation von Ergebnissen der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern. Mikrobiologe 2003;13:222–39.

Gilbert I. Dissociation in an encapsulated staphylococcus. J Bacteriol. 1931;21:157–60.

Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC, Oliver SP. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. J Dairy Sci. 1999;82:1581–5.

Gillespie BE, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Lewis MJ, Ivey SJ, Hallberg JW, Chester ST, Oliver SP. Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of

environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. *Vet Ther.* 2002;3:373–80.

Gill SR. Genomics of the staphylococci. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Vowler Jr VG, Hrsg. *Staphylococci in human disease*. 2. Aufl. West Sussex: Blackwell; 2009. p. 19–30.

Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol.* 2002;20:4060–7.

Gilot P, van Leeuwen W. Comparative analysis of *agr* locus diverfication and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1265-9.

Godden SM, Jansen JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *Can Vet J.* 2002;43:38–42.

Godden SM, Lago A, Bey R, Leslie K, Ruegg P, Dingwell R. Use of on-farm culture systems in mastitis control programs. Proceedings of the National Mastitis Council annual regional meeting; 2007 Mai 22-23; Visalia, USA. Madison: National Mastitis Council; 2007.

Goerke C, Wirtz C, Flückiger U, Wolz C. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaption to the human host during infection. *Mol Microbiol.* 2006;61:1673–85.

Goerke C, Wolz C. Der Virulenzregulator *agr* von *Staphylococcus aureus*: Bedeutung in Pathogenese und Epidemiologie. *Hyg Mikrobiol.* 2004;8:75–80.

Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7:1269–77.

Graber HU, Naskova J, Studer E, Kaufmann T, Kirchhofer M, Brechbühl M, Schaeren W, Steiner A, Fournier C. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci.* 2009;92:1442–51.

Graber HU, Casey MG, Naskova J, Steiner A, Schaeren W. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis milk. *J Dairy Sci.* 2007;90:4661–9.

Granz S. Aufbau und Arbeitsweise tierischer Organe. In: Weiß J, Papst W, Strack KE, Granz S, Hrsg. *Tierproduktion*. 13. Aufl. Stuttgart: Parey; 2005. p. 9–81.

Greene WA, Gano AM, Smith KL, Hogan JS, Todhunter DA. Comparison of probiotic and antibiotic intramammary therapy of cattle with elevated somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 1991;74:2976–81.

Guinane CM, BenZakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaption. *Genome Biol Evol.* 2010;2:454–66.

Hajek V, Marsalek E. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralbl Bakteriol Orig A.* 1971;217:176–82.

Hamann J. Zum Erreger- und Entzündungsnachweis im Rahmen der Mastitisdiagnostik – Befunderhebung und Konsequenzen für Bekämpfungsmaßnahmen der bovinen Mastitis. *Prakt Tierarzt.* 2003;5:381–8.

Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 1994;77:2103–12.

Hasman H, Moodley A, Guardabassi L, Stegger M, Skov RL, Aarestrup FM. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle, and poultry. *Vet Microbiol.* 2010;141:326–31.

Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J Clin Microbiol.* 2010a;48:2130–9.

Hata E, Kobayashi H, Nakajima H, Shimizu Y, Eguchi M. Epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cows of a dairy farm in Japan. *J Vet Med Sci.* 2010b;72:647–52.

Hauschild T, Feßler AT, Kadlec K, Billerbeck C, Schwarz S. Detection of the novel *vga(E)* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from cattle and poultry. *J Antimicrob Chemother.* 2011; doi: 10.1093/jac/dkr446.

Haveri M. *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection: molecular, clinical and epidemiological characteristics. [Dissertation med. vet]. Helsinki: Univ. Helsinki; 2008.

Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol.* 2007;103:993–1000.

Haveri M, Taponen S, Vuopio-Varkila J, Salmenlinna S, Pyörälä S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Clin Microbiol.* 2005;43:959–61.

Hébert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiol Lett. 2000;193:57–62.

Hébert GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J Clin Microbiol. 1985;22:409–15.

Heller MJ. DNA Microarray technology: devices, systems, and applications. Annu Rev Biomed Eng. 2002;4:129–53.

Hensen SM, Pavčić MJAMP, Lohuis JACM, Poutrel B. Use of bovine mammary epithel cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. J Dairy Sci. 2000; 83:418–29.

Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE. 2007;2: e1120.

Heeschen W. Milch als Lebensmittel. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer; 1994. p. 138–80.

Hobbs BC. Food-poisoning and food hygiene. Br Med Bull. 1951;7:167–70.

Hoedemaker M, Korff B, Edler B, Emmert M, Bleckmann E. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2001;48:373–83.

Hoedemaker M, Mansfeld R, de Kruif A. Eutergesundheit und Milchqualität. In: de Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, Hrsg. Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007. p. 72–104.

Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. J Dairy Sci. 1988;71:2520–5.

Holtfreter S. Immunantwort gegen Superantigene bei *Staphylococcus aureus* Carriern. [Dissertation rer. nat.] Greifswald: Univ. Greifswald; 2006.

Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis. 2001;7:337–41.

Huber H, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Genotypes, antibiotic resistance profiles and microarray-based characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from livestock and veterinarians in Switzerland. Zoonoses Public Health 2011;58:343–9.

Hu DL, Zhu G, Mori F, Omoe K, Okada M, Wakabayashi K, Kaneko S, Shinagawa K, Nakane A. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell Microbiol.* 2007;9:2267–77.

Jacherts D. Experimentelle Untersuchungen über die Identität freier und gebundener Koagulase. *Z Hyg Infektionskr.* 1956;142:502–9.

Janssen J, Laatz W. Exakte Tests. In: Janssen J, Laatz W, Hrsg. *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*. 6. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2007. p. 797–802.

Janzon L, Arvidson S. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 1990;9:1391–9.

Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AMS, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, Muir TW, Novick RP. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000;182:6517–22.

Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70:631–41.

Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougél C, Etienne J, Vandenesch F, Boneville M, Lina G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a outative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2001;166:669–77.

Jin J, Guffanti AA, Bechhofer DH, Krulwich TA. Tet(L) and Tet(K) tetracycline-divalent metal/H-antiporters: Characterization of multiple catalytic modes and a mutagenesis approach to differences in their efflux substrate and coupling ion preferences. *J Bacteriol.* 2002;184:4722–32.

Jokiel J. Untersuchungen zur Sanierung von *Staphylococcus aureus*-Mastitiden mittels stallspezifischer Vakzinen in Schaf- und Ziegenherden. [Dissertation med. vet]. Hannover: Stiftung Tierärztl. Hochschule Hannover; 2009.

Jones CL, Khan SA. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1986;166:29–33.

Jones GM, Pearson RE, Clabaugh GA, Heald CW. Relationships between somatic cell counts and milk production. *J Dairy Sci.* 1984;67:1823–31.

Jones T, Ohnstad I. Milking procedures recommended for the control of bovine mastitis. *In Practice* 2002;24:502–11.

Jørgensen HJ, Mathisen T, Løvseth A, Omoe K, Qvale KS, Loncarevic S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;252:267–72.

Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, Dán A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, Wagenaar JA. MRSA transmissions between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:630–2.

Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:1156–64.

Kadlec K, Schwarz S. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:776–8.

Kadlec K, Schwarz S. A novel ABC-transporter, *Vga(C)*, for combined resistance to streptogramin A antibiotics, lincosamides und pleuromutilins from a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate. Proceedings der Tagung der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie; 2010 Jun 22-24; Jena, Deutschland. Gießen: DVG-Verlag; 2010.

Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:981–1003.

Kaneko J, Muramoto K, Kamio Y. Gene of LukF-PV-like component of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM. *Biosci Biotech Biochem.* 1997;61:541–4.

Kapral FA, Miller MM. Product of *Staphylococcus aureus* responsible for the scalded-skin syndrome. *Infect Immun.* 1971;4:541–5.

Kapur V, Sischo WM, Greer RS, Whittam TS, Musser JM. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol.* 1995;33:376–80.

Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1988;56:1090–5.

Kenny K, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1993;31:706–7.

Keil NM, Audigé L, Langhans W. Factors associated with intersucking in Swiss dairy heifers. *Prev Vet Med.* 2000;45:305–23.

Keil NM, Langhans W. The development of intersucking in dairy calves around weaning. *Appl Anim Behav Sci.* 2001;72:295–308.

Kerro Deogo O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart.* 2002;24:181–98.

Kietzmann M. Rückstände von Stoffen mit pharmakologischer Wirkung. In: Nau H, Steinberg P, Kietzmann M, Hrsg. *Lebensmitteltoxikologie. Rückstände und Kontaminanten: Risiko und Verbraucherschutz.* 1. Aufl. Berlin: Blackwell; 2003. p. 119–48.

Kloos WE, Schleifer KH. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Hrsg. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* 2. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986. p. 1013–35.

Klotz K, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluoreszenz PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4683–7.

Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg RH, Voss A, Becker K, Friedrich AW. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:1375–82.

Kodadek T. Protein microarrays: prospects and problems. *Chem Biol.* 2001;8:105–15.

Koskinen MT, Holopainen J, Pyörälä S, Bredbacka P, Pitkälä A, Barkema HW, Bexiga R, Roberson J, Sølverød L, Piccinini R, Kelton D, Lehmusto H, Niskala S, Salmikivi L. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 2009;92:952–9.

Kroker R, Scherkl R, Ungemach FR. Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Frey HH, Löscher W, Hrsg. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Parey; 2002. p. 353–93.

Krömker V. Vorgehensweise bei *Streptococcus uberis*. *Proceedings Berlin Brandenburgischer Rindertag;* 2010 Okt 1-9; Berlin, Deutschland. Göttingen: Cuvillier; 2010.

Krömker V. Euterkrankheiten. In: Krömker V, Hrsg. *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene.* 1. Aufl. Stuttgart: Parey; 2007a. p. 47–74.

Krömker V. Melken. In: Krömker V. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. 1. Aufl. Stuttgart: Parey; 2007b. p. 23–46.

