

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Phäno- und Genotypisierung von Streptokokken der
serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*),
isoliert von verschiedenen Tierarten**

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

Eingereicht von
Ali Önder Yildirim

Gießen 2002

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Christoph Lämmler

**Phäno- und Genotypisierung von Streptokokken der
serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*),
isoliert von verschiedenen Tierarten**

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

Eingereicht von
Ali Önder Yildirim
Tierarzt aus Tunceli, Türkei

Gießen 2002

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Lämmle

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2002

Babama, Anneme ve Dayim Fethi'ye

Meiner Eltern und meinem Onkel Fethi

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Taxonomische Einordnung	3
2.2 Isolierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B bei Tier und Mensch	4
2.2.1 Bedeutung von B-Streptokokken als Mastitiserreger des Rindes	4
2.2.2 Nachweis bei Hund und Katze	6
2.2.3 Nachweis bei anderen Tierarten	7
2.2.4 Erkrankungen des Menschen	8
2.2.4.1. Erkrankungen von Neugeborenen	8
2.2.4.2. Erkrankungen von Erwachsenen	11
2.3 Serologische Eigenschaften von Streptokokken der serologischen Gruppe B	12
2.3.1 Gruppenpolysaccharidantigen	12
2.3.2 Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B	14
2.3.2.1 Typenantigene Ia und Ib	15
2.3.2.2 Typenantigen II	16
2.3.2.3 Typenantigen III	18
2.3.2.4 Typenantigene IV, V, VI, VII und VIII	20
2.3.3 Proteinantigene	24
2.3.3.1 Antigen R, Rib und „R-associated antigen“ (Ra)	24
2.3.3.2 Antigen X	28
2.3.3.3 Antigen c	29
2.4 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren von Streptokokken der serologischen Gruppe B	31
2.4.1 Hämolysin und CAMP-Faktor	31
2.4.2 Hyaluronidase	34

	Seite
2.4.3 C5a-Peptidase	36
2.4.4 Bindung von Proteinen	37
2.4.4.1 Fibrinogen	37
2.4.4.2 Fibronektin	38
2.4.4.3 Laktoferrin	39
2.4.4.4 Immunglobulin A	40
2.4.4.5 Immunglobulin G	41
2.4.4.6 β 2-Mikroglobulin	41
2.4.4.7 Laminin	42
2.4.4.8 Cytokeratin 8	43
3. Material und Methoden	44
3.1 Bakterienkulturen	44
3.2 Anzüchtungsmedien	45
3.3 Identifizierung	46
3.3.1 Hämolysen und CAMP-Test	46
3.3.2 Biochemische Reaktionen	47
3.3.2.1 Abbau von Kohlenhydraten	47
3.3.2.2 Hydrolyse von Äskulin	47
3.3.2.3 Hydrolyse von Natrium-Hippurat	47
3.3.3 Serologische Gruppenbestimmung	48
3.3.3.1 Extraktion des Gruppenpolysaccharidantigens	48
3.3.3.2 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony	48
3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)-vermittelte Identifizierung	49
3.3.4.1 Analyse des 16S ribosomalen RNA-Gens mittels PCR	49
3.3.4.1.1 Präparation der bakteriellen DNA	49
3.3.4.1.2 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens	50

	Seite
3.3.4.1.3 Restriktionsverdau des 16S rRNA-Gens	51
3.3.4.1.4 Nachweis der Amplifikate und Fragmente im Agarosegel	51
3.3.4.2 PCR mit <i>S. agalactiae</i> -16S rDNA- spezifischen Oligonukleotidprimern	52
3.3.4.3 PCR mit <i>S. agalactiae</i> - 16S-23S rDNA- „intergenic spacer“- Region-spezifischen Oligonukleotidprimern	53
3.3.4.4 Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens <i>cfb</i>	53
3.4 Phäno- und genotypische Charakterisierung	54
3.4.1 Serotypisierung	54
3.4.1.1 Extraktion der Typenantigene	54
3.4.1.2 Absorption der Antiseren	54
3.4.1.3 Nachweis der Typenantigene durch Immundiffusion	57
3.4.2 PCR-vermittelte Typisierung	57
3.4.2.1 Amplifizierung des <i>bag</i> -Gens (Proteinantigen cβ)	57
3.4.2.2 Amplifizierung des <i>rib</i> -Gens (Proteinantigen Rib)	58
3.4.2.2.1 Abrufen der Gensequenzen aus der Gendatenbank und Auswahl der Oligonukleotidprimer	58
3.4.2.2.2 Amplifizierung	61
3.4.3 Pigmentbildung	61
3.4.4 Ermittlung der Kettenlänge	62
3.4.5 Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium	62
3.5.6 Wachstum in Soft-Agar	62
3.4.7 Salz-Aggregationstest	63
3.4.8 Adhäsion an DEAE- Sephacel	63
3.4.9 Hämagglutination	64
3.4.9.1 Gewinnung der Erythrozyten	64
3.4.9.2 Hämagglutinationstest	65

