

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Untersuchte Tiere

In die Untersuchungen wurden 7 Hundezuchten über einen Zeitraum von 1¼ Jahren einbezogen. Für die Studie wichtige Angaben über die Zuchten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Für die Studie relevante Angaben über die Zuchten

ZÜCHTER-NR. UND HUNDERASSE	ANZAHL DER HÜNDINNEN MIT EINEM WURF	ANZAHL DER HÜNDINNEN MIT ZWEI WÜRFEN	ANZAHL DER VATERTIERE IM BESTAND
1) Par.J.Russel Terrier	5	–	–
2) Boxer	1	–	–
3) Labrador (blond)	1	–	–
4) Irish Wolfhound	3	–	–
5) Český Terrier	1	–	–
6) West.White Terrier	2	1	1
7) Dt. Schäferhund	1	–	–

Die Wurfgröße in den Zuchten variierte zwischen 1 und 7 Welpen.

##### **Hündinnen**

Von 14 Hündinnen mit 15 Würfen wurden insgesamt jeweils 88 Tupferproben der Haut, Vaginal- und Maulschleimhaut und 208 Milchsekretproben zur bakteriologischen Untersuchung genommen.

##### **Deckrüden**

Insgesamt stand nur ein Vatertier aus eigenem Bestand für Untersuchungen zur Verfügung. Von diesem Tier wurde jeweils eine Probe der Maulschleimhaut, Haut und Präputialschleimhaut sowie eine Ejakulatprobe zur bakteriologischen Untersuchung genommen.

## **Welpen**

Von 59 Welpen wurden insgesamt jeweils 281 Tupferproben der Maulschleimhaut und der Analregion und zusätzlich 2 Nasensekrettupfer und 4 Kotproben zur bakteriologischen Untersuchung genommen.

### **3.1.2 Umwelt**

Bei 15 Würfen wurden 146 Proben vom Lager der Tiere zur bakteriologischen Untersuchung entnommen und 16 Luftkeimgehaltsuntersuchungen durchgeführt.

### **3.1.3 Menschen**

Von den die Hundezuchten betreuenden Personen wurden jeweils 16 Tupferproben der Haut und Mundschleimhaut zur bakteriologischen Untersuchung entnommen.

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Erfassung des Vorberichts**

Die Anamnese beschränkte sich auf Parameter der Reproduktion. Dabei wurden die Züchter zu folgenden Punkten befragt: bisheriger Trächtigkeitsverlauf, Auffälligkeiten an Gesäuge und Vulva, frühere Geburten und Welpensterblichkeit. Beim Deckrüden interessierten Auffälligkeiten im Präputialbereich und Deckgeschehen.

### **3.2.2 Klinische Untersuchung**

Einer kurzen allgemeinen Untersuchung (Atmung, Temperatur, Puls und Ernährungszustand) der Elterntiere folgte die Untersuchung der Geschlechtsorgane und des Gesäuges.

#### Vulva und Vagina:

Einer äußeren Adspektion, nach Spreizen der Schamlippen, folgte die innere Untersuchung mittels eines sterilen Röhrenspekulums. Es wurden Schleimhaut und Sekrete, bezogen auf den Zykluszustand, beurteilt.

### Gesäuge:

Bei der Adspektion und Palpation des Gesäuges wurde auf Rötung, vermehrte Wärme, Schwellung und Schmerzhaftigkeit, sowie auf Hautveränderungen geachtet.

### Präputium:

Nach Zurückziehen der Vorhaut konnte die Farbe und Oberflächenbeschaffenheit der Präputialschleimhaut (parietales und viszerales Blatt) beurteilt werden.

### Welpen:

Alle Welpen eines Wurfes wurden hinsichtlich maskierter und sichtbarer Fehlbildungen untersucht. Klinisch relevante, für Welpenerkrankungen spezifische Symptome (Winseln/Schreien, Körpertemperaturerhöhung oder -erniedrigung, Unruhe, Apathie, Krämpfe, fehlender oder nachlassender Saug- oder Schluckreflex sowie zu geringe Körpergewichtszunahmen) wurden dokumentiert.