Krömker V. Staphylokokken als Mastitiserreger aus Sicht der Epidemiologie. Proceedings des 2. MBFG-Arbeits-Treffens. Mastitiden verursacht durch Staphylokokken; 2009 Okt 30; Hannover.; 2009

Krömker V, Hauptmann T, Bormann A. Bakteriologische Diagnostik von Viertelanfangsgemelks- und Herdensammelmilchproben zum Nachweis von Mastitiserregern mit Petrifilm. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2007;114:378–83.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001;357:1225-40.

Kuusela P. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. Nature 1978;276:718–20.

Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;39:181–9.

Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin Microbiol Rev. 1999;12:224–42.

Lam TJ, Pengov A, Schukken YH, Smit JA, Brand A. The differentiation of *Staphylococcus aureus* from other *Micrococcaceae* isolated from bovine mammary glands. J Appl Bacteriol. 1995;79:69–72.

Lam TJ, van Wuijckhuise LA, Franken P, Morselt ML, Hartman EG, Schukken YH. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc. 1996;208:1705–8

Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 2008;6:132.

Lammers A, Nuijten PJM, Kruijt E, Stockhofe-Zurwieden N, Vecht U, Smith HE, van Zijderveld FG. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine gland cell cultures. Vet Microbiol. 1999a;67:77–89.

Lammers A, Nuijten PJM, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. FEMS Microbiol Lett. 1999b;180:103–9.

Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen ND. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and  $\beta$ -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol.* 2002;85:61–7.

Larsen HD, Huda A, Eriksen NH, Jensen NE. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol.* 2000;76:153–62.

Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34:482–92.

Lee KY, Birkbeck TH. *In vitro* synthesis of the delta-lysin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1984;44:434–38.

Leitner G, Yadlin B, Glickman A, Chaffer M, Saran A. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci.* 2000;69:181–4.

Leitner G, Lubashevsky E, Glickman A, Winkler M, Saran A, Trainin Z. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;93:31–8.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 2003;95:38–43.

Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M, Skov RL. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1383–9.

Lindmark R, Movitz J, Sjöquist J. Extracellular protein a from a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem.* 1977;74:623–8.

Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 2004;12:378–85.

Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 1998;29:527–43.

Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield E. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 2008;319:1391–4.

Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 2005;202:209–15.

- Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557–84.
- Loeffler DA, Creasy MT, Norcross NL, Paape MJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of leukocidin toxin from *Staphylococcus aureus* in bovine milk samples. *J Clin Microbiol.* 1988;26:1331-4.
- Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kehl BC, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* 2010;6: e1000715.
- Loir YL, Baron K, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2003;2:63-76.
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003;111:1265–73.
- Luczak-Kadlubowska A, Krzyszton-Russjan J, Hryniewicz W. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996-2004 that were deficient in species-specific proteins. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4018–24.
- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987;51:88–134.
- Makovec JA, Ruegg PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* 2003;86:3466–72.
- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:231–8.
- Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *J Dairy Sci.* 1991;74:1544–9.
- Matissek R, Steiner G, Fischer M. *Lebensmittelanalytik*. 4. Aufl. Berlin/Heidelberg: Springer; 2010.
- Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci.* 1993;55:297–300.
- McCarron JL, Keefe GP, McKenna SLB, Dohoo IR, Poole DE. Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 2009;92:2297–305.

McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variations in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. BMC Microbiol. 2010;10:173.

McDewitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Höök M. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem. 1997;247:416–24.

McDewitt D, Vaudaux P, Foster TJ. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. Infect Immun. 1992;55:165–99.

Meemken D, Cuny C, Witte W, Eichler U, Staudt R, Blaha T. Zum Vorkommen von MRSA bei Schweinen und bei Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein – Erste Ergebnisse einer Studie in Nordwestdeutschland. Deut Tierärztl Woch. 2008;115:132–9.

Melchior MB, van Osch MHJ, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, Gaastra W, Fink-Gremmels J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. Vet Microbiol. 2009;137:1–2.

Melly MA, Luke LJ, Lian DF, Hash JH. Biological properties of the encapsulated *Staphylococcus aureus* M. Infect Immun. 1974;10:389–97.

Merk S, Martin D. Der Einsatz von Mikroarrays zur Analyse der Genexpression in der Tiermedizin. Berl Münch Tierärztl Wochenschrift 2008;121:179–88.

Meyer W. A proposal for subdividing the species *Staphylococcus aureus*. Int J Syst Bacteriol. 1967;17:387–9.

Middleton JR, Fox LK. Influence of *Staphylococcus aureus* strain on mammary quarter milk production. Vet Rec. 2002;150:411–3.

Middleton JR, Fox LK, Gay JM, Tyler JW, Besser TE. Influence of *Staphylococcus aureus* strain-type on mammary quarter milk somatic cell count and milk N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies. J Dairy Sci. 2002;85:1133–40.

Middleton JR, Fox LK, Smith TH. Management strategies to decrease the prevalence of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a dairy herd. J Am Vet Med Assoc. 2001;218:1615-8.

Middleton JR, Luby CD, Adams DS. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. Vet Microbiol. 2009; 134:192–8.

Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001;55:165–99.

Monday SR, Vath GM, Ferens WA, Deobald C, Rago JV, Gahr PJ, Monie DD, Iandolo JJ, Chapes SK, Davis WC, Ohlendorf DH, Schlievert PM, Bohach GA. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J Immunol.* 1999;162:4550–9.

Monecke S, Berger-Bächi B, Coombs C, Holmes A, Kay I, Kearns A, Linde HJ, Ó'Brien F, Slickers P, Ehricht R. Comparative genomics and DNA-array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin. *Clin Microbiol Infect.* 2007b;13:236–49.

Monecke S, Buechler J, Ehricht R. Measuring *S. aureus* exotoxin concentration using protein microarrays with antibodies generated by phage display. Proceedings of the 21st European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)-Congress; 2011 Mai 7-10; Mailand, Italien: 2011b [Poster].

Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip Margaret, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehricht R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011a;6:e17936.

Monecke S, Ehricht R. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:825–33.

Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol.* 2007a;125:128–40.

Monecke S, Luedicke C, Slickers P, Ehricht. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:1159–65.

Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Charakterisierung von MRSA-Isolaten mit diagnostischen DNA-Microarrays. *Mikrobiologie* 2008a;18:107–14.

Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008b;53:237-51.

Moore PC, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2760–7.

Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol.* 2007;124:66–72.

Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol.* 2003;47:81–90.

Mørk T, Tollersrud T, Kvitle B, Jørgensen HJ, Waage S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3979–84.

Morschhäuser J. Regulation virulenzassoziierter Gene. In: Hacker J, Heesemann J, Hrsg. *Molekulare Infektionsbiologie*. 2. Aufl. Berlin: Spektrum akademischer Verlag; 2008. p. 111–125.

Movitz J. Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem.* 1976;68:291-9.

Müller HP, Litke MO, Blobel H. Protein A-Aktivität von Staphylokokken unterschiedlicher tierartlicher Herkunft mit Immunglobulin G von Haus- und Versuchstieren, sowie vom Menschen. *Zbl Vet Med.* 1983;30:305–12.

Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun.* 2001;69:45–51.

Muñoz-Bellido JL, Alonso Manzanares MA, Martínez Andrés JA, Gutiérrez Zufiaurre MN, Ortiz MG, Segovia Hernández M, García-Rodríguez JA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:354–6.

Munson SH, Tremaine MT, Beteley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1998;66:3337–48.

Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvela-Koski V, Honkanen-Buzalski T, Junttilla J, Kulkas L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M, Saranpaa T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet Scand.* 1998;39:119–26.

Naidu TG, Newbould FH. Significance of beta hemolytic *Staphylococcus aureus* as a pathogen to the bovine mammary gland. *Zbl Vet Med B.* 1975;22:305–17.

Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, Lim SK. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8:231–8.

National Mastitis Council (NMC). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. 1. Aufl. Madison: National Mastitis Council; 1999.

Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci. 1969;52:696–707.

Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. J Dairy Sci. 1995;78:1607–18.

Nickerson SC, Owens WE, Fox LK, Scheifinger CC, Shryock TR, Spike TE. Comparison of tilmicosin and cephalixin as therapeutics for *Staphylococcus aureus* mastitis at dry-off. J Dairy Sci. 1999;82:696-703.

Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 1998;30:245-57.

Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, Rydén C, Tarkowski A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. Infect Immun. 1997;65:4216–21.

Noda M, Kato I, Matsuda F, Hirayama T. Mode of action of staphylococcal leukocidin: Relationship between binding of <sup>125</sup>I-labeled S and F components of leukocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes and leukocidin activity. Infect Immun. 1981;34:362–7.

Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol. 2003a;48:1429–49.

Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 2003b;49:93–105.

Ogston A. *Micrococcus* poisoning. J Anat Physiol. 1882;17:24–58.

Ohlsen K, Eckart M, Hüttinger C, Ziebuhr W. Pathogenic staphylococci: Lessons from comparative genomics. In: Hacker J, Dobrindt U, Hrsg. Pathogenomics. Genome analysis of pathogenic microbes. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p. 175–210.

Ohlsen K, Koller KP, Hacker J. Analysis of expression of the alpha-toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla::lacZ* gene fusion. Infect Immun. 1997;65:3606–14.

Ollis GW, Rawluk SA, Schoonderwoerd M, Schipper C. Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. Can Vet J. 1995;36:619–23.

Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol Lett. 2005a;246:191–8.

Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Fugane Y, Abe Y, Hamaoka S, Watanabe Y, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. Infect Immun. 2005b;73:5540–6.

Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J Clin Microbiol. 2002;40:857–62.

Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun. 2008;76:4999–5005.

Orden JA, Goyache J, Hernández J, Doménech A, Suárez G, Gómez-Lucia E. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. J Appl Bacteriol. 1992;72:486–9.

O’Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 2004;17:218–34.

Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. Infect Immun. 2003;71:2916–9.

Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immun. 2001;69:360–6.

Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. Peptides 2001; 22:1603–8.

Owens WE, Ray CH, Boddie RL, Nickerson SC. Antibiotic treatment of mastitis: Comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. J Dairy Sci. 1988;71:3143–7.