	Seite
3.4.10 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten	65
3.4.11 Analyse des Enzyms Hyaluronidase bzw. des Hyaluronidase-Gens <i>hylB</i>	67
3.4.11.1 Dekapsulationstest	67
3.4.11.2 Nachweis des Hyaluronidase-Gens <i>hylB</i> mittels PCR	67
3.4.11.2.1 Präparation der bakteriellen DNA	67
3.4.11.2.2 Amplifizierung des Hyaluronidase-Gens <i>hylB</i>	67
3.4.11.3 Insertionselement <i>IS1548</i>	69
3.4.11.3.1 Abrufen der Gensequenzen aus der Gendatenbank und Auswahl der Oligonukleotidprimer	69
3.5 Untersuchung von weiteren mutmaßlichen Virulenzgenen und dem Insertionselement <i>ISSag</i>	71
3.5.1 Amplifizierung des C5a-Peptidase-Gens <i>scpB</i>	71
3.5.2 Amplifizierung des Laminin-bindenden Protein-Gens <i>lmb</i>	71
3.5.3 Amplifizierung des Insertionselements <i>ISSag</i>	71
3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	72
4. Ergebnisse	73
4.1 Identifizierung der Kulturen	73
4.2 Phäno- und genotypische Eigenschaften	81
4.2.1 Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung	81
4.2.2 Pigmentbildung	89
4.2.3 Ermittlung der Kettenlänge und Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium und Soft-Agar	91
4.2.4 Salz-Aggregationstest und Adhäsion an DEAE- Sephacel	93
4.2.5 Nachweis von hämagglutinierenden Eigenschaften	96
4.2.6 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten	97

	Seite
4.2.7 Nachweis des Enzyms Hyaluronidase bzw. des Hyaluronidase-Gens <i>hylB</i> und des Insertionselements IS 1548	100
4.2.8 Nachweis von weiteren mutmaßlichen Virulenzgenen und dem Insertionselement ISSag	106
5. Diskussion	110
6. Zusammenfassung	129
7. Summary	131
8. Türkçe Özeti	133
9. Literaturverzeichnis	135

1. Einleitung

Streptococcus agalactiae, der Erreger des seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannten „Gelben Galts“, einer kontagiösen Rindermastitis, konnte 1887 erstmals von NOCARD und MOLLEREAU aus einer Mastitismilchprobe isoliert werden. Euterinfektionen mit *S. agalactiae* führen, trotz abnehmender Bedeutung, zu großen wirtschaftlichen Verlusten. In der Humanmedizin ist *S. agalactiae* seit einigen Jahrzehnten als Erreger neonataler Meningitiden und Septikämien, gelegentlich auch als Ursache unterschiedlichster Erkrankungen Erwachsener, bekannt (JELINKOVA 1977, WILKINSON 1978, SELBITZ 1992, BRANDIS et al. 1994, LÄMMLER und HAHN 1994, SCHUCHAT 1998, HAHN et al. 1999). Direkte epidemiologische Beziehungen zwischen Rindermastitiden und den Erkrankungen des Menschen konnten bisher nur vereinzelt nachgewiesen werden (BRGLEZ 1981, JENSEN 1982).

S. agalactiae wird aufgrund eines gemeinsamen Gruppenpolysaccharid-antigens der serologischen Lancefield-Gruppe B zugeordnet. *S. agalactiae* lässt sich desweiteren aufgrund von Polysaccharid- und Proteinantigenen in Serotypen unterteilen (WILKINSON 1978, HENRICHSEN et al. 1984). Der Nachweis dieser spezifischen Typenantigene der B-Streptokokkenoberfläche kann zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge und zum Verständnis des Infektionsablaufs bei B-Streptokokkenerkrankungen beitragen (LÄMMLER und HAHN 1994).

Streptokokken der serologischen Gruppe B wurden in weiteren Untersuchungen auch aus Untersuchungsproben von Hund und Katze und auch von zahlreichen anderen Tierarten isoliert (KORNBLATT et al. 1983, DOW et al. 1987, ELLIOTT et al. 1990, WIBAWAN et al. 1993, LÄMMLER et al. 1998). Einige von Hund, Katze und Affe isolierte B-Streptokokken zeigten in ihren biochemischen und serologischen Eigenschaften Ähnlichkeiten mit B-Streptokokken, isoliert vom Menschen (LÄMMLER et al. 1998). Den

B-Streptokokken, isoliert von Hund und Katze und auch anderer Herkunft könnte somit eine Bedeutung für Infektionen des Menschen zukommen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert insbesondere von Hund und Katze, aber auch anderer Herkunft, zu identifizieren und mittels phäno- und genotypischer Methoden weitergehend zu charakterisieren. Dies sollte einen Überblick über Eigenschaften und über das Vorkommen von Virulenzfaktoren bei Streptokokken der serologischen Gruppe B unterschiedlicher Herkunft geben und letztlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen tier- und humanpathogenen B-Streptokokken aufzeigen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Taxonomische Einordnung

Die Taxonomie der Streptokokken unterlag in den letzten Jahren zahlreichen Änderungen. Nach LANCEFIELD (1933), zusammengefasst von BRIDGE und SNEATH (1983) und SNEATH et al. (1986) im 2. Band von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, wurden die Streptokokken in unterschiedliche serologische Gruppen eingeteilt. Diese Gruppeneinteilung erfolgte aufgrund gemeinsamer Kohlenhydratantigene der Bakterienoberfläche. SHERMAN und OBIGER (1938) berücksichtigten die kulturellen, biochemischen und serologischen Eigenschaften der Streptokokken und teilten sie in die folgenden vier Gruppen ein: die Pyogen-Streptokokken, die Viridans-Streptokokken, die Lactis-Streptokokken und die Enterokokken.