## **3.2.3 Technik der Probenentnahme**

Die Entnahme der zur bakteriologischen Untersuchung vorgesehenen Proben wurde stets den klinischen Untersuchungen vorangestellt, um eine Kontamination mit Fremdkeimen zu verhindern.

Alle Tupferproben wurden mittels eines in steriler isotonischer Kochsalzlösung angefeuchteten Baumwolltupfers der Firma bioMérieux (Marcy-l'Etoile, Frankreich) entnommen.

### **3.2.3.1 Intervalle der Probenentnahmen**

Die Untersuchung eines Wurfes umfasste den Zeitraum von 1 Woche *ante partum* bis 8 Wochen *post partum*.

In der letzten Woche vor dem errechneten Geburtstermin wurden jeweils eine Tupferprobe der Scheide, der Haut am Bauch und der Maulschleimhaut der trächtigen Hündin, sowie zwei Proben des Lagers genommen.

Spätestens 24 Stunden nach der Geburt wurden bei der Mutterhündin eine weitere Scheidentupferprobe, eine Tupferprobe der Haut, der Mundschleimhaut sowie 4 Proben des Milchsekretes aus den rechten und linken 2 kaudalen Mammakomplexen isoliert. Bei den Welpen wurden Tupferproben der Mundschleimhaut und der Analregion entnommen und

zusätzlich 2 Proben vom Boden der Wurfbox oder Dingen des täglichen Gebrauchs, wie zum Beispiel Fressgeschirren.

Diese Proben wurden weiterhin in einem Intervall von 2 Wochen, bis zum Alter der Welpen von 8 Wochen, genommen. Wurden Krankheitszeichen der Welpen oder der Mutterhündin von den Züchtern gemeldet, so wurden diese Proben noch am gleichen Tag, nach dem gleichen Schema entnommen und zusätzlich je nach Art der Erkrankung weitere Proben, wie zum Beispiel bei Diarrhoe Kotproben oder bei Nasenausfluss Tupferproben des Nasensekretes.

Weiterhin wurde in der 2. Lebenswoche der Welpen die Konzentration an luftgetragenen Keimen der Wurfbox beziehungsweise Zwingeranlage bestimmt. Von der betreuenden Person wurde zu diesem Zeitpunkt eine Tupferprobe der Mundschleimhaut und der Haut genommen. War das Vatertier im eigenen Bestand, so wurden einmalig, in der 2. Lebenswoche der Welpen, Tupferproben der Haut, Maulschleimhaut und des Präputiums sowie eine Ejakulatprobe genommen.

### **3.2.3.2 Untersuchung des Luftkeimgehaltes**

Zur Quantifizierung des Luftkeimgehaltes wurde ein 6-stufiger Kaskadenimpaktor nach ANDERSEN (1958) verwendet. Der Sammler wurde mit einem Luftdurchsatz von 28,3 l/min über einen Zeitraum von 10 Minuten betrieben. Zur Sammlung der luftgetragenen Bakterien wurde 5 %iger Hammelblutagar genutzt.

### **3.2.3.3 Untersuchung des Keimgehaltes der Umgebung**

Zur Untersuchung des Keimgehaltes der Umgebung wurden jeweils zwei Baumwolltupferproben des Tierlagers bzw. der Fressgeschirre genommen.

### **3.2.3.4 Probennahme am Tier**

#### Vaginalabstrich

Nach trockener Reinigung, Spreizen der Vulva und Einführen eines sterilen Scheidenspekulums bis in den kranialen Vaginalbereich wurde ein Baumwolltupfer am kranialen Scheidendach abgestrichen .