Owens WE, Oliver SP, Gillespie BE, Ray CH, Nickerson SC. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. Am J Vet Res. 1998;59:1122–4.

Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. J Biol Chem. 2006;281:1179–87.

Pankey JW, Nickerson SC, Boddie RL, Hogan JS. Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. J Dairy Sci. 1985;68:2684–93.

Parsonnet J, Hansmann MA, Seymour JL, Delaney ML, DuBois AM. Persistence survey of toxic shock syndrome toxin-1 producing *Staphylococcus aureus* and serum antibodies to this superantigen in five groups of menstruating women. *BMC Infec Dis*. 2010;10:249.

Patel AH, Foster TJ, Pattee PA. Physical and genetical mapping of the protein A gene in the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol*. 1989;135:1799–1807.

Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Nagel R, Odierno L, Primo V, Bogni C. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2008;127:186–90.

Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1988;179:4365–72.

Phillips WE, Kloos WE. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1981;14:671–3.

Philpot WN. Control of mastitis by hygiene and therapy. *J Dairy Sci*. 1979;62:168–76.

Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci*. 2001;84:1140–8.

Piemont Y, Rifai S, Monteil H. Les exfoliatines de *Staphylococcus aureus*. *Bull Inst Pasteur*. 1988;86:263–9.

Piepers S, de Meulemeester L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, de Vliegher. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res*. 2007;74:478-83.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*. 2004;87:2433-41.

Pitkälä A, Salmikivi L, Bredbacka P, Myllyniemi AL, Koskonen MT. Comparison of tests for detection of  $\beta$ -lactamase-producing staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2031-3.

Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier JM. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol*. 1988; 26:38-40.

Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piemont Y. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*. 1995;63:4121-9.

Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*. 2003;34:565–78.

Pyörälä S. Treatment of mastitis during lactation. *Ir Vet J*. 2009;62:40–4.

Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Mastitis caused by contagious pathogens. In: Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, Hrsg. *Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9. Aufl. London: Saunders; 2000. p. 626–38.

Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/lukF'–PV leucotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:272–7.

Raj HD, Bergdoll MS. Effect of enterotoxin B on human volunteers. *J Bacteriol*. 1969;98:833–4.

Rankin S, Roberts S, O'Shea K, Maloney D, Lorenzo M, Benson CE. Panton Valentine leucocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Vet Microbiol*. 2005;108:145–8.

Recsei P, Kreiswirth M, O'Reilly M, Schlievert P, Guss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet*. 1986;202:58–61.

Ren K, Bannan JD, Panchli V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA, Zabriskie JB. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J Exp Med*. 1994;180:1675–83.

Riemelt I, Bartel B, Malczan M. *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. 2. Aufl. Hamburg: Behr's; 2003.

Rifai S, Barbançon V, Prévost G, Piemont Y. Synthetic exfoliative toxin A and B DNA probes for detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1989;27:504–6.

Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2584–9.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Besser TE. Evaluation of methods for the differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 1992;30:3217–9.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci*. 1994;77:3354–64.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Besser TE. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J Dairy Sci*. 1998;81:687–93.

- Rogolsky M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev. 1979;43:320–60.
- Rouch DA, Byrne ME, Kong YC, Skurray RA. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. J Gen Microbiol. 1987;133:3039–52.
- Rutland BE, Weese JS, Bolin C, Au J, Malani AN. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2009;15:1328–30.
- Ruzin A, Lindsay J, Novick RP. Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2001;41:365–77.
- Ryden C, Rubin K, Speziale P, Höök M, Lindberg M, Wadström T. Fibronectin receptors from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 1983;258:3396–401.
- Salam H, Seedy FE, Klengel K, Monecke S, Ehricht R, Tomaso H, Hotzel H. Untersuchungen zum Vorkommen von Staphylokokken in einem Milchvieh-Bestand. Proceedings der DVG-Tagung „Bakteriologie und Mykologie“; 2010 Jun 22-24; Jena, Deutschland. Gießen: DVG-Verlag; 2010.
- Salasia SIO, Khusnan Z, Lämmler C, Zschöck M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. J Vet Sci. 2004;5:103–9.
- Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. J Dairy Res. 2009;76:129–36.
- Sau S, Bhasin N, Wann ER, Lee JC, Foster TJ, Lee CY. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. Microbiol. 1997;143:2395–405.
- Schalm OW. *Streptococcus agalactiae* in udders of heifers at parturition traced to sucking among calves. Cornell Vet. 1942;32:49.
- Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet Microbiol. 2004;101:101–7.
- Schreiner DA, Ruegg PL. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. J Dairy Sci. 2003;86:3460–5.
- Schröder A, Hoedemaker M, Klein G. Resistance of mastitis pathogens in northern Germany. Berl Münch Tierarztl Wochenschr. 2005;118:393–8.

- Schuberth HJ, Krueger C, Zerbe H, Bleckmann E, Leibold W. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Vet Microbiol.* 2001;82:187–99.
- Schulz J. Grundsätze. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena/Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994. p. 226–301.
- Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res.* 2001;32:201–25.
- Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:282–5.
- Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci.* 1990;73:2785–9.
- Seffner W, Bergmann A. Staphylokokken-Infektionen. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena/Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994. p. 349–59.
- Seffner W, Schulz J. Pathogenese. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena/Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994. p. 238–44.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M, Mayr A, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und /Seuchenlehre. 8. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2006. p. 393–558.
- Shands KN, Schmid GP, Dan BB, Blum D, Guidotti RJ, Hargrett NT, Anderson RL, Hill DL, Broome CV, Band JD, Fraser DW. Toxic-shock syndrome in menstruating women – association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. *N Engl J Med.* 1980;303:1436–42.
- Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol.* 2003;41:456–9.
- Silva BO, Caraviello DZ, Rodrigues AC, Ruegg PL. Evaluation of petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 2005;88:3000–8.
- Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cell Microbiol.* 1999;1:101–17.
- Sjöquist J, Movitz J, Johansson IB, Hjelm H. Localization of protein A in the bacteria. *Eur J Biochem.* 1972;30:190–4.

Skalka B, Smola J, Pillich J. A simple method of detecting staphylococcal hemolysins. Zentralbl Bakteriol Orig A. 1979;245:283–6.

Smeltzer MS, Lee CY, Havik N, Hart ME. Molecular basis of pathogenicity. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler VG Jr., Hrsg. Staphylococci in human disease. 2. Aufl. West Sussex: Blackwell; 2009. p. 65–108.

Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Dowson CG. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005a;43:4731–6.

Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 2005b;43:4737–43.

Smith KL, Hogan JS. Environmental mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 1993;9:489–98.

Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Enright MC, Smyth CJ. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 2009;58:1343–53.

Sobiraj A, Kron A, Schollmeyer U, Failing K. Bundesweite Untersuchungen zur Erregerverteilung und *in vitro* Resistenz euterpathogener Bakterien in der Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis. Tierärztl Prax. 1997;25:108–15.

Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken YH. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci 2000;83:278–84.

Sol J, Sampimon OC, Snoep JJ, Schukken YH. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci. 1997;80:2803–8.

Somerville GA, Proctor RA. The biology of staphylococci. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler Jr VG, Hrsg. Staphylococci in human disease. 2. Aufl. West Sussex: Blackwell; 2010. p. 3–18.

Sommerhäuser J. Untersuchungen mittels Geno- und Phänotypisierung zur Epidemiologie von *Staphylococcus aureus* als Erreger subklinischer Mastitiden in hessischen Milcherzeugerbetrieben im Zuge von Bestandssanierungsmaßnahmen. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2001.

Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. Vet Microbiol. 2003; 96:91–102.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503–17.

Spittel SS, Bohlsen E, Hoedemaker M. Möglichkeiten und Grenzen der PCR im Mastitis-Erreger-Monitoring. Proceedings des bpt-Kongresses; 2011 Sep 22-25; Mainz, Deutschland. Frankfurt am Main: bpt Akademie GmbH; 2011.

Spohr M. Praktische Erfahrungen mit dem Nachweis von Mastitiserregern mittels PCR-Schnelltest. Proceedings der 12. Jahrestagung der Wissenschaftlichen Gesellschaft der Milcherzeugerberater; 2011 Okt 4-6; Aulendorf, Deutschland.

>[http://www.wgmev.de/download-verzeichnis/doc\\_details/180-praktische-erfahrungen-mit-dem-nachweis-von-mastitiserregern-mittels-pcr-schnelltest](http://www.wgmev.de/download-verzeichnis/doc_details/180-praktische-erfahrungen-mit-dem-nachweis-von-mastitiserregern-mittels-pcr-schnelltest)<

Staal L, Monteil H, Colin DA. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J Membrane Biol.* 1998;162:209–16.

Stolz SJ, Davis JP, Vergeront JM, Crass BA, Chesney PJ, Wand PJ, Bergdoll MS. Development of serum antibody to toxic shock syndrome toxin among individuals with toxic shock syndrome in Wisconsin. *J Infect Dis.* 1985;151:883–9.

Striessel A. Leitfaden der Nutztiergesundheit. 1. Aufl. Stuttgart: Sonntag; 2005.

Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 2008;154:1949–59.

Sutra L, Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 1994;40:79–89.

Su YC, Wong ACL. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1438–43.

Taponen S, Dredge K, Henriksson B, Pyyhti AM, Suojala L, Junni R, Heinonen R, Pyörälä S. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria – a double blind field study. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26:193–8.

Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1–5.

Todd JK. Toxic shock syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 1988;1:432–46.

Tenhagen BA, Edinger D, Baumgärtner B, Kalbe P, Klünder G, Heuwieser W. Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent *post-partum* mastitis in dairy heifers. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2001;48:601–7.

Tenhagen BA, Fetsch A, Bräunig J, Käsbohrer A. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) von Nutztieren. Abschätzung der Gefährdung des Menschen. Dtsch Tierärztebl. 2008;9:1177–83.

Tenhagen BA, Käsbohrer A, Fetsch A, Bräunig J, Appel B. MRSA in der Lebensmittelkette – kein Grund zur Panik?. Proceedings des 5. Leipziger Tierärztekongresses; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland. Leipzig:Leipziger Uni-Vlg; 2010.