Nach SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) wurde die Gattung *Streptococcus* in die Gattungen *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* und *Lactococcus* unterteilt. ROTTA (1986) ordnete *S. agalactiae* zu den Pyogenstreptokokken innerhalb der Gattung *Streptococcus sensu stricto*. Im Gegensatz dazu zählten SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1987) *S. agalactiae* nicht zu den Pyogenstreptokokken, sondern stellten eine enge Verwandtschaft der B-Streptokokken mit Streptokokken der serologischen Gruppe M fest. Bei vergleichenden Analysen der 16S rRNA-Sequenzen verschiedener Streptokokkenarten wies *S. agalactiae* in hohem Maße Übereinstimmungen mit *S. pyogenes* und weiteren Pyogenstreptokokken auf (BENTLEY et al. 1991). HARDIE und WHILEY (1997) schlugen eine Zuordnung von *S. agalactiae* zu der erweiterten Gruppe der Pyogenstreptokokken, d.h. *S. canis*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. hyointestinalis*, *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. porcinus*, *S. pyogenes* und *S. uberis* vor. Nach DEVRIESE (1991) ist *S. agalactiae* die einzige Spezies innerhalb der serologischen Gruppe B.

Die Namen *S. agalactiae* und B-Streptokokken werden synonym gebraucht, wobei in der Veterinärmedizin häufiger die Bezeichnung *S. agalactiae* und in der Humanmedizin B-Streptokokken oder Streptokokken der serologischen Gruppe B verwendet werden.

2.2 Isolierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B bei Tier und Mensch

2.2.1 Bedeutung von B-Streptokokken als Mastitiserreger des Rindes

Streptococcus agalactiae, der Erreger des seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannten „Gelben Galts“, einer kontagiösen Rindermastitis, konnte 1887 erstmals von NOCARD und MOLLEREAU aus einer Mastitismilchprobe isoliert werden. Die Galt-Mastitis ist eine spezifische, kontagiöse Euterentzündung des Rindes. Mastitiden des Rindes stellen in allen Ländern mit hochentwickelter Milchwirtschaft ein ökonomisches und milchhygienisches Problem dar. Berechnungen von TOLLE et al. (1977) ergaben, dass der Milchverlust durch subklinische Mastitiden im Durchschnitt bei 17,1 % pro Viertel und 9,7 % pro Tier liegt. Als häufige Mastitiserreger gelten *Staphylococcus aureus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* und *S. agalactiae* (FOX und GAY 1993, BASEGGIO et al. 1997, TILSALA-TIMISJÄRVI 2000, PHUEKTES et al. 2001).

S. agalactiae war einer der Haupterreger für Mastitiden in präantibiotischer Zeit (KEEFE 1997). Mit der Einführung des maschinellen Milchentzugs und einer umfangreichen antibiotischen Mastitistherapie ging die Bedeutung von *S. agalactiae* als Mastitiserreger zurück (FUNK et al. 1982). Da der Erreger für längere Zeit nur im Milchdrüsengewebe überleben konnte und für eine Penicillin-Therapie zugänglich war, war eine Eliminierung des Erreger innerhalb einer geschlossenen Rinderherde möglich (McDONALD 1977). Herden konnten selbst unter Feldbedingungen frei von einer Infektion mit *S. agalactiae* bleiben (DVG 1994).

Faktoren, wie die individuelle Konstitution, die Morphologie von Zitze und Euter, sowie die Haltung, Fütterung und Melktechnik erwiesen sich als prädisponierend für eine Infektion mit *S. agalactiae* (TOLLE et al. 1977). Das Zustandekommen einer Euterinfektion hängt in erster Linie von Faktoren ab, die das Eindringen und Haften der Keime begünstigen. Die Galtanfälligkeit wird im Verlauf mehrerer Zyklen allmählich erkennbar, da in verseuchten Herden mit steigendem Alter, meist ab der 3. Laktation, die Mastitisdisposition zunimmt. Die Einflüsse der

Laktationsperiode werden widersprüchlich beurteilt. Einerseits soll der „Gelbe Galt“ während der gesamten Laktationsperiode, einschließlich des frischmelkenden Stadiums, gleichhäufig auftreten, andererseits wurde ein verstärktes Auftreten von Mastitiden in der Zeit zwischen der Geburt und dem Einsetzen des Östrus sowie während des Trockenstellens beobachtet (MÜLLER 1987, SELBITZ 1992).

S. agalactiae verursacht in der Regel eine chronisch-katarrhalische Galaktophoritis und Mastitis mit proliferativen Entzündungsprozessen (SELBITZ 1992). Nach HOFFMANN (1991) verläuft die Erkrankung typischerweise chronisch mit intermittierenden subakuten und akuten Stadien. Nach oben genanntem Autor greifen die B-Streptokokken das Eutergewebe zunächst nicht direkt an, sondern wirken über Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte, die insbesondere das Alveolargewebe schädigen. Im akuten Stadium füllen sich die Alveolen mit Epithelzellen und die kleineren Milchgänge mit Fibringerinnseln, wodurch es zur Drüseninvolution kommt. Nach protrahiertem Verlauf kommt es zu einer Fibrose des befallenen Gewebes mit Verlust der Milchleistung und schließlich zur Induration des Euters (HOFFMANN 1991).