### Haut

Die Tupferprobe der Haut wurde mit einem Baumwolltupfer ventral am Abdomen auf Höhe des Bauchnabels genommen. Diese Probennahme erfolgte immer vor der Entnahme der Gesäugesekretproben, da diese eine Desinfektion der Haut voraussetzten.

### Gesäugesekret

Nach der Desinfektion der beiderseits letzten 2 kaudalen Mammakomplexe mit 70 %igem Alkohol erfolgte die Entnahme der Milchproben. Nach dem Verwerfen der ersten Tropfen wurden einige Tropfen Milch auf einen Tupfer ermolken, ohne dabei mit diesem Tupfer die Zitze zu berühren.

### Mundschleimhaut

Nach dem Öffnen des Mauls wurde ein Abstrich der bukkalen Mundschleimhaut genommen.

### Abstrich der Analregion

Beim Welpen wurde nach Anheben der Schwanzwurzel eine Tupferprobe von der pigmentierten, äußeren Haut des Anus genommen.

### Präputialabstrich

Nach dem Zurückziehen der Vorhaut des Deckrüden wurde ein Baumwolltupfer zirkulär um das distale Ende des Penis abgestrichen.

### Spermagewinnung

Die Phase des Vorsekrets, die spermienreiche Fraktion und das Prostatasekret wurden getrennt in drei Tulpengläsern aufgefangen.

Diese 3 Phasen des Ejakulats wurden zur Aufbewahrung und zum Transport in Spermaampullen aus Plastik gefüllt, die eine Temperatur von 30° C konstant beibehalten.

### **3.2.3.5 Probennahme am Menschen**

Es wurde jeweils eine Tupferprobe der buccalen Mundschleimhaut und der Dorsalfläche des Handgelenkes genommen. Je nach dem, ob die Person Rechts- oder Linkshänder war, wurde die motorisch bevorzugte Hand gewählt.

### **3.2.3.6 Untersuchungen an verendeten bzw. euthanasierten Welpen**

Verendete oder euthanasierte Welpen wurden innerhalb von 24 Stunden in das „Institut für Veterinärpathologie“ der Freien Universität Berlin gebracht. Nach der Sektion wurden Proben der großen Parenchyme wie Leber, Niere, Milz und Herz sowie aus Darm und Darmlymphknoten im „Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen“ der Freien Universität Berlin/Fachbereich Veterinärmedizin bakteriologisch untersucht.

Insgesamt wurde von 11 Welpen Organmaterial postmortal bakteriologisch untersucht. Davon waren:

- 4 Welpen tot geboren
- 6 Welpen verendet und
- 1 Welpen euthanasiert.

### **3.2.3.7 Aufbewahrung und Transport der Proben**

Alle Tupferproben wurden direkt nach der jeweiligen Entnahme in einem Röhrchen mit sterilem Transportmedium zusammen mit den Blutagarplatten des Andersen Luftkeimsammlers und den Spermaampullen innerhalb von 2 Stunden in das „Institut für Tier- und Umwelthygiene“ der Freien Universität Berlin/Fachbereich Veterinärmedizin transportiert.

### **3.2.4 Probenbearbeitung**

Alle gewonnenen Proben wurden generell auf das Vorhandensein von *Staphylococcus aureus*, *intermedius* sowie *Streptococcus canis* untersucht.

#### 1. Proben der Umgebungsluft der Tiere:

Die Proben auf den Blutagarplatten wurden 48 Stunden aerob bei 37° C kultiviert. Zur Bestimmung der aeroben Gesamtkoloniezahl wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Anzahl entsprechend der Konversionstabelle nach ANSERSEN (1958) korrigiert. Unter Berücksichtigung des Luftdurchsatzes und der Sammelzeit wurde dann die aerobe Gesamtkoloniezahl in KE/m<sup>3</sup> berechnet. Zur weiteren Differenzierung wurden *Staphylococcus aureus*-, *intermedius*- und *Streptococcus canis*- verdächtige Kolonien subkultiviert und weiter biochemisch beziehungsweise serologisch charakterisiert.