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci. 2006;89:2542–51.

Tenhagen BA, Schroeter A, Käsbohrer A. Resistenzmonitoring in der Veterinärmedizin als Teil von DART. Proceedings BfR-Symposium Zoonosen und Lebensmittelsicherheit; 2009 Nov 2–3; Berlin, Deutschland. Berlin:BfR Hausdruckerei; 2009.

Thakker M, Park J, Carey V, Lee JC. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. Infect Immun. 1998;66:5183–9.

Thomas DY, Jarraud S, Lemerrier B, Cozon G, Echasserieau, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun. 2006;74:4724–34.

Thelestam M, Möllby R. Determination of toxin-induced leakage of different-size nucleotides through the plasma membrane of human diploid fibroblasts. Infect Immun. 1975;11:640–48.

Thüringer Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen in der Tierzucht e.V. (TVL). Jahresbericht 2010. Ohne Angabe eines Verlages

Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H, European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis. 2004;10:1627-34.

Tolle A, Heeschen W, Hamann J. Grundlagen einer systematischen Bekämpfung der subklinischen Mastitis des Rindes. Kieler Milchwirtsch Forschungsber. 1977;29:3–103.

Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A. Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *APMIS* 2000;108:565–72.

Tranter HS, Brehm RD. Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1990;19:109–22.

Trolldenier H, Wagner J. Minimale Hemmkonzentrationen von häufig eingesetzten Chemotherapeutika bei tierpathogenen Erregern aus multizentrischen Erfassungen in Deutschland - Teil II: *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus intermedius*. *Prakt Tierarzt.* 2001;82:118–29.

Tschischkale R. Eutergesundheit - Kontagiöse Mastitiden. *Nutztierpraxis aktuell.* 2002;3.

Valentin-Weigand P. Grampositive Kokken. In: Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Stuttgart: Enke Verlag; 2011. p. 256-70.

van den Borne BH, Nielen M, van Schaik G, Melchior MB, Lam TJ, Zadoks RN. Host adaptation of bovine *Staphylococcus aureus* seems associated with bacteriological cure after lactational antimicrobial treatment. *J Dairy Sci.* 2010;93:2550–8.

Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol.* 2010;144:166–71.

van Duijkeren E, Jansen MD, Flemming SC, de Neeling H, Wagenaar JA, Schoormans AH, van Nes A, Fluit AC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1408–10.

van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Snijders SV, Wertheim H, van Duijkeren, Peeters JK, van der Spek PJ, Gorkink R, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. Host- and tissue-specific traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005;187:4584–91.

Vann JM, Hamill RJ, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine endothelial cells. *J Infect Dis.* 1989;160:538–42.

Vann JM, Proctor CA. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* alpha-haemolysin. *Microb Pathog.* 1988;4:443-53.

Varaldo PE, Kilpper-Bälz R, Biavasco F, Satta G, Schleifer KH. *Staphylococcus delphini* sp. nov. a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int J Sys Bacteriol.* 1988;38:436–39.

Verbrugh HA, Peterson PK, Nguyen BYT, Sisson SP, Kim Y. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: The role of specific antibody and complement. *J Immunol.* 1982;129:1681–7.

Vesterholm-Nielsen M, Olhom Larsen M, Elmerdahl Olsen J, Moller Aarestrup F. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet Scand.* 1999;40(3):279–86.

VO (EU) Nr. 37/2010 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (22.12.2009).

VO (EWG) Nr. 2377/90 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (26.06.1990).

von Bonin A, Ehrlich S, Malcherek G, Fleischer, B. Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock. *Eur J Immunol.* 1995;25:2894–8.

Waage S, Mørk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ødegaard SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 1999;82:712–9.

Waage S, Ødegaard SA, Lund A, Brattgjerd S, Røthe T. Case-control study of risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. *J Dairy Sci.* 2001;84:392–9.

Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehrlich R, Slickers P, Soba A, Wleklinski CG, Wieler LH, Lübke-Becker A. Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:704–10.

Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GW, Cao XY, Shen JZ. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 2008;130:118–25.

Ward PD, Adlam C, McCartney AC, Arbuthnott JP, Thorley CM. A histopathological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit. *J Comp Pathol.* 1979;169–77.

Wehowsky G, Tröger F. Milchgewinnung. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena/Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1994. p. 238–44.

Wendt K, Lotthammer KH, Fehlings K, Spohr M. Diagnostische Methoden und Aussagen für Einzeltier und Bestand. In: Wendt K, Lotthammer KH, Fehlings K, Spohr M. Handbuch Mastitis. 1. Aufl. Osnabrück: Kamlage Verlag; 1998. p. 65–83.

Wieland B, Feil C, Gloria-Maercker E, Thumm G, Lechner M, Bravo JM, Poralla K, Götz F. Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1994;176:7719–26.

Wiley BB, Wonnacott JC. Isolation and partial characterization of a capsular material from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1962;83:1169–76.

Williams RE, Harper GJ. Staphylococcal haemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth haemolysin. J Pathol Bacteriol. 1947;59:69–78.

Willis AT, O'Connor JJ, Smith JA. Some observations on staphylococcal pigmentation. Nature 1966;210:653–4.

Wilson DJ, Gonzalez RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J Dairy Sci. 1997;80:2592–8.

Winter P, Zehle HH. Untersuchung im Stall. In: Winter P, Hrsg. Praktischer Leitfaden Mastitis. 1. Aufl. Stuttgart: Parey; 2009a. p. 34–69.

Winter P, Zehle HH. Elimination bestehender Infektionen. In: Winter P, Hrsg. Praktischer Leitfaden Mastitis. 1. Aufl. Stuttgart: Parey; 2009b. p. 184–210.

Winter P, Zehle HH. Therapieschemata und Herdenkonzepte. In: Winter P, Hrsg. Praktischer Leitfaden Mastitis. 1. Aufl. Stuttgart: Parey; 2009c. p. 211–7.

Wiseman GM. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. Bacteriol Rev. 1975;39:317–44.

Witte W, Hummel R, Meyer W, Exner H, Wundrak R. Ecology of *Staphylococcus aureus*: characterization of strains from chicken. Z Allg Mikrobiol. 1977;17:639–46.

Witte W, Strommenger B, Klare I, Werner G. Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen. Teil I: Diagnostik und Typisierung. Bundesgesundheitsblatt 2004/4. Berlin/Heidelberg: Springer; 2004.

Wolf C, Kusch H, Monecke S, Albrecht D, Holtfreter S, von Eiff C, Petzl W, Rainard P, Bröker BM, Engelmann S. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. Proteomics 2011;11:2491–502.

Wolter W, Kloppert B, Zschöck M, Schlez K, Sauerwald C. Mastitisimpfung – Wunsch und Wirklichkeit. 11. Jahrestagung der Wissenschaftlichen Gesellschaft der Milcherzeugerberater. Bad Hersfeld. 2010.

Xu S, Arbeit RD, Lee JC. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 1992;60:1358–62.

Yamada T, Tochimaru N, Nakasuji S, Hata E, Kobayashi H, Eguchi M, Kaneko J, Kamio Y, Kaidoh T, Takeuchi S. Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM-lukF-PV* genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet Microbiol*. 2005;110:97–103.

Yamaguchi A, Shiina Y, Fujihira E, Sawai T, Noguchi N, Sasatsu M. The tetracycline efflux protein encoded by the *tet(K)* gene from *Staphylococcus aureus* is a metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter. *FEBS Lett*. 1995;365:193–7.

Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem*. 2002;277:13138–47.

Younis A, Krifucks O, Fleminger G, Heller ED, Gollop N, Saran A, Leitner G. *Staphylococcus aureus* leucocidin, a virulence factor in bovine mastitis. *J Dairy Res*. 2005;72:188–94.

Zecconi A. Can we eradicate *Staphylococcus aureus* mastitis?. Proceedings of the 24<sup>th</sup> World Buiatric Congress; 2006 Okt 15–19; Nizza, Frankreich.

>[www.sinervia.com/library\\_files/432463593\\_Can%20we%20eradicate%20Staphilococcus%20aureus%20mastitis.pdf](http://www.sinervia.com/library_files/432463593_Can%20we%20eradicate%20Staphilococcus%20aureus%20mastitis.pdf)<

Zadoks RN, Allore HG, Hagenars TJ, Barkema HW, Schukken YH. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol Infect*. 2002;129:397–416.

Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A. 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*. 2000;38:1931–9.

Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:275–86.

Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol Lett*. 1998;168:227–33.

Ziv G, Storper M. Intramuscular treatment of subclinical staphylococcal mastitis in lactating cows with penicillin G, methicillin and their esters. *J Vet Pharmacol Ther*. 1985;8:276–283.

Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lämmler C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2005;108:243-9.