Während die sofortige Therapie akuter Mastitiden während der Laktation allgemein befürwortet wird, werden subklinische Mastitiden aus medizinischen und wirtschaftlichen Gründen vorzugsweise zu Beginn der Laktationsruhe behandelt. Weil *S. agalactiae*-Infektionen nach YAMAGATA et al. (1987) die Milchleistung um durchschnittlich 18 % senkten, erzielten diese Autoren bei Kühen durch eine sofortige Behandlung eine Genesung und dadurch einen wirtschaftlichen Gewinn. Von McDONALD (1977) wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts die sogenannte „Blitz“-Therapie zur Eradikation der Galtstreptokokken durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Behandlung der gesamten betroffenen Herde mit einem entsprechenden Antibiotikum. Bei einem Anteil von > 30 % galtinfizierter Viertel in einem Bestand empfahlen WOLTER et al. (1999) und SOBIRAJ et al. (2000) ebenso die „totale Blitz“-Therapie, wobei alle Kühe des Bestandes umgehend zu behandeln sind. Für die Galtbekämpfung sollte eine dreimalige intramammäre Applikation von 3 Mio I.E. Penicillin G im Abstand von 24 Stunden durchgeführt werden, da sind stets alle Viertel eines infizierten Tieres zu behandeln. Alternativ wird auch eine Kombination aus dieser intramammären Therapie und einer dreimaligen parenteralen Behandlung

mit Penethamathydrojodid-Penicillin i. m. im Abstand von 24 Stunden vorgeschlagen. Als Therapie beim Trockenstellen wurde von KEEFE (1997) aufgrund der guten Heilungsaussichten eine lokalantibiotische Therapie empfohlen.

HEJLICEK (1994) berichtete ebenfalls über die in den letzten Jahren vermehrt angewendete „Blitz“-Therapie durch intramammäre Verabreichung von 300 mg Erythromycin bei allen Kühen in 2 aufeinanderfolgenden Melkzeiten. Am Ende der Laktation schloß sich abermals eine Erythromycin-Therapie ebenfalls bei allen Kühen des Bestandes an.

Eutergesunde Bestände können nach ROTTSCHEIDT und WINKELMANN (1991) nur galtfrei bleiben, wenn eine Einschleppung von galtinfizierten Tieren über einen unkontrollierten Zukauf unterbleibt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass B-Streptokokken oft nur unregelmäßig mit der Milch ausgeschieden werden und deshalb nicht immer nachweisbar sind. Nur die ständige Kontrolle von Beständen und Einzeltieren mit Hilfe zytologischer und bakteriologischer Methoden kann eine sichere Prophylaxe bieten (LÄMMLER und HAHN 1994).

2.2.2 Nachweis bei Hund und Katze

KORNBLATT et al. (1983) berichteten über bislang noch nicht häufig beobachtete B-Streptokokken-Infektionen bei Hunden und Katzen, wobei die Erreger aus Lungen- und Herzblut kurz nach der Geburt verstorbener Welpen isoliert werden konnten.

DOW et al. (1987) untersuchten Gruppe B-Streptokokken, isoliert von einer 12-Jahre alten, kastrierten Katze, welche unter Erbrechen, Kreislaufinsuffizienz, Lethargie und verringerter Urinausscheidung litt, sowie von einer weiteren 2,5 Jahre alten Katze, die an Blutungen infolge einer Schweregeburt litt. Diese hatte zwei Tage zuvor zwei Welpen ohne Probleme und drei weitere Welpen erst nach einer Oxytocingabe zur Welt gebracht.

In den Untersuchungen von LÄMMLER et al. (1998) wurde *S. agalactiae* von drei erkrankten Hunden und einer Katze isoliert und weitergehend charakterisiert. Die Erreger konnten vom Kot eines acht Tage alten, hochgradig an Diarrhoe erkrankten

Hundewelpen, aus dem Auge eines fünf Jahre alten, an Konjunktivitis erkrankten Hundes, aus einem Vaginaltupfer einer zwei Jahre alten Hündin mit einer eitrigen Vaginitis, sowie von einer Katze mit einer Pododermatitis isoliert werden.

B-Streptokokken, isoliert bei Erkrankungen des Hundes, wurden ebenso auch von BUTTER und de MOOR (1967) nachgewiesen.

Im weiteren wurde die Isolierung von *S. agalactiae* von einem squamösen Ekzem eines Hundes beschrieben (BRÜCKLER et al. 1990).

2.2.3 Nachweis bei anderen Tierarten

S. agalactiae konnte nach FORNINI (1958) und SHIMZU (1958) nicht nur in der Milchdrüse des Rindes und von Hunden und Katzen, sondern auch in Tonsillen von Kälbern, Schweinen und Pferden nachgewiesen werden. Diese Befunde lassen einen oralen Infektionsweg von *S. agalactiae* vermuten (LÄMMLER und HAHN 1994).

Streptokokken der serologischen Gruppe B konnten von GROSSENBACHER (1951) bei Pferden, Kaninchen und Meerschweinchen nachgewiesen werden.

Nach Untersuchungen von HEJLICEK (1994) wurde an Schlachtschweinen in der Tschechoslowakei *S. agalactiae* in Tonsillen, Gehirn und Mesenteriallymphknoten gefunden. Weiterhin berichtete der Autor vom Nachweis des Erregers bei Sumpfbibern, Hirschen, Damhirschen, Wildschweinen und Füchsen.