## 2. Tupfer- und Ejakulatproben:

Die Tupferproben sowie die Vor-, Haupt- und Nachphase des Ejakulates wurden fraktioniert auf 5 %igem Hammelblutagar, Staphylokokken- und Streptokokken-Selektivnährböden (siehe Punkt 3.2.4.1) ausgestrichen und bei 37° C aerob kultiviert. Das Keimwachstum wurde nach 24, 48 und 72 Stunden beurteilt. Unter Berücksichtigung der Koloniemorphologie, des Haemolyseverhaltens und der Gramfärbung wurden *Staphylococcus aureus*-, *intermedius*- und *Streptococcus canis*- verdächtige Kolonien selektiert. Die Speziesdifferenzierung erfolgte anhand nachstehend aufgeführten morphologischen und biochemischen Parametern.

### *Staphylococcus aureus*:

1. nach 18-24 Stunden bei 37° C 1-3 mm große, weiße bis goldgelbe, glänzende Kolonien, meist mit ausgeprägter Hämolyse
2. grampositive Kugelbakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm
3. Katalase-positiv
4. anaerobe Glukoseverwertung positiv
5. Koagulase-positiv
6. Voges Proskauer-Reaktion positiv
7. anaerobe Mannitverwertung positiv

### *Staphylococcus intermedius*:

1. nach 18-24 Stunden bei 37° C 1-3 mm große, grau-weiße und unpigmentierte, glänzende Kolonien, Hämolyse variabel
2. grampositive Kugelbakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm
3. Katalase-positiv
4. anaerobe Glukoseverwertung positiv
5. Koagulase-positiv
6. Voges Proskauer-Reaktion negativ
7. anaerobe Mannitverwertung negativ

### *Streptococcus canis*:

1. nach 24-48 Stunden bei 37° C 0,5-1 mm große Kolonien mit deutlicher β-Hämolyse
2. Katalase-negativ
3. Hyaluronidase negativ
4. positive alpha- und β-Galaktosidaseaktivität

5.  $\beta$ -Glucoronidase-negativ
6. Trehalose-negativ
7. Lancefield-Gruppe G

#### **3.2.4.1 Verwendete Selektivnährböden**

##### 1. Staphylokokken:

Mannit-Kochsalz-Agar (Chapman-Nährboden, Firma Oxoid, Wesel, Deutschland) supplementiert mit 5 % Hammelblut wird zum Nachweis und zur Isolierung von präsumptiven, pathogenen Staphylokokken aus Milch, Lebensmitteln und anderem Untersuchungsmaterial empfohlen.

Es handelt sich um einen Komplettagar, auf dem wegen des hohen Kochsalzgehaltes (7,5 %) nur halophile Mikroorganismen wachsen können. *Staphylococcus aureus* ist dabei in der Lage, den Zucker Mannit bis zur Säure zu oxidieren, was durch einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot nach gelb angezeigt wird (MERSCH-SUNDERMANN, 1989).

##### 2. Streptokokken:

COBA-Selektivnährboden: Columbia-Agar-Basis angereichert mit Streptokokken-Selektiv-Supplement (Firma Oxoid, Wesel, Deutschland) dient der Isolierung von Streptokokken aus klinischem Untersuchungsmaterial oder Lebensmitteln.

Columbia-Agar-Basis ist ein Kompletmedium, das neben Agar-Agar und Kochsalz einen hohen Anteil an Spezialpeptonen und Stärke enthält (MERSCH-SUNDERMANN, 1989).

