

6. Zusammenfassung

Hesselbarth, Judith: Untersuchungen zur Bakteriologie und Pathogenese der *Staphylococcus intermedius*-Infektion der Haut des Hundes.

Staphylococcus (Staph.) intermedius ist die vorherrschende Bakterienspezies, die aus Pyodermien beim Hund isoliert wird. Doch auch auf der klinisch gesunden Haut und den Schleimhäuten der Körperöffnungen ist er wesentlicher Bestandteil der Bakterienflora. Mit Blick auf Pathogenese, Therapie und Prophylaxe der kaninen Pyodermie stellt sich die Frage, ob sich die Stämme aus Pyodermien in diagnostisch-epidemiologisch relevanten Merkmalen oder in ihrer Ausstattung mit Virulenzfaktoren von den Stämmen der Normalflora unterscheiden.

55 Isolate aus Pusteltupfern von Hunden mit oberflächlicher Pyodermie und 40 Isolate aus Haut- und Schleimhauttupfern (je zehn Haut- und Nasentupfer, 20 Vaginaltupfer) von dermatologisch unauffälligen Hunden wurden vergleichend typisiert. Die phänotypische Charakterisierung betraf das biochemische Reaktionsprofil im ATB 32 Staph und das Resistenzverhalten im Agardiffusionstest gegenüber 13 Antibiotika. Die Typisierungsmethoden wurden hinsichtlich Typisierbarkeit der Isolate, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, Stabilität der Merkmale und diskriminatorisches Vermögen des Tests bewertet. Durch Verdauung der chromosomalen DNA mit der Restriktionsendonuklease *Sma* I und Auswertung der mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese im Agarosegel erhaltenen Fragmentmuster wurden 54 Stämme (28 aus Pustel-, je neun aus Haut- und Vaginal- und acht aus Nasentupfern) genotypisch charakterisiert.

Bei den Isolaten aus Pusteltupfern wurde außerdem untersucht, ob sie ein sogenanntes exfoliatives Toxin bilden. Dazu wurden konzentrierte Kulturüberstände dieser Isolate zwei bis drei Tage alten Babymäusen subkutan inokuliert. Analog wurden Hautproben von einem drei Monate alten Hundewelpen in vitro mit diesen Kulturüberständen inkubiert und anschließend histologisch untersucht.

Die vergleichende Phänotypisierung ergab keine Beziehung zwischen Herkunft der *Staph. intermedius*-Isolate und ihrer Zuordnung zu bestimmten Biovaren oder Resistenztypen. Allerdings ergab sich gleichzeitig aus den Bewertungskriterien, daß die dazu verwendeten, routinemäßig verfügbaren Methoden ein ungenügendes

Differenzierungsvermögen für eine solche Typisierung haben (diskriminatotischer Index nach HUNTER bei 95 % Reproduzierbarkeit kleiner als 0,9). Vier biochemische Reaktionsprofile unter den insgesamt zwölf verschiedenen Biovaren traten wesentlich häufiger auf (zusammen 82 % der Isolate). 55 % aller Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Besonders häufig war eine Resistenz allein gegenüber Oxytetracylin (31 % der resistenten Stämme). Die übrigen Resistenztypen waren durch eine gleichzeitige Unempfindlichkeit gegenüber mehreren Antibiotika gekennzeichnet. Diese Resistenzen richteten sich besonders gegen Chloramphenicol, Erythromycin, Lincomycin, Penicillin, Ampicillin und weniger gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Mit der Makrorestriktionsanalyse der chromosomalen DNA konnte kein klonaler Zusammenhang zwischen den Isolaten aus Pusteltupfern im Vergleich zu denen aus Haut- und Schleimhauttupfern aufgezeigt werden. Vielmehr war der geschätzte genetische Abstand unter den Isolaten aus Pusteltupfern bzw. unter denen aus der Vergleichsgruppe sowie zwischen allen Isolaten untereinander gleich groß. Er betrug zwischen 30 000 und 80 000 Basenunterschiede. Die Größe des Genoms von *Staph. intermedius* wurde anhand der Fragmentgrößen auf 1500 kb \pm 200 kb geschätzt.