B-Streptokokken konnten desweiteren aus Untersuchungsproben von Nutria und Schwein isoliert werden. Nach SMOLA (1993) schienen diese Tiere neben der bovinen Milchdrüse weitere natürliche Reservoirs des Erregers darzustellen. Die B-Streptokokkenisolate von Nutria und Schwein wiesen herkunftsspezifische Eigenschaften auf (SMOLA 1993 und WIBAWAN et al. 1993).

B-Streptokokken waren desweiteren, laut SEELEMANN (1963), vereinzelt bei Zervizitiden und Endometritiden des Pferdes nachweisbar. Auch bei Ferkeln, Eidechsen, Tauben (BUTTER und de MOOR 1967, KORNBLATT et al. 1983) und Fischen (ROBINSON und MEYER 1966, WILKINSON et al. 1973) gelang der Nachweis von B-Streptokokken.

Streptokokken der serologischen Gruppe B wurden weiterhin aus Untersuchungsproben von Maus, Frosch, (AMBORSKI et al. 1983, ELLIOTT et al. 1990), Affe (LÄMMLER et al. 1998), Hamster (KUMMENEJE et al. 1985) und Kamel (EDELSTEIN und PEGRAM 1974, ABDURAHMAN et al., 1995, FINK et al. 2000a) isoliert.

Nach den Untersuchungen von YOUNAN et al. (2001) kamen *S. agalactiae* (12 %) und *Staphylococcus aureus* (11 %) ebenfalls bei Euterinfektionen von Kamelen vor.

Streptokokken der serologischen Gruppe B waren ferner in einzelnen Fällen auch als Mastitiserreger bei Schweinen (HOMMEZ et al. 1991) und Schafen (MURA 1957), bei Erkrankungen des Meerschweinchens (GUPTA und STARK 1973) sowie bei multiplen Abszessen eines Elefanten (GEORGE 1954) feststellbar.

2.2.4 Erkrankungen des Menschen

2.2.4.1 Erkrankungen von Neugeborenen

Streptokokken der serologischen Gruppe B sind seit einigen Jahrzehnten als Erreger perinataler Infektionen bei Neugeborenen und als Verursacher von Puerperalinfektionen bei Frauen bekannt (JELINKOVA 1977, WILKINSON 1978, BAKER 1980, STROM 1983, SCHUCHAT 1999, SPELLERBERG 2000). Nach Untersuchungen von VESIKARI et al. (1989) wurde *S. agalactiae* in 29 %, *S. aureus* in 15 %, *E. coli* in 14 % und *S. epidermidis* in 10 % der Untersuchungen von Blutproben erkrankter Neugeborener nachgewiesen. Den Angaben von BHUTTA und YUSUF (1997) zufolge konnte *S. aureus* in 18 %, *S. agalactiae* in 13 % und *Klebsiella pneumoniae* in 13 % von Fällen bakterieller Sepsis von Neugeborenen festgestellt werden. Nach den Untersuchungen von STROM (1983) sowie HAHN et al. (1999) waren B-Streptokokken in den USA und in Europa die bedeutsamsten Erreger neonataler Septikämien und Meningitiden. Nach ADDERSON et al. (2000) waren ebenso Streptokokken der serologischen Gruppe B die häufigste Ursache für neonatale

Septikämien und Meningitiden. Im weiteren verursachten, nach GOODRUM und POULSON-DUNLAP (2002), Streptokokken der serologischen Gruppe B neonatale Pneumonien. Diese Autoren stellten bei "Early-onset"-Pneumonien eine charakteristische Schädigung des Lungenepithels und Endothels fest.

Bei den systemischen Infektionen der Neugeborenen und Säuglinge, welche mit einer Inzidenz von ca. 1 auf 1000 Lebendgeborene auftreten, kann man eine früh einsetzende Form (innerhalb der ersten 5-8 Lebenstage), den sogenannten „Early-onset-Typ“, von einem ab der 2. Lebenswoche auftretenden „Late-onset-Typ“ unterscheiden. Während der "Late-onset"-Typ sich meist als Meningitis mit guter Prognose "quoad vitam" präsentiert, hat die häufiger auftretende "Early-onset"-Sepsis (eine Meningitis ist hierbei selten) besonders, wenn sie während der ersten Lebensstunden auftritt, eine schlechtere Prognose mit einer Letalität bis zu 30 % (BRANDIS et al. 1994).