#### **3.2.4.2 Verwendete biochemische Differenzierungstests**

Koagulase-Test: *Staphylococcus aureus* und *intermedius* können Plasma verschiedener Tierarten koagulieren (plasmakoagulase-positive Staphylokokken). Unterschieden werden muss freie (als Exoenzym ins Außenmilieu abgegebene) von membrangebundener Plasmakoagulase. Die Überprüfung der membrangebundenen Plasmakoagulase erfolgte durch Suspension des Staphylokokkenstammes in einem Tropfen Citratplasma vom Kaninchen (Merck Diagnostika, Darmstadt, Deutschland). Im positiven Fall kommt es zu einer deutlichen Verklumpung des Plasmas (Gerinnung).

Katalase-Nachweis: Katalase dient aeroben Bakterien zur Entgiftung von Peroxiden. Katalase spaltet Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in Wasser und Sauerstoff. Tropft man eine 3 %ige  $H_2O_2$ -



Lösung auf eine Kultur katalasebildender Bakterien, so entweicht schlagartig der Sauerstoff (Aufschäumen).

Hyaluronidase: Das Enzym Hyaluronidase depolymerisiert Hyaluronsäure in kleinere Bruchstücke. Bei dem Hyaluronidasenachweis nach Murray und Pearce wurde ein schleimig wachsender *Streptococcus equi*-Stamm in parallelen Strichen quer über eine Blutagarplatte aufimpft und senkrecht dazu, mit breitem Impfstrich, der zu untersuchende Stamm. Nach 24-stündiger aerober Bebrütung bei 37° C wurde bei Hyaluronidaseproduktion durch den zu untersuchenden Streptokokken-Stamm das schleimige Wachstum von *Streptococcus equi* an den Kreuzungspunkten unterbunden (Dekapsulationstest).

Fermentationstest (nach Hugh und Leifson): Als Fermentation werden anaerobe Reduktions-Oxidationsvorgänge gegenüber Kohlenhydraten bezeichnet, bei denen saure Stoffwechselprodukte (organische Säuren) entstehen. Ein Pepton-Agar-Röhrchen, das Glucose sowie einen pH-Indikator (Bromthymolblau) enthält, wurde im senkrechten Strich bis auf den Röhrchenboden beimpft, mit einer Paraffinschicht abgedeckt und anschließend 2-4 Tage bei 37° C bebrütet. Bei fermentierenden Mikroorganismen wird das Röhrchen im gesamten Agarbereich angesäuert und damit gelb.

Voges-Proskauer-Reaktion: Sie beruht auf dem Nachweis von Acetoin (Acetylmethylcarbinol), das von einigen Mikroorganismen als Endprodukt des Glucoseabbaus gebildet werden kann. Zur Testung der Acetoinproduktion wird eine glucosehaltige Bouillon beimpft. Nach 2- bis 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird der Bouillon ein Indikatorreagenz (VP-Reagenz = 1ml 5 %ige alpha-Naphtollösung in 96 %igem Äthanol und 0,5ml 40 %ige wässrige Kalilauge) zugegeben. Als positive Reaktion zeigt sich nach 1 bis 2 Minuten eine rote Verfärbung.

### **3.2.4.3 Serologische Differenzierung der Streptokokken-Isolate**

Agglutinationsreaktion: Nach Lancefield weist die Mehrheit der pathogenen Streptokokken spezifische Kohlenhydrat-Antigene auf, die eine Klassifizierung in Gruppen erlaubt. Diese Streptokokken-Gruppen-Antigene können extrahiert und mit Hilfe von Latex-Partikeln nachgewiesen werden, die mit gruppenspezifischen Antikörpern beschichtet wurden. Die Latex-Partikel agglutinieren in Gegenwart der entsprechenden Antigene, bleiben bei deren Abwesenheit jedoch in Suspension.