Weder im Tierversuch an der Babymaus noch in vitro an der Hundehaut konnte ein exfoliatives Toxin im Kulturüberstand von *Staph. intermedius*-Isolaten aus Pusteltupfern nachgewiesen werden. Dagegen konnte mit dem Kulturüberstand toxinbildender Referenzstämmen von *Staph. aureus* im Bioassay an der Babymaus und in vitro an deren Haut die charakteristische Abschälung der Epidermis im Stratum granulosum reproduziert werden.

Es ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf Unterschiede zwischen Isolaten von *Staph. intermedius* aus Pustel- gegenüber solchen aus Haut- und Schleimhauttupfern. Hunde ohne und mit Pyodermie scheinen vielmehr Stämme mit ähnlichen Eigenschaften zu tragen, deren Virulenzmechanismen ausreichend sind, um bei einem disponierten Wirt eine Infektion zu etablieren.

Summary

Hesselbarth, Judith: Studies on bacteriology and pathogenesis of canine skin infections with *Staphylococcus intermedius*.

Staphylococcus (Staph.) intermedius is known to be part of the bacterial flora of the canine skin and mucosa of the body orifices. At the same time *Staph. intermedius* is considered to be the primary pathogen of bacterial skin diseases in the dog. With respect to pathogenesis, therapy and prophylaxis of canine pyodermas the question arises, whether strains isolated from cases of pyoderma differ in any characteristics relating to virulence or epidemiology from strains of the normal flora.

55 isolates from pustular swabs from dogs with superficial pyoderma and a total of 40 isoaltes from vaginal (20), nasal (10) and normal skin (10) swabs from healthy dogs were typed comparatively. Phenotyping comprised biotyping with the ATB 32 Staph-system and antibiogram typing with 13 antibiotics in an agar diffusion test. Typing methods were evaluated with respect to typability of isolates, reproducibility of results, stability of types and discriminatory power of the tests used. Genotyping was done using macrorestriction analysis. Genomic DNA from 54 isolates (28 from pustular swabs, nine from normal skin and vaginal swabs respectively and eight from nasal swabs) was digested with *Sma* I. The resulting fragments were separated using pulsed-field gel electrophoresis.

Isolates from pustular swabs were screened for their ability to produce an exfoliative toxin. Concentrated culture supernatants of broth cultures of *Staph. intermedius* were injected subcutaneously into two to three days old mice. Specimens of skin from a three month old puppy were incubated in vitro with the same concentrated culture supernatants and examined histologically.

No relationship could be demonstrated between source and phenotype for the 95 *Staph. intermedius* strains isolated from cases of canine pyoderma or healthy carriers. But then biotyping with the ATB 32 Staph-system and antibiogram typing, which were chosen for the general availability of these methods in diagnostic laboratories, proved to have insufficient discriminatory power for epidemiological typing. This was indicated by a discriminatory index according to HUNTER of less than 0,9 at the 95 % reproducibility level. A total of twelve different biotypes was detected and 82 % of all

strains belonged to four of these types. 55 % of all isolates showed resistance to at least one antibiotic. Among these resistance to oxytetracycline alone was the most common (31 % of the resistant strains). The strains of the remaining antibiogram types were multi-resistant. Multi-resistance included resistance to chloramphenicol, erythromycin, lincomycin, penicillin, ampicillin and to a lesser extent to trimethoprim/sulfamethoxazole.

Macrorestrictionanalysis of the genomic DNA revealed no clonal relationship between isolates from pustular swabs. The restriction patterns of these strains were as heterogenous as the patterns obtained from strains isolated from the nasal and vaginal mucosa and from the normal skin of healthy dogs. The genetic distance between strains was estimated between 30 000 and 80 000 base pairs. From the size of the fragments the size of the *Staph. intermedius* genome could be determined to be 1500 kb \pm 200 kb.

Neither with the bioassay using suckling mice nor in vitro with specimens of canine skin an exfoliative toxin could be demonstrated in concentrated culture supernatants of *Staph. intermedius* broth cultures. The typical splitting of the epidermis at the level of the stratum granulosum could be induced in the skin of suckling mice both in vivo and in vitro with concentrated culture supernatants of broth cultures of toxigenic *Staph. aureus* reference strains.

From this investigation it may be concluded that there are no differences between isolates of *Staph. intermedius* from cases of canine pyoderma and from healthy carriers. Dogs with and without pyoderma seem to carry strains of *Staph. intermedius* with similar characteristics and enough potential to cause infection given a predisposed host.