Bei der frühen Form infizieren sich die Neugeborenen über die mütterlichen Geburtswege, bei der späten Form kommen die Muttermilch, die Hygienebedingungen (z.B. durch das Pflegepersonal im Krankenhaus) sowie andere Säuglinge als mögliche Infektionsquellen in Betracht (LÜTTICKEN et al. 1983, MATORRAS et al. 1989, RENCH und BAKER 1989, BRANDIS et al. 1994). Zwischen 20 % und 25 % der Schwangeren sind zur Zeit der Geburt persistent oder vorübergehend Trägerinnen von B-Streptokokken. Nach Untersuchungen von EASMON (1986) sowie PERSSON et al. (1987) bildeten Rektum, Urethra und Vagina den Hauptisolierungsort der Erreger. Nach Untersuchungen von CAMPELL et al. (2000) sowie VOTAVA et al. (2001) wurden bei schwangeren Frauen Streptokokken der serologischen Gruppe B von Rektum und Vagina isoliert. Während der Geburt übertragen, nach LÜTTICKEN et al. (1983) sowie MATORRAS et al. (1989), 40-70 % der infizierten Mütter die Bakterien auf das Neugeborene, 1-2 % dieser infizierten Neugeborenen wiederum entwickeln eine Septikämie oder Meningitis. Die Besiedlung des mütterlichen Genitales konnte nach BRANDIS et al. (1994) allein noch nicht als Risiko für das Neugeborene angesehen werden. Hinzukommen müssen weitere von der Mutter ausgehende Faktoren, oder auch geburtshilfliche Komplikationen, wie z.B. ein vorzeitiger Blasensprung. Ferner haben kindliche Risikofaktoren Bedeutung, wie z.B. ein zu geringes Geburtsgewicht. Ein erhöhtes Risiko für B-Streptokokken-Erkrankungen

bestand nach WESSELS und KASPER (1993), BRANDIS et al. (1994) sowie HAHN et al. (1999) auch bei Fieber während der Geburt, bei Zervixinsuffizienz und bei Frühgeburten.

Einer der wesentlichen Risikofaktoren für eine B-Streptokokkensepsis bei Neugeborenen schien nach BRANDIS et al. (1994) das Fehlen von Antikörpern gegen die kapselartig angeordneten Typenpolysaccharide der B-Streptokokken zu sein, welche vermutlich die wichtigsten Virulenzfaktoren bei *S. agalactiae* darstellen. Nach Untersuchungen von LIN et al. (1998) kamen die Serotypen Ia zu 40 %, Ib zu 9 %, II zu 6 %, III zu 27 %, V zu 15 %, und nichttypisierbare B-Streptokokken zu 3 % bei Isolaten von Neugeborenenenerkrankungen vor, wobei die Serotypen Ia, III und V die wichtigste Rolle spielten.

BAKER und KASPER (1976a) berichteten ebenso über eine Beziehung zwischen der Empfindlichkeit der Neugeborenen und mangelnden maternalen Antikörpern gegen B-Streptokokken. Daraus erhob sich die Frage, ob zur Prophylaxe solcher neonataler Infektionen, Mütter, die keine Antikörper gegen B-Streptokokken entwickelt hatten, mit einem Impfstoff aus B-Streptokokken-Antigenen immunisiert werden sollten (BAKER et al. 1978, BAKER 1990). Als typische Eitererreger werden B-Streptokokken durch Phagozytose beseitigt. Kapselspezifische Antikörper kommen bei vielen Menschen vor und haben für die Abwehr offenbar eine besondere Bedeutung. Nach den Angaben von BRANDIS et al. (1994) und HAHN et al. (1999) waren die Kinder von Müttern mit niedrigem Antikörpertiter, die vor der Geburt von ihrer Mutter keine oder nur wenige typenspezifische Antikörper übertragen bekamen, besonders gefährdet an einer B-Streptokokken-Infektion zu erkranken.

Eine Penicillin-Routineanwendung bei jedem Neugeborenen sofort nach der Geburt wird jedoch bislang nicht empfohlen (STROM 1983). Ähnliche Fragestellungen ergaben sich aus der Behandlung der Neugeborenen infizierter Mütter. Das Auftreten einer neonatalen Sepsis, hervorgerufen durch B-Streptokokken, konnte nach den Untersuchungen des "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) (1996) und SCHRAG et al. (2000) in den letzten Jahren bei infizierten Müttern durch intrapartale antibiotische Prophylaxe reduziert werden.

2.2.4.2 Erkrankungen von Erwachsenen

Bei Erwachsenen schienen B-Streptokokken bislang nur asymptomatisch die Schleimhäute des Gastrointestinal-, Genital-, und Respirationstrakts sowie die äußere Haut zu besiedeln (EASMON 1986). Nach Untersuchungen von SCHWARTZ et al. (1991), FARLEY et al. (1993), BRANDIS et al. (1994), BECKER, (1994), LINDBERG (1998) und HAHN et al (1999) waren B-Streptokokken allerdings auch bei Puerperalinfektionen, Endometritiden, Sepsis, Pyelonephritiden, Arthritiden, Bakteriämien, Haut- und Bindegewebsinfektionen, Peritonitiden, Konjunktividen, Impetigo, Pneumonien, Meningitiden und Endokarditiden nachweisbar. Nach BRANDIS et al. (1994) sowie FARLEY (2001) kamen B-Streptokokken vor allem bei immunologisch geschwächten Erwachsenen insbesondere bei Diabetikern und Patienten mit neurologischen Ausfallserscheinungen und Zirrhosen vor. Bei den beschriebenen Erkrankungen waren nach FARLEY (2001) besonders B-Streptokokken der Serotypen Ia, III und V nachweisbar. Eine sexuelle Übertragung des Erregers wurde beschrieben und erwies sich nach YAMAMOTO (1999), im Gegensatz zu den Untersuchungen von REAGAN et al. (1991), als epidemiologisch bedeutend. Seltener berichteten Autoren über Fälle von Osteomyelitis, Pyomyositis, Keratitis und Endophthalmitis, Otitis media, Meningitis und Mastitis (RENCH und BAKER 1989, BACK et al. 1990, SARMIENTO et al. 1993). Bei Pharyngitiden und Tonsillitiden spielten Streptokokken der serologischen Gruppe B nach Untersuchungen von RADOSZ-KOMONIEWSKA (1998) eine wichtigere Rolle als Streptokokken anderer serologischer Gruppen oder als *S. aureus* und *Haemophilus* spp.