Zur serologischen Differenzierung der gewonnen Streptokokken-Isolate wurde der Test-Kit der Firma Oxoid (Wesel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Isolate wurden auf Blutagar bei 37° C über Nacht kultiviert. Es wurden 2-5 Testkolonien ausgewählt, mit einer Öse abgenommen, im Extraktionsenzym emulgiert und 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Der Extrakt war anschließend gebrauchsfertig. Von den auf Raumtemperatur verbrachten Latex-Identifizierungs-Reagenzien A, B, C, D, F und G wurde jeweils ein Tropfen auf die Reaktionskarte gegeben und jeweils ein Tropfen des Extraktes hinzupipettiert, mit einem jeweils neuen Rührstäbchen vermischt und danach die Reaktionskarte für maximal eine Minute vorsichtig hin- und herbewegt. Zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle wie eben beschrieben durchgeführt.

Der Test wurde als positiv betrachtet, wenn mit dem Gruppen-Reagenz G eine Agglutination erschien, da dieses Reagenz den Nachweis von *Streptococcus canis* bestätigt.

#### **3.2.4.4 Konservierung der Isolate**

Alle *Streptococcus canis*-, *Staphylococcus aureus*- und *intermedius*-Isolate wurden bei -72° C mittels dem „Advanced micro-organism storage system“ von MAST DIAGNOSTICA (Reinfeld, Deutschland) bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen gelagert.

#### **3.2.5 Auswahl der Isolate zur subspeziesspezifischen Typisierung**

Nach der unter Punkt 3.2.4 beschriebenen Probenbearbeitung und Zusammenfassung der Befunde war zu erkennen, dass *Staphylococcus intermedius* in großer Anzahl vertreten war, dagegen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus canis* nur sporadisch auftraten. Des Weiteren ließ sich in der Zeit nach der Geburt ein deutlicher Anstieg der Nachweishäufigkeit erkennen. Daher gelangten nur *Staphylococcus intermedius*-Isolate zur weiteren Untersuchung, wobei sich die Differenzierung auf den Zeitraum kurz nach der Geburt konzentrierte.

#### **3.2.6 Differenzierung von *Staphylococcus intermedius*-Isolaten**

Von *Staphylococcus intermedius*-Isolaten verschiedener Zuchten wurden zur weiteren Differenzierung Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfungen und Fingerprintingprofile mittels der RAPD-Technik erstellt. Beide Techniken sind geeignet, verschiedene Stämme derselben Spezies zu differenzieren und können so auch zur Identifizierung von Keimquellen genutzt

werden (THIELE, 1991; BLOBEL und SCHLIESSER, 1994; HESSELBARTH et al., 1994; PEDERSEN und WEGENER, 1995).

### 3.2.6.1 “Random Amplifikation of Polymorphic DNA”-Technik

Gerade dann, wenn die Umwelt als Übertragungsweg von Mikroorganismen vermutet wird, reicht der diagnostische Nachweis von interessierenden Krankheitserregern allein auf Spezies- oder Serovarebene in verschiedenen Umweltkompartimenten sowie bei einem potentiellen Donor oder Rezipienten nicht aus, die zum Teil hoch komplizierten Übertragungswege aufzudecken. Für deren kausale Erklärung werden Methoden mit höherer Trennschärfe benötigt. Durch das Handwerkzeug der genotypischen Fingerprinting-Technik eröffnet sich die Möglichkeit, auch in den Fragestellungen der Umwelthygiene zu besser fundierten Antworten zu kommen (BEYER und BÖHM, 1999).

Alle zur weiteren Untersuchung gelangten *Staphylococcus intermedius*-Isolate wurden mittels RAPD-Technik („Random Amplifikation of Polymorphic DNA“) differenziert.

#### • DNA-Isolation

Zur Isolierung der DNA wurde der Wizard® Genomic DNA Purification Kit von PROMEGA (Madison, USA) verwendet. Zur Verbesserung der Isolationsausbeute wurde Lysostaphin eingesetzt. Das Protein Lysostaphin ist eine Peptidoglykanhydrolase, welche von *Staphylococcus simulans* produziert wird und die Zellwände von grampositiven Bakterien auflöst (BROWDER et al., 1965).