## **Bisherige Publikationen im Rahmen der vorliegenden Untersuchung**

Teilergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits vor Drucklegung der vorliegenden Dissertation veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung angenommen:

### **Leukocidin genes *lukf-P83* and *lukM* are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany**

Katharina Schlotter, Ralf Ehricht, Helmut Hotzel, Stefan Monecke, Martin Pfeffer, Karsten Donat

Vet Res. 2012;43:42

### **Wie belastet ist unsere Rohmilch? – Untersuchungen zum Vorkommen von MRSA und enterotoxinbildenden *Staphylococcus aureus*-Stämmen in Thüringer Milchviehherden**

Katharina Schlotter, Karsten Donat, Helmut Hotzel

Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 2012;8:290-291

### **Multiple Resistenzen bei Mastitiserregern – wirklich ein Problem?**

Karsten Donat, Katharina Schlotter

Klauentierpraxis 2012;3:81-87

### **Phänotypisierung und Microarray-gestützte Genotypisierung des Antibiotika-Resistenzverhaltens von MRSA und MSSA aus Viertelgemelksproben klinisch gesunder Milchkühe**

Katharina Schlotter, Helmut Hotzel, Ralf Ehricht, Martin Pfeffer, Stefan Monecke, Karsten Donat

Berl Münch Tierärztl Wochenschrift, eingereicht am 24.05.2012, zur Veröffentlichung angenommen am 28.08.2012

**Anhang 1:** Übersicht über die Anzahl der untersuchten Tiere, die Anzahl der *Staphylococcus aureus*-Nachweise und die ermittelten Einzeltierprävalenzen in beiden Untersuchungsdurchgängen

Bestand	1. Untersuchung			2. Untersuchung			Gesamt		
	Kühe	<i>S. aureus</i> -Kühe	Prävalenz P <sub>1</sub>	Kühe	<i>S. aureus</i> -Kühe	Prävalenz P <sub>2</sub>	Kühe	<i>S. aureus</i> -Kühe	Prävalenz P <sub>1,2</sub>
	n	n	%	n	n	%	n	n	%
1	45	22	48,89	34	10	29,41	52	26	50,00
2	141	44	31,21	132	18	13,64	185	34	18,38
3	61	20	32,79	56	6	10,71	66	22	33,33
4	153	9	5,88	169	15	8,88	222	22	9,91
5	577	28	4,85	579	26	4,49	807	51	6,32
6	358	11	3,07	287	5	1,74	460	14	3,04
7	541	6	1,11	570	40	7,02	715	45	6,29
8	1229	143	11,64	943	56	5,94	1483	196	13,22
9	732	6	0,82	750	17	2,27	970	23	2,37
10	347	6	1,73	352	8	2,27	459	11	2,40
11	164	47	28,66	185	8	4,32	237	55	23,21
12	37	1	2,70	38	2	5,26	50	2	4,00
13	358	3	0,84	320	1	0,31	474	3	0,63
14	404	11	2,72	369	33	8,94	531	44	8,29
15	378	14	3,70	361	21	5,82	513	31	6,04
16	55	2	3,64	70	4	5,71	86	6	6,98
17	111	10	9,01	122	5	4,10	158	13	8,23
18	179	26	14,53	175	22	12,57	244	41	16,80
19	339	23	6,78	345	37	10,72	481	59	12,27
20	341	33	9,68	373	26	6,97	495	56	11,31
21	136	7	5,15	123	7	5,69	165	13	7,88
22	403	13	3,23	626	17	2,72	796	30	3,77
23	97	6	6,19	97	7	7,22	118	10	8,47
24	515	2	1,17	481	1	0,21	643	2	0,31
25	850	100	11,76	888	138	15,54	1138	215	18,89
26	366	46	12,57	383	36	9,40	517	73	14,12
27	15	4	26,67	17	7	41,18	20	8	40,00
28	413	31	7,51	450	63	14,00	578	85	14,71
29	35	4	11,43	39	6	15,38	41	8	19,51
30	205	17	8,29	205	18	8,78	269	33	12,27
31	167	2	1,20	165	1	0,61	237	2	0,84
32	188	10	5,32	192	29	15,10	249	34	13,65
33	328	13	3,96	338	10	2,96	467	22	4,71
34	153	17	11,11	183	15	8,20	231	28	12,12
$\Sigma$	10421	737		10417	715		14157	1317	
$\bar{X}$	267	12	6,03	246	15	6,99	364	27	9,19



**Anhang 3: Zusammensetzung der Reagenzien und Nährböden****Äskulin-Agar mit Schafblut (OXOID, Wesel, Deutschland)**

Fertigplatte (Füllgewicht 17 g $\pm$ 5 %)	
Zusammensetzung	g/l
Fleischextrakt `Lab-Lemco´	1,0
Hefeextrakt	2,0
Peptone	5,0
Natriumchlorid	7,5
Äskulin	1,0
Agar	16,0
Defibriertes Schafblut	70,0 ml
pH 7,2 $\pm$ 0,2	

**Glucose-Bouillon (OXOID, Wesel, Deutschland)**

Trockennährboden zur Lösung in Aqua dest. (23 g/1 l)	
Zusammensetzung	(g/l)
Fleischextrakt `Lab-Lemco´	3,0
Tryptose	10,0
Glucose	5,0
Natriumchlorid	5,0
pH 7,2 $\pm$ 0,2	

**Columbia-Agar mit Schafblut<sup>PLUS</sup> (OXOID, Wesel, Deutschland)**

Fertigplatte (Füllgewicht 17 g $\pm$ 5 %)	
Zusammensetzung	(g/l)
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0
Defibriertes Schafblut	50,0 ml
pH 7,3 $\pm$ 0,2	

**Mueller-Hinton-Agar mit Schafblut**

Fertigplatte (Füllgewicht 20 g $\pm$ 5 %)	
Zusammensetzung	(g/l)
Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g	2,0
Caseinhydrolysat	17,5
Stärke	1,5
Agar	17,0
Defibriertes Schafblut	50,0 ml
pH 7,4 $\pm$ 0,2	

**Zusammensetzung der verwendeten PBS-Lösung**

1000 ml enthalten	12 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4,296 g) 12 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,656 g) 0,145 mM NaCl (8,5 g; pH 7)
-------------------	---

**Zusammensetzung der Komponenten des „High Pure Template Preparation Kit“****(ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Deutschland)****Bindungspuffer**

20 ml enthalten	6 M Guanidinium-HCl 10 mM Harnstoff 10 mM Tris-HCl 4 ml Triton® X100
-----------------	---

**Waschpuffer**

20 ml enthalten	20 ml Ethanol 20 mM NaCl 2 mM Tris-HCl
-----------------	--

**Elutionspuffer**

20 ml enthalten	5 mM Tris, pH 8,5 (25 °C)
-----------------	---------------------------

**Zusammensetzung der Komponenten des „Staphy Type Kit“ (ALERE TECHNOLOGIES GmbH, Jena, Deutschland):**

Auf die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des „Staphy Type Kit“ (Lysis-Enhancer, Lysispuffer, Markierungspuffer, DNA-Polymerase, Hybridisierungspuffer, Waschpuffer 1, Waschpuffer 2, Konjugationspuffer, HRP-Konjugat, HRP-Substrat) bestand kein Zugriff.

**Anhang 4:** Verzeichnis der im „StaphyType Kit“ verwendeten Sonden und Primer (nach MONECKE et al. 2011a)

Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondenname	Sondendefinition	Primernamen	Primerdefinition
<b><i>aacA-aphD</i></b>	Gentamicin-Resistenz (Transferasen)		aacA-aphD_10,4	AB096217.1 [28286:28313]	aacA-aphD_PM4	AB096217.1[28367:28386]
<b><i>blaZ</i></b>	β-Laktamase		blaZ_11	AB074882.1 [417:441]	blaZ_PM4	BX571856.1[1914099:1914121]
			blaZ_4,2	BX571856.1 [1913997:1914021]	l b_blaZ_651_rv	BX571856.1[1914034:1914054:r]
			hp_blaZ_611	BX571856.1 [1914503:1914531]	lb_blaZ_652_rv	BX571856.1[1914553:1914570:r]
					lb_blaZ_653_rv	DQ016047.1[1101:1120:r]
<b><i>cap1</i></b>	Kapsel Typ 1	<i>capJ1</i>	hp_capJ1_611	U10927.2 [21322:21350]	lb_capJ1_651_rv	U10927.2[21367:21385:r]
		<i>capK1</i>	hp_capK1_611	U10927.2 [22439:22466]	lb_capK1_651_rv	U10927.2[22490:22508:r]
<b><i>cap5</i></b>	Kapsel Typ 5	<i>capJ5</i>	hp_capJ5_611	CP000046.1 [163178:163206]	lb_capJ5_651_rv	CP000046.1[163216:163233:r]
			hp_capJ5_612	CP000046.1 [163344:163373:r]	lb_capJ5_652_rv	CP000046.1[163316:163337]
		<i>capK5</i>	hp_capK5_611	CP000046.1 [164536:164564]	lb_capK5_651_rv	CP000046.1[164576:164595:r]
<b><i>cap8</i></b>	Kapsel Typ 8	<i>capI8</i>	hp_capI8_612	BX571856.1 [178269:178298]	lb_capI8_651_rv	BX571856.1[178195:178214:r]
					lb_capI8_652_rv	BX571856.1[178312:178332:r]
		<i>capJ8</i>	hp_capJ8_611	BX571856.1 [178770:178800]	lb_capJ8_651_rv	BX571856.1[178809:178826:r]
		<i>capK8</i>	hp_capK8_611	BX571856.1 [178990:179017]	lb_capK8_651_rv	BX571856.1[179021:179045:r]
hp_capK8_612	BX571856.1 [179930:179956]		lb_capK8_652_rv	BX571856.1[179958:179980:r]		
<b><i>cat</i></b>	Chloramphenicol-Resistenz (Acetyltransferase)	<i>cat-pC221</i>	hp_cat_613	M64281.1 [358:389]	lb_cat_654_rv	AB080798.1[2860:2878:r]
		<i>cat-pC223</i>	hp_cat_611	AF507977.1 [17615:17642]	lb_cat_653_rv	AF507977.1[17658:17682:r]
		<i>cat-pMC524</i>	hp_cat_612	AB080798.1 [2826:2854]	lb_cat_655_rv	AJ312056.2[587:605:r]
		<i>cat-pSBK203R</i>	hp_cat_615	M58515.1 [353:384]	lb_cat_652_rv	M58515.1[407:431:r]
<b><i>cfr</i></b>	Chloramphenicol-Resistenz (Methyltransferase)		hp_cfr_611	AJ249217.1 [1048:1074]	lb_cfr_651_rv	AJ249217.1[1075:1093:r]
<b><i>coA</i></b>	Koagulase		coa_consens_11	CP000046.1 [246925:246954]	coa_consens_PM4	CP000046.1[246967:246988]
<b><i>dfrA</i></b>	Dihydrofolat-Reduktase		dfrA_12	AE017171.1 [2588:2614:r]	dfrA_PM4	AE017171.1[2494:2513:r]
			2,1-dfrA	AB049452.1 [2076:2103]		