COOPER und MORGANELLI (1998) untersuchten mehr als fünf Jahre durch B-Streptokokken hervorgerufene Bakteriämien bei Erwachsenen. Dabei wurde eine Letalität bis zu 15 % beobachtet. Charakteristisch für B-Streptokokken-Erkrankungen waren nach COOPER und MORGANELLI (1998) Zirrhosen, Respirationsprobleme und Hypokalzämien.

BAUER et al. (1997) berichteten, dass B-Streptokokken eine vertebrale Osteomyelitis und eine Harnröhrenerkrankung bei einem 54-jährigen Mann verursachten. GARCIA et al. (1996) isolierten *S. agalactiae* bei einer an einer septischen Arthritis erkrankten 63-jährigen Frau.

Nach Untersuchungen von FARLEY et al. (1993) betrug die jährliche Inzidenz für B-Streptokokken-Erkrankungen bei Erwachsenen 4,4 Fälle pro 100000 Einwohner. Prädisponierende Faktoren für B-Streptokokkeninfektionen der Erwachsenen waren Diabetes mellitus, Krebs, HIV, Alkoholismus und Leberschäden (SCHWARTZ et al. 1991, WESSELS und KASPER 1993, FARLEY et al. 1993).

Die ermittelten Risikogruppen bei Erwachsenen sollten nach den Aussagen von SCHWARTZ et al. (1991) und FARLEY et al. (1993) bei einer möglichen Immunisierung in Zukunft berücksichtigt werden.

Nach Untersuchungen von LEIB und TAUBER (1999) sowie BARTFIELD (2000) erwiesen sich *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, und *Haemophilus influenzae* als die wichtigsten Erreger bakterieller Meningitiden von Erwachsenen.

2.3 Serologische Eigenschaften von Streptokokken der serologischen Gruppe B

2.3.1 Gruppenpolysaccharidantigen

Zur serologischen Gruppenbestimmung werden Polysaccharidantigene, das sogenannte C-Polysaccharid der Streptokokkenoberfläche, abgelöst und durch spezifische Antiseren serologisch differenziert. Das C-Polysaccharidantigen ist das biochemische Substrat für die serologische Gruppenbestimmung nach LANCEFIELD (1933). Die C-Substanz erwies sich nach HAHN et al. (1972) als in der Zellwand lokalisiert und eng mit dem Mucopetid verflochten. Nach PRITCHARD et al. (1984) bestand das Gruppenpolysaccharid der B-Streptokokken aus Rhamnose (45 %), Galactose (17 %), N-Acetylglucosamin (25 %) und Glucitolphosphat. Nach den Analysen von MICHON et al. (1988) enthielt es L-Rhamnose, Galactose, Glucit und Phosphat im Verhältnis von 6:1:1:0,5:1. Innerhalb des B-Gruppenpolysaccharidantigens war Rhamnose die serologisch determinierende Substanz. Diese Struktur erklärte die häufig beobachteten Kreuzreaktionen mit Streptokokken der serologischen

Gruppe G sowie mit *S. pneumoniae* vom Serotyp 23, die ebenfalls Rhamnose als determinierende Gruppe, jedoch eine andere Zusammensetzung des Basispolysaccharids, aufwiesen (CURTIS und KRAUSE 1964, HEIDELBERGER et al. 1967). Nach PRITCHARD et al. (1984) waren dagegen keine Kreuzreaktionen zwischen B-Antiseren und G-Streptokokken zu beobachten. Die Spezifität der Reaktion zwischen B-Antiseren und B-Gruppenantigen konnte nach PRITCHARD et al. (1984) auch nicht durch Rhamnose gehemmt werden.

Die Antigenpräparation zur Durchführung der serologischen Gruppenbestimmung ist auf unterschiedliche Weisen möglich. Eine Übersicht über die verschiedenen Extraktions- und Nachweisverfahren wurde von FACKLAM (1976) zusammengestellt. Dies beinhaltete die Hitzeextraktion bei saurem pH nach der Methode von LANCEFIELD (1933), die Ablösung der Gruppenpolysaccharide durch Autoklavieren nach der Methode von RANTZ und RANDALL (1955), die Formamidextraktion bei 160 °C im Ölbad nach FULLER (1938) und die Anwendung von salpetriger Säure und Eisessig nach EL KOHYL et al. (1978). Als weitere Extraktionsverfahren eigneten sich die Verwendung von murolytischen Enzymen (LÄMMLER et al. 1986, LÄMMLER und WIBAWAN 1990), die Verwendung von Lysozym und einem *Streptomyces albus*-Filtrat (WATSON et al. 1975), die Extraktion durch Pronase B (EDERER et al. 1972) und die Phenol-Wasser-Extraktion (MEHL et al. 1988).