Die extrahierte und gereinigte DNA wurde mit der Rehydrierungs-Lösung des Test-Kits konserviert und bei 2 bis 8° C bis zu maximal 4 Wochen gelagert.

#### •DNA-Konzentrationsbestimmung

Der DNA-Gehalt der Proben wurde nach AUSUBEL et al. (1992) mittels dem Photometer DyNA Quant 200 der Firma Hoefer (San Francisco, USA) unter Verwendung des DyNA Quant 200 Kit der Firma Hoefer (San Francisco, USA) bestimmt.

#### •PCR-Reaktion

Zur Durchführung der PCR-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“) wurden „Ready To Go RAPD analysis beads“, der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA), genutzt. Diese Analysekügelchen enthalten 2 thermostabile Polymerasen, dNTPs und Puffer.

Zur Differenzierung der einzelnen Isolate wurden folgende Primer der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA) verwendet:

- RAPD Analysis Primer 1: (5'-d[GGTGCGGGAA]-3')
- RAPD Analysis Primer 2: (5'-d[GTTTCGCTCC]-3')
- RAPD Analysis Primer 3: (5'-d[GTAGACCCGT]-3')
- RAPD Analysis Primer 4: (5'-d[AAGAGCCCGT]-3')
- RAPD Analysis Primer 5 : (5'-d[AACGCGCAAC]-3')
- RAPD Analysis Primer 6: (5'-d[CCCGTCAGCA]-3')

Zuerst wurde aus den 7 verschiedenen Zuchten jeweils eine Hündin ausgewählt. Von diesen Hündinnen wurde jeweils ein *Staphylococcus intermedius*-Isolat der Maul- und Vaginalschleimhaut oder der Haut, aus dem Probennahmenzeitraum vor der Geburt, mittels RAPD-Technik untersucht. Hierbei wurden alle 6 Primer verwendet. Ziel dieser Untersuchungen war es zum einen zu sehen, ob sich die *Staphylococcus intermedius*-Isolate aus verschiedenen Hundezuchten voneinander unterscheiden. Zum anderen dienten die Untersuchungen dazu, Primer mit dem größten Diskriminierungspotential auszuwählen.

Danach wurden bei der Hündin Nr. 2 aus der Zucht Nr. 6 *Staphylococcus intermedius*-Isolate der Maul-, Vaginalschleimhaut, Haut und 4 Milchproben mit den Isolaten von Maulschleimhaut und Analregion von 2 ihrer Welpen sowie 2 Isolaten des Lagers, von dem Probennahmenzeitraum kurz nach der Geburt, verglichen.

Isolate aus diesen Quellen wurden auch bei dem zweiten Wurf dieser Hündin 6 Monate nach dem ersten Wurf vergleichend untersucht.

Diese Untersuchungen wurden mit den Primern 5 und 6 des „Ready To Go RAPD analysis beads“-Test-Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) durchgeführt, da sich gezeigt hatte, dass diese zwei Primer die *Staphylococcus intermedius*-Isolate aus den verschiedenen Hundezuchten am stärksten differenzierten.

Für die PCR-Reaktion wurden 25 pmol des jeweiligen Primer und 10 ng DNA der zu differenzierenden Stämme eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler Typ Gene Amp, PCR-System 2400 der Firma Perkin Elmer (Göttingen, Deutschland) folgendermaßen durchgeführt:

5 Minuten bei 95° C, 1 Zyklus

1 Minute bei 95° C, 1 Minute bei 36° C und 2 Minuten bei 72° C, 45 Zyklen

Aufbewahrung bei 4° C bis zur elektrophoretischen Analyse

#### ▪Gelelektrophorese

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel bei 90 Volt, über einen Zeitraum von 3,5 bis 4 Stunden, aufgetrennt. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid gefärbt, mittels eines Transilluminators visualisiert und anschließend fotografiert.