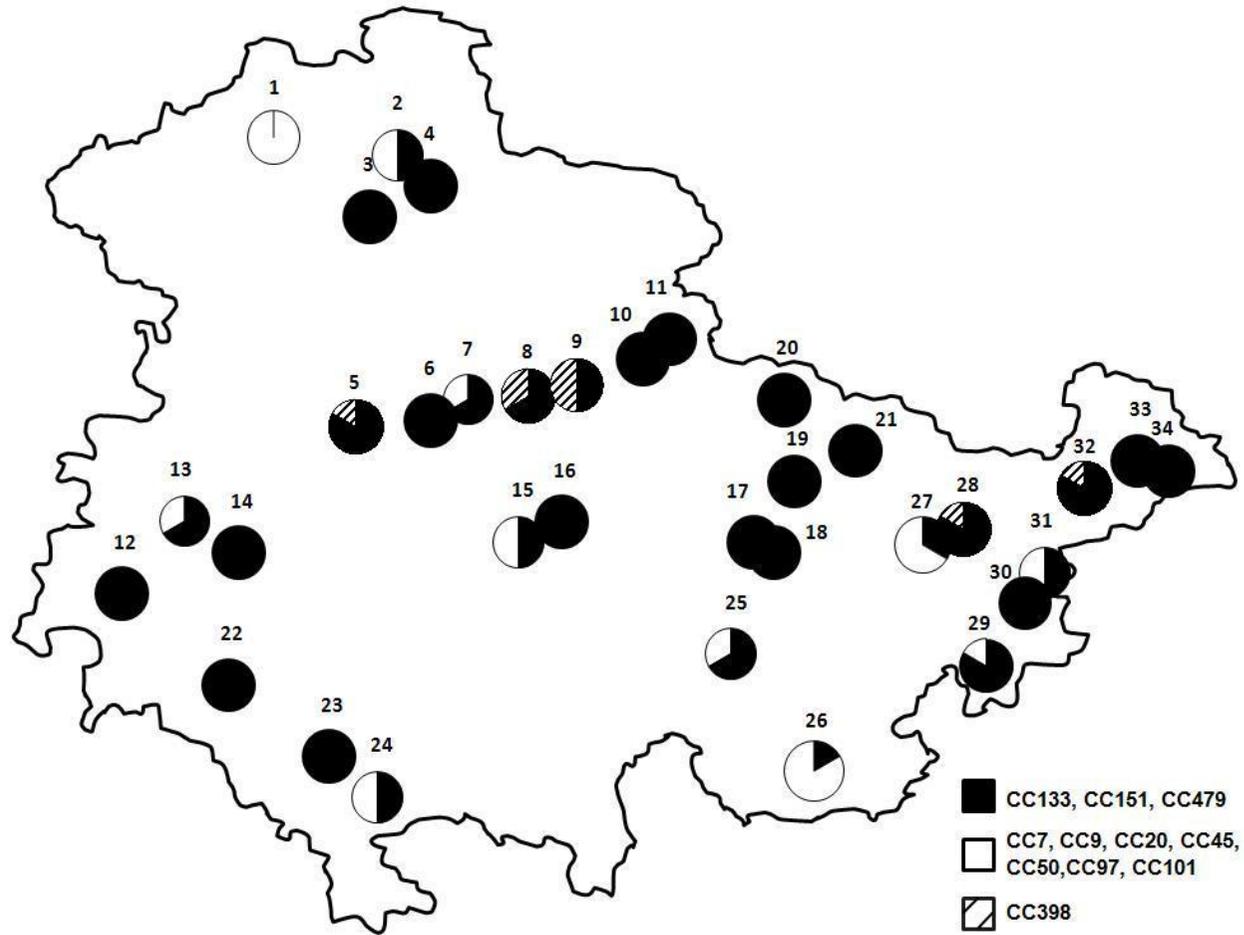
Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondename	Sondendefinition	Primernamen	Primerdefinition
<b>ermA</b>	Erythromycin-/ Clindamycin-Resistenz (Methyltransferase)		ermA_9,4	BA000017.4 [1762850:1762875]	ermA_PM4	BA000017.4[1762907:1762928]
<b>ermB</b>	Erythromycin-/ Clindamycin-Resistenz (Methyltransferase)		hp_ermB_611	EF450709.1 [2405:2428]	lb_ermB_651	EF450709.1 [2443:2464]
			hp_ermB_612	EF450709.1 [2528:2557]	lb_ermB_652	EF450709.1 [2564:2584]
<b>ermC</b>	Erythromycin-/ Clindamycin-Resistenz (Methyltransferase)		ermC_8,1	M17990.1 [1775:1799]	ermC_PM4	AF466402.1[130:150]
			ermC_8,2	M17990.1 [1840:1864]		
<b>etA</b>	Exfoliatives Toxin A		etA_8,2	AP001553.1 [42317:42344]	etA_PM4	AP001553.1[42387:42406]
<b>etB</b>	Exfoliatives Toxin B		etB_9,3	AP003088.1 [5389:5416]	etB_PM4	AP003088.1[5438:5460]
<b>etD</b>	Exfoliative Toxin D		etD_11	AB057421.1 [5648:5677]	etD_51	AB057421.1[5694:5715:r]
<b>far</b>	Fusidinsäure-Resistenz		far1_10	AY047358.1 [1787:1814]	far1_11_PM4	AY047358.1[1818:1838:r]
<b>fnbA</b>	Fibronectin-bindendes Protein A	<i>fnbA (cons)</i>	hp_fnbA_615	CP000046.1 [2570812:2570840:r]	lb_fnbA_652_rv	CP000046.1[2571555:2571576]
		<i>fnbA (COL)</i>	hp_fnbA_612	CP000046.1 [2571598:2571624:r]	lb_fnbA_655_rv	CP000046.1[2570764:2570784]
		<i>fnbA (MRSA252)</i>	hp_fnbA_613	BX571856.1 [2662314:2662342:r]	lb_fnbA_653_rv	BX571856.1[2662290:2662308]
		<i>fnbA (Mu50+MW2)</i>	hp_fnbA_611	BA000017.4 [2644424:2644451:r]	lb_fnbA_651_rv	BA000017.4[2644388:2644409]
		<i>fnbA (RF122)</i>	hp_fnbA_614	AJ938182.1 [2510055:2510084:r]	lb_fnbA_654_rv	AJ938182.1[2510030:2510048]
						lb_fnbA_656_rv
<b>fexA</b>	Chloramphenicol-Resistenz (Effluxprotein)		hp_fexA_611	AJ549214.1 [332:357]	lb_fexA_651_rv	AJ549214.1[364:382:r]
<b>fosB</b>	Epoxyd-Resistenz (Metallothiol-Transferase)	<i>fosB</i>	hp_fosB_611	CP000046.1 [2389191:2389221]	lb_fosB_651_rv	CP000046.1[2389252:2389271:r]
		<i>fosB-plasmid</i>	hp_fosB_612	AP006717.1 [448:478]	lb_fosB_652_rv	AP006717.1[508:527:r]
<b>hla</b>	Hämolyisin $\alpha$		hla_11	CP000046.1	hla_51	CP000046.1[1180098:1180120]

Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondename	Sondendefinition	Primername	Primerdefinition
<i>hlb</i>	Hämolysin β		hp_hlb_611	CP000046.1 [2063898:2063922]	hlb_51	CP000046.1[2063925:2063944:r]
			hp_hlb_612	BA000017.4 [2126171:2126196]		
			hp_hlb_613	S72497.1 [366:390]		
<i>hld</i>	Hämolysin δ		hld_11	CP000046.1 [2082840:2082864:r]	hld_51	CP000046.1[2082797:2082819]
<i>hlgA</i>	Hämolysin γ, Komponente A		hlgA_11	CP000046.1 [2479145:2479171]	hlgA_51	CP000046.1[2479172:2479193:r]
<i>katA</i>	Katalase		katA_11	CP000046.1 [1374794:1374818]	katA_PM4	CP000046.1[1374825:1374845]
<i>lukD</i>	Leukozidin D		lukD_11	CP000046.1 [1934731:1934760:r]	lukD_51	CP000046.1[1934686:1934706]
<i>lukE</i>	Leukozidin E		lukE_11	CP000046.1 [1935944:1935968:r]	lukE_51	CP000046.1[1935901:1935920]
<i>lukF-hlg</i>	Hämolysin γ, Komponente B		lukF_10	CP000046.1 [2481634:2481659]	lukF_11b_PM4	CP000046.1[2481663:2481680:r]
<i>lukS-hlg</i>	Hämolysin γ, Komponente C		<i>lukS</i> lukS_10	CP000046.1 [2480644:2480668]	lukS_11_PM4	CP000046.1[2480672:2480692:r]
<i>lukF-PV</i>	PVL (F-Komponente)		lukF_PV_10	AB006796.1 [2256:2284]	lukF-PV_11_PM4	AB006796.1[2295:2316:r]
<i>lukS-PV</i>	PVL (S-Komponente)		lukS_PV_20	AB006796.1 [1628:1656]	lukS-PV_21_PM4	AB006796.1[1679:1699:r]
<i>lukF-P83</i> ( <i>lukF-PV83</i> )	LukF-P83		lukF-PV-P83_11	AB044554.1 [42010:42037]	lukF-PV-P83_51	AB044554.1[42053:42070:r]
<i>lukM</i>	LukM		lukM_11	AB044554.1 [40866:40893]	lukM_51	AB044554.1[40914:40932:r]

Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondenname	Sondendefinition	Primernamen	Primerdefinition
<i>mecA</i>	PBP2a		mecA_1,4	CP000046.1 [39915:39942:r]	mecA_PM4	CP000046.1[39857:39876:r]
			mecA_11	CP000046.1 [40041:40068:r]	mecA_51	CP000046.1[40007:40025]
<i>mefA</i>	Makrolid-Resistenz (Effluxpumpe)		hp_mefA_611	AB011259.1 [536:563]	lb_mefA_651_rv	AB011259.1[570:588:r]
			hp_mefA_612	AB011259.1 [1045:1072]	lb_mefA_652_rv	AB011259.1[1078:1099:r]
<i>msrA</i>	Erythromycin-Resistenz (Effluxpumpe)		msrA_15,3	AB013298.1 [1525:1552]	msrA_PM4	AB013298.1[1614:1635]
<i>nuc</i>	Thermonuklease		hp_nuc1_611	CP000046.1 [888207:888233]	lb_nuc1_651_rv	CP000046.1[888249:888266:r]
<i>sak</i>	Staphylokinase		hp_sak_611	BA000017.4 [2086572:2086601:r]	lb_sak_651_rv	BA000017.4[2086553:2086571]
			sak_11	BA000017.4 [2086418:2086443:r]	sak_51	BA000017.4[2086376:2086395]
<i>sea</i>	Enterotoxin A	<i>entA</i>	<i>sea entA_3,2</i>	BA000017.4 [2088572:2088598:r]	entA-var1_51	BA000017.4[2088473:2088492]
			entA_3,3	BA000017.4 [2088482:2088456]		
			entA-var1_11	BA000017.4 [2088512:2088536:r]		
		<i>sea-320E</i> ( <i>entA-320E</i> )	entA-var2_11	AY196686.1 [508:532]		
		<i>sea-N315</i> ( <i>entP, sep</i> )	entA-var3_11	BA000018.3 [2011518:2011545:r]	entA-var3_51	BA000018.3[2011492:2011510]
<i>seb</i>	Enterotoxin B		entB_11	CP000046.1 [916903:916927]	entB_51	CP000046.1[916957:916976:r]
			entB_4,1	CP000046.1 [916583:916609]	entB-41_PM4	CP000046.1[916642:916663]
<i>sec</i>	Enterotoxin C		entC_5,2	BA000017.4 [2134733:2134761:r]	entC_PM4	BA000017.4[2134593:2134610:r]
			entC_5,3	BA000017.4 [2134652:2134680:r]		
<i>sed</i>	Enterotoxin D		entD_11	M94872.1 [675:702]	entD_51	M94872.1[705:723:r]
<i>see</i>	Enterotoxin E		entE_11	AY518387.1 [305:328]	entE_51	AY518387.1[348:365:r]
<i>seg</i>	Enterotoxin G		entG_11	BA000017.4 [1954500:1954526:r]	entG_51	BA000017.4[1954468:1954486]

Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondenname	Sondendefinition	Primername	Primerdefinition
<i>seh</i>	Enterotoxin H		entH_11	AB060536.1 [139:164]	entH_51	AB060536.1[178:196:r]
<i>sei</i>	Enterotoxin I		entI_11	BA000017.4 [1957319:1957343:r]	entI_51	BA000017.4[1957273:1957293]
<i>sej</i>	Enterotoxin J		entJ_11	AB075606.1 [1849:1876:r]	entJ_51	AB075606.1[1804:1823]
<i>sek</i>	Enterotoxin K		hp_entK_611	CP000046.1 [905353:905384:r]	entK_PM4	CP000046.1[904957:904979:r]
			hp_entK_612	CP000046.1 [905035:905065:r]	lb_entK_651_rv	CP000046.1[905311:905334]
					lb_entK_652_rv	CP000046.1[904995:905017]
					lb_entK_653_rv	BA000033.2[2087412:2087433:r]
<i>sel</i>	Enterotoxin L		entL_11	BA000017.4 [2134144:2134171]	entL_51	BA000017.4[2134182:2134202:r]
<i>sem</i>	Enterotoxin M		entM_11	BA000017.4 [1958262:1958291:r]	entM_51	BA000017.4[1958242:1958260]
					entM_52	BX571856.1[1999451:1999468]
<i>sen</i>	Enterotoxin N	<i>sen- other than RF122</i>	entN_11	BA000017.4 [1955521:1955545:r]	entN_51	BA000017.4[1955492:1955513]
		<i>sen-consensus</i>	hp_entN_611	BA000017.4 [1955741:1955768:r]	lb_entN_651_rv	BA000017.4[1955709:1955731]
<i>seo</i>	Enterotoxin O		entO_11	BA000017.4 [1958936:1958962:r]	entO_51	BA000017.4[1958904:1958925]
<i>seq</i>	Enterotoxin Q		hp_entQ_611	CP000046.1 [906043:906072:r]	entQ_PM4	CP000046.1[905715:905734:r]
			hp_entQ_612	CP000046.1 [905818:905848:r]	lb_entQ_651_rv	CP000046.1[905997:906018]
					lb_entQ_652_rv	CP000046.1[905862:905881]
<i>ser</i>	Enterotoxin R		entR_11	AB075606.1 [750:775]	entR_51	AB075606.1[783:802:r]
<i>seu</i>	Enterotoxin U		hp_entU_611	BA000017.4 [1956679:1956708:r]	lb_entU_651_rv	BA000017.4[1956633:1956653]

Gen	Genprodukt/Funktion	Allele	Sondename	Sondendefinition	Primername	Primerdefinition
<b>spa</b>	Protein A		proteinA_12	CP000046.1 [107407:107435:r]	proteinA_51	CP000046.1[107900:107917]
					proteinA_52	CP000046.1[107378:107395]
<b>tetK</b>	Tetrazyklin-Resistenz (Effluxpumpe)		tetK_12,3	M16217.1 [1424:1452]	tetK_PM4	M16217.1[1582:1604:r]
			tetK_12,4	M16217.1 [1507:1535]		
<b>tetM</b>	Tetrazyklin-Resistenz (Schutzprotein)		tetM_11,3	BA000017.4 [440374:440400:r]	tetM_51	BA000017.4[440340:440358]
<b>tst1</b>	TSST-1	<i>tst1 (other than RF122)</i>	tst1_16,2	BA000017.4 [2137855:2137879]	tst1_PM4	BA000017.4[2137910:2137930]
		<i>tst1 (consensus)</i>	hp_tst_611	BA000017.4 [2138016:2138044]	lb_tst_651_rv	BA000017.4[2138051:2138070:r]
<b>vanA</b>	Vancomycin-Resistenz		vanA_18,2	AE017171.1 [35199:35226]	vanA_PM4	AE017171.1[35302:35321]
<b>vanB</b>	Vancomycin-Resistenz		vanB_11	AE016954.1 [78616:78640:r]	vanB_PM4	AE016954.1[78518:78535:r]
			vanB_19,3	AE016954.1 [78613:78638:r]		
<b>vanZ</b>	Teicoplanin-Resistenz		vanZ_20,3	AE017171.1 [37564:37589]	vanZ_PM4	AE017171.1[37613:37632]
<b>vatA</b>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/ Streptograminen		vatA_15,3	AF117258.1 [2296:2323:r]	vatA_PM4	AF117258.1[2229:2247:r]
<b>vatB</b>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/ Streptograminen		vatB_16,3	U19459.1 [543:570]	vatB_PM4	U19459.1[659:680]
<b>vgaA</b>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/ Streptograminen	<i>vga A</i>	vga_17,3	AF117259.1 [3729:3756]	vga_PM4	AF117259.1[3779:3799]
		<i>vga (A)-BM 3327</i>	vgaA_18,3	AF186237.2 [6470:6497]	vgaA_PM4	AF117259.1[3925:3944]
<b>vgb</b>	Resistenz gegenüber Makroliden/Lincosamiden/ Streptograminen		vgb_19,2	M36022.1 [1040:1067]	vgb_PM4	M36022.1[1126:1148]



**Anhang 5:** Geographische Verteilung der teilnehmenden 34 Bestände in Thüringen und Darstellung der in den Beständen detektierten CC

Anhang 6: Übersicht der in den 189 Isolaten vorkommenden Pathogenitätsfaktor-Gene

CC	n	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>hla</i>	<i>hlyB</i>	<i>lukF</i>	<i>hlyA</i>	<i>lukS</i>	<i>hlyD</i>	<i>lukD</i>	<i>lukE</i>	<i>lukF-P83</i>	<i>lukM</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sel</i>	<i>egc</i>	<i>tst-1</i>	<i>tst-RF122</i>	<i>sak</i>
CC151	98	0	98	98	98	98	92	98	98	98	94	98	98	0	4	18	18	98	0	19	0
CC479	33	0	33	32	28	32	32	33	33	33	30	32	32	0	0	0	0	33	0	0	0
CC133	21	0	21	21	20	20	20	21	21	21	2	21	21	0	0	0	0	0	0	0	0
CC97	9	9	0	9	9	7	9	9	9	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC398	8	8	0	8	0	8	7	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CC9	5	5	0	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	1
CC20	5	5	0	5	5	5	5	5	5	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
CC45	5	0	5	5	0	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5	5	1	0	1
CC101	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
CC7	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
CC50	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Σ	189	27	162	188	170	185	180	188	189	166	143	151	151	1	4	23	23	147	1	19	6

**Anhang 7:** Ergebnisse der LukF-P83 /LukM-Expressionsanalyse

<b>Lfd. Nr</b>	<b>CC</b>	<b>LukF-P83/LukM im Zellüberstand [ng/ml]</b>
1	CC151	222,10
2	CC151	118,38
3	CC151	150,04
4	CC151	177,05
5	CC151	147,35
6	CC151	144,30
7	CC151	148,20
8	CC151	145,80
9	CC151	138,20
10	CC151	157,35
11	CC479	130,07
12	CC479	116,33
13	CC479	129,10
14	CC133	1095,00
15	CC133	846,90

**Anhang 8:** Im Agardiffusionstest ermitteltes Resistenzverhalten vier *mecA*-positiver und vier *mecA*-negativer CC398-Isolate

	CC398							
	<i>mecA</i> -positiv Isolat				<i>mecA</i> -negativ Isolat			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Amoxicillin/Clavulansäure	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin/Cloxacillin	S	S	S	S	R	S	S	S
Cloxacillin	S	S	S	S	R	S	S	S
Oxacillin	S	S	S	S	S	S	S	S
Penicillin	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefacetril	I	R	S	I	R	S	S	S
Cefalexin	I	R	I	I	I	S	S	S
Cefazolin	S	S	S	R	I	S	S	S
Cefapirin	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoperazon	S	I	S	S	S	S	S	S
Cefquinom	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	S	S	R	S	S	I	S	S
Neomycin	S	S	R	S	S	S	S	S
Danofloxacin	R	S	S	S	S	S	S	S
Enrofloxacin	R	S	S	S	S	S	S	S
Marbofloxacin	R	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	S	R	S	S	S	S	S	S
Tylosin	R	S	R	S	R	S	I	S
Pirlimycin	S	R	S	S	S	S	S	S
Trimethoprim	R	R	R	S	R	R	R	R
Tetrazyklin	R	R	R	R	R	R	R	R
Lincomycin/Neomycin	I	S	R	S	I	S	I	S
Penicillin/Streptomycin/Nafcillin	S	R	I	S	I	I	S	S
Cefalexin/Kanamycin	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>detektierte Resistenzgene</b>	<i>mecA</i> <i>blaZ</i> <i>tetK</i> <i>tetM</i> <i>vgaA</i>	<i>mecA</i> <i>blaZ</i> <i>tetM</i>	<i>mecA</i> <i>blaZ</i> <i>tetK</i> <i>tetM</i> <i>aac-aphD</i>	<i>mecA</i> <i>blaZ</i> <i>tetK</i> <i>tetM</i>				