#### ▪Auswertung der Gelelektrophoresedaten

Der übliche Weg, die durch die elektrophoretische Auftrennung erhaltenen komplexen Muster zu analysieren, ist nach TENOVER et al. (1995) die einzelnen Banden der verschiedenen Isolate miteinander zu vergleichen.

Die Autoren schlagen folgende Einteilung für die Einschätzung der genetischen Verwandtschaft vor:

- keine der Banden verschieden: nicht zu unterscheiden,
- 2-3 Banden unterschiedlich: eng verwandt,
- 4-6 Banden unterschiedlich: möglicherweise verwandt,
- 7 und mehr Banden unterschiedlich: nicht verwandt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Differenzierung nur in zwei Gruppen (1. keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Banden vorhanden und 2. Unterschiede zwischen den jeweiligen Banden vorhanden), um so Hinweise auf identische Klone zu erhalten.

Als großes Problem sehen TENOVER et al. (1995) an, dass Isolate von verschiedenen Gelen nicht einfach miteinander vergleichbar sind. Daher wurden in dieser Studie die jeweils zu vergleichenden Isolate stets zusammen auf ein und demselben Agarosegel aufgetrennt.

Die Auswertung der PCR-Photographien erfolgte visuell.

Alle zu differenzierenden Isolate wurden mit den jeweiligen Primern mindestens zweimal mittels der RAPD-Technik analysiert.

### **3.2.6.2 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung**

Für definierte umwelthygienische Fragestellungen, wenn auch nur mit zeitlich und räumlich begrenzter Aussagekraft, kann eine auf der Verfolgung der Antibiotikaresistenzprofile beruhende Arbeitsweise hilfreich sein (MÜLLER et al., 1976). MÜLLER und WIESER (1987) stellten in ihren Studien mit luftgetragenen Bakterien fest, dass sich abhängig von der Tierspezies bei verschiedenen Chemotherapeutika Resistenzen entwickeln. Eine Studie von TSCHÄPE (1996) zeigte, dass es seltene Antibiotikaresistenzen ermöglichen,

epidemiologische Studien über die Verbreitungswege von Keimen in der Umwelt durchzuführen.

Alle *Staphylococcus intermedius*-Isolate, die mittels RAPD-Analyse verglichen wurden, wurden auch dem Antibiotika-Resistenztest unterzogen.

Zur Ermittlung der Antibiotika-Empfindlichkeit wurden Antibiotika-Testringe der Firma MAST DIAGNOSTICA (Reinfeld, Deutschland) verwendet. Dieser Agardiffusionstest für Routineuntersuchungen arbeitet in Anlehnung an die Veröffentlichung von BAUER et al. (1966) nach DIN 58940.

Die zu untersuchenden Isolate wurden alle am gleichen Tag in Standard-I-Nährbouillon (Biotest, Dreieich, Deutschland) angezüchtet und auf Mueller-Hinton-Agar der Firma MAST DIAGNOSTICA (Reinfeld, Deutschland) kultiviert.

Die beimpften und mit Antibiotika-Testringen beschickten Agarplatten wurden bei 37° C 16-20 Stunden bebrütet. Die Messung des Hemmhofdurchmessers erfolgte, direkt nach der Entnahme aus dem Brutschrank, von der Rückseite der Platten mit einer Schieblehre in mm, wobei als Grenze der Rand galt, in dem die Kolonien deutlich vermindertes oder kein Wachstum zeigten.

Folgende Chemotherapeutika wurden mittels Agardiffusion getestet:

- Amoxicillin/Clavulansäure
- Ampicillin
- Chloramphenicol
- Enrofloxacin
- Erythromycin
- Gentamycin
- Lincomycin
- Neomycinsulfat
- Nitrofurantoin
- Oxacillin
- Penicillin G
- Polymyxin B
- Spectinomycin
- Streptomycin
- Sulfamethoxazol
- Tetracyclin
- Tylosin.