R = resistent, I = intermediär, S = sensibel

**Anhang 9:** Gegenüberstellung des Resistenzverhaltens vier *mecA*-positiver und vier *mecA*-negativer CC398-Isolate gegenüber neun penicillinasefesten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (außer Oxacillin)

<i>mecA</i>	Resistenzverhalten			$\Sigma$
	sensibel	intermediär	resistent	
positiv	24	5	7	36
negativ	26	3	7	36
$\Sigma$	50	8	14	72

**Anhang 10:** Resistenztestung *mecA*-positiver Isolate mittels Bouillon-Mikrodilution

Antibiotika-Gruppe	Antibiotikum	Ergebnisse der Resistenztestung							
		Isolat 1		Isolat 2		Isolat 3		Isolat 4	
		MHK	Int	MHK	Int	MHK	Int	MKH	Int
$\beta$ -Laktame	Benzylpenicillin	$\geq 0,5$	R	$\geq 0,5$	R	$\geq 0,5$	R	$\geq 0,5$	R
	Oxacillin	$\geq 4$	R	$\geq 4$	R	$\geq 4$	R	$\geq 4$	R
Makrolide	Erythromycin	$\leq 0,25$	S	$\geq 8$	R	$\leq 0,25$	S	$\leq 0,25$	S
Lincosamide	Clindamycin	$\leq 0,25$	S	$\geq 8$	R	$\leq 0,25$	S	$\leq 0,25$	S
Glykopeptide	Vancomycin	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S
	Teicoplanin	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S
Fluorchinolone	Levofloxacin	$\geq 8$	R	0,25	S	0,25	S	0,25	S
	Moxifloxacin	4	R	$\leq 0,25$	S	$\leq 0,25$	S	$\leq 1$	S
Aminoglykoside	Gentamicin	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\geq 16$	R	$\leq 0,5$	S
	Tobramycin	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S	$\geq 16$	R	$\leq 1$	S
	Mupirocin	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S
Tetrazykline	Tetracyclin	$\geq 16$	R	$\geq 16$	R	$\geq 16$	R	$\geq 16$	R
Rifamycine	Rifampicin	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S
Oxazolidinone	Linezolid	1	S	2	S	2	S	2	S
Epoxyde	Fosfomycin	$\leq 8$	S	$\leq 8$	S	$\leq 8$	S	$\leq 8$	S
Glycylcycline	Tigecycline	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S
Trimethoprim/ Sulfonamid	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	$\geq 320$	R	$\geq 320$	R	$\geq 320$	R	$\leq 10$	S
	Fusidinsäure	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S
	Nitrofurantoin	32	S	$\leq 16$	S	$\leq 16$	S	$\leq 16$	S
<b>detektierte Resistenzgene</b>		<i>mecA, blaZ, tetK, tetM, vgaA</i>		<i>mecA, blaZ, tetM</i>		<i>mecA, blaZ, tetK, tetM, aacA-aphD</i>		<i>mecA, blaZ, tetK, tetM</i>	

Int = Interpretation, R = resistant, S = sensibel

## Tabellenverzeichnis:

	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1</b> Pathogenitätsfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>6</b>
<b>Tab. 2</b> Charakteristische Eigenschaften der Staphylokokken-Enterotoxine.....	<b>14</b>
<b>Tab. 3</b> Studiendesign und Ergebnisse von Untersuchungen zur Nachweishäufigkeit von <i>Staphylococcus aureus</i> -Euterinfektionen.....	<b>27</b>
<b>Tab. 4</b> Resistenzmechanismen gegenüber Nicht- $\beta$ -Laktam-Antibiotika in <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>30</b>
<b>Tab. 5</b> Auswahl der im „StaphyType Kit“ erfassten Pathogenitätsfaktor-Gene.....	<b>43</b>
<b>Tab. 6</b> Auswahl der im „StaphyType Kit“ erfassten Resistenzdeterminanten.....	<b>44</b>
<b>Tab. 7</b> Verteilung der CC in den 34 teilnehmenden Beständen.....	<b>49</b>
<b>Tab. 8</b> Vorkommen der Hämolysin-Gene in Abhängigkeit vom CC.....	<b>51</b>
<b>Tab. 9</b> Verteilung der Gene des <i>egc</i> -Clusters innerhalb der CC.....	<b>52</b>
<b>Tab. 10</b> Anzahl, Zugehörigkeit und Vorkommen der detektierten Enterotoxin-Gene.....	<b>53</b>
<b>Tab. 11</b> Verteilung der Kombination aus <i>lukF-P83</i> und <i>lukM</i> innerhalb der CC.....	<b>55</b>
<b>Tab. 12</b> Vorkommen des $\beta$ -Laktamase-Gens <i>blaZ</i> innerhalb der verschiedenen CC.....	<b>56</b>
<b>Tab. 13</b> Auftreten und Häufigkeit von Resistenzdeterminanten in den verschiedenen CC	<b>57</b>
<b>Tab. 14</b> Phänotyp der 189 Isolate in Abhängigkeit vom CC.....	<b>58</b>
<b>Tab. 15</b> Gegenüberstellung von Hämolyse-Verhalten und Hämolysin-Genen.....	<b>60</b>
<b>Tab. 16</b> Mittels Agardiffusionstest ermitteltes Resistenzverhalten der getesteten 189 Isolate in Abhängigkeit vom CC.....	<b>62</b>
<b>Tab. 17</b> Gegenüberstellung der Ergebnisse des Agardiffusionstests und der detektierten Resistenzdeterminanten.....	<b>64</b>
<b>Tab. 18</b> Reservoir, Charakteristika und Übertragungswege euter- und umwelt-assoziiertes Keime.....	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis:

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1</b> Exemplarische Darstellung von CC45.....	<b>4</b>
<b>Abb. 2</b> Schematische Darstellung der Arrayoberfläche.....	<b>32</b>
<b>Abb. 3</b> Funktionsweise eines Microarrays.....	<b>40</b>
<b>Abb. 4</b> Zusammenhang zwischen Vorhandensein von <i>lukF-P83/lukM</i> und CC .....	<b>54</b>
<b>Abb. 5</b> Diagnostisches Flussdiagramm zur Identifizierung „euterassoziiertes“ und „umweltassoziiertes“ <i>Staphylococcus aureus</i> und resultierende Sanierungsschwerpunkte.....	<b>87</b>

## Danksagung

Mein Dank für die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Pfeffer.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Landesvereinigung Thüringer Milch e.V., die die durchgeführten Untersuchungen zusammen mit der Thüringer Tierseuchenkasse finanziell ermöglichte. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Tierärzten der 34 Betriebe bedanken, die an den Untersuchungen beteiligt waren.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Karsten Donat für die Überlassung des Projektes, das damit verbundene entgegengebrachte Vertrauen, die fachlichen Diskussionen, die aufmunternden Worte und die Bereitschaft, den Schwerpunkt dieser Arbeit nach meinen Vorstellungen zu modifizieren.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Helmut Hotzel bedanken, der mir geduldig die für diese Arbeit erforderlichen molekularbiologischen Techniken beibrachte, konstruktive Ideen beisteuerte und mir immer eine Anlaufstelle bot. Weiterhin möchte ich mich bei seinen Kolleginnen Frau Dr. Anke Rüttger und Frau Gesine Kauth für die technische Unterstützung bedanken.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Karin Klengel, die mir mit unglaublicher Ruhe und Herzlichkeit die Erregerdifferenzierung beibrachte und deren Gehirn mir ständig ein Nachschlagewerk war. Danke auch an Frau Dr. Esra Einax, die mir besonders in der Anfangszeit Erste Hilfe leistete. Ganz herzlich möchte ich mich weiterhin bei den „Milchfrauen“ bedanken, die mich immer wieder hinter meinen „Diamanten“ hervorholten und mit Sicherheit noch alle 81 567 Projekt-Proben in ihren Armen spüren.

Mein Dank richtet sich darüber hinaus an meine Kollegen des Rindergesundheitsdienstes Thüringen, die mir jederzeit mit Rat und Tat sowie aufmunternden Worten zur Seite standen und die Nacht zum Tag machten, um eine gute Qualität der Milchproben sicherzustellen. Ohne die Arbeit von Frau Dr. Katja Hruschka, Frau Stefanie Söllner-Donat, Herrn Dr. Andreas Ahrens und Herrn Wolfram Siebert wäre ein solch umfangreiches Projekt nicht möglich gewesen.

Danke auch an all meine anderen Kollegen der Thüringer Tierseuchenkasse, die ich an dieser Stelle nicht aufzählen kann. Vielen Dank für die wunderschönen zweieinhalb Jahre, die verbalen und natürlich die schokoladigen Aufmunterungen!

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Ralf Ehricht und Herrn Dr. Stefan Monecke bedanken, deren Wissen ganze Bibliotheken füllt und die mich immer wieder daran teilhaben ließen. Danke auch an ihre Kolleginnen Elke Müller und Ines Engelmann für die Durchführung der Expressionsanalysen.

Ebenso danke ich Herrn Andreas Richter für die Durchsicht meiner Statistik-Daten.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und Johannes DANKE sagen. Danke für das Mitleiden bei Prüfungen. Danke für die Eis-Pausen. Danke für das Ertragen einer nicht immer gut gelaunten Person und danke, dass ihr immer da seid!