Das extrahierte B-Gruppenantigen ließ sich mit gruppenspezifischem B-Antiserum in der Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (1949), durch Staphylokokken-Koagglutination (EDWARDS und LARSON 1974, KIRKEGAARD und FIELD 1977, EASMON et al. 1980) oder durch Latex-Agglutinationsreaktionen (LÖGERING 1981, POUTREL 1983, LOTZ-NOLAN et al. 1989) nachweisen. WAGNER et al. (1980) stellten das B-Gruppenantigen mit Hilfe von ferritinmarkierten Antikörpern elektronenmikroskopisch dar.

Mit Hilfe der Staphylokokken-Koagglutination und auch der Mikrokapillarpräzipitation ließ sich, in Verbindung mit den genannten Extraktionsverfahren, eine serologische Gruppenbestimmung der B-Streptokokken innerhalb weniger Stunden durchführen (LÄMMLER und HAHN 1994).

2.3.2 Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B

Streptokokken der serologischen Gruppe B lassen sich aufgrund von Polysaccharid- und Proteinantigenen in Serotypen unterteilen. Bisher konnten die Polysaccharidantigene Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII und VIII sowie die Proteinantigene R, Rib, X, und c nachgewiesen werden (LANCEFIELD 1938, PATTISON et al. 1955, WILKINSON und EAGON 1971, WILKINSON 1977, PERCH et al. 1979, HENRICHSEN et al. 1984, JELINKOVA und MOTLOVA 1985, MURAI et al. 1990, WIBAWAN und LÄMMLER 1990a, STALHAMMAR-CARLEMALM et al. 1993, von HUNOLSTEIN et al. 1993, WAGNER et al. 1994). Als weiteres Proteinantigen konnte das Antigen Ra, ein als „R-associated antigen“ (Ra) bezeichnetes Protein, vorgestellt werden (KVAM et al. 1993). Die neun Polysaccharidantigene wurden von HARRISON et al. (1999) und HICKMAN et al. (1999) zusammenfassend dargestellt.

Die die Polysaccharidantigene Ia, Ib, III, IV, V, VI, VII kodierenden Gene wurden von KONG et al. (2002), die die Proteinantigene c β bzw. Rib kodierenden Gene *bag* und *rib* von WÄSTFELT et al. (1996) und MAELAND et al. (1997) beschrieben.

Die die Polysaccharidantigene kodierenden Gene wurden nach BOULNOIS und JANN (1989) als *cps* bezeichnet (z.B. *cpsA*, *cpsB*), welches mehrere Regionen besitzt, die wiederum mit Großbuchstaben klassifiziert werden. Nach den Untersuchungen von YAMAMOTO et al. (1999a), CHAFFIN et al. (2000) sowie KONG et al. (2002) zeigten die Polysaccharidantigene Ia, Ib, III, IV, V, VI und VII, nicht aber das Polysaccharidantigen VIII (CIESLEWICZ et al. 2001), eine Ähnlichkeit am 3'-Ende der *cpsD*-, *cpsE*- und *cpsF*-Region und am 5'-Ende der *cpsG*-Region des *cps*-Gens.

Die Typenantigene waren in den äußersten Schichten der Zellwände nachweisbar. Die Polysaccharidantigene konnten nach HENRICHSEN et al. (1984) allein oder in Kombination mit Proteinantigenen vorkommen. Kulturen ohne Polysaccharidantigene wurden als nicht typisierbar (NT) bezeichnet.

Eine Ablösung der Polysaccharid- und Proteinantigene erfolgte durch Hitzeextraktion bei saurem pH und der Nachweis durch Kapillarpräzipitation, Koagglutination oder durch Immundiffusion (LANCEFIELD und FREIMER 1966, JELINKOVA und HEESCHEN 1969, KIRKEGAARD und FIELD 1977). Die

Polysaccharidantigene ließen sich je nach Extraktionsverfahren entweder als neuraminsäurehaltiges Antigen (native) oder als neuraminsäurefreies Antigen (core) gewinnen (LANCEFIELD und FREIMER 1966, BAKER et al. 1976).

2.3.2.1 Typenantigene Ia und Ib

Die Polysaccharidantigene Ia und Ib bestehen nach den Untersuchungen von WILKINSON (1975) sowie WESSELS et al. (1991) hauptsächlich aus Galactose und N-Acetylglucosamin und unterscheiden sich aufgrund einer einzelnen glycosidischen Bindung. Diese glycosidischen Bindungen waren β (1 $\rightarrow$ 4) bei dem Serotypen Ia und β (1 $\rightarrow$ 3) bei dem Serotypen Ib. Die beiden Polysaccharide sind Isomere, die sich in ihrer Antigenität unterscheiden (JENNINGS et al. 1983). Nach Untersuchungen von WILKINSON (1975) enthielt das Polysaccharidantigen Ia die Zucker Galactose und N-Acetylglucosamin im molaren Verhältnis von 3:1, das Polysaccharidantigen Ib die gleichen Zucker im Verhältnis 2:1.

Das Polysaccharidantigen Ib besteht nach Untersuchungen von TAI et al. (1979) aus Galactose, Glucose, N-Acetylglucosamin und Neuraminsäure im Verhältnis von 2:1:1:1. WESSELS et al. (1991) konnten eine ähnliche Zusammensetzung für das Polysaccharidantigen Ia nachweisen.

Neuraminsäure stellte nach BAKER et al. (1976) und JENNINGS et al. (1983) einen weiteren Anteil dieser Polysaccharidantigene dar. Die Neuraminsäure war insbesondere für das Polysaccharid Ia die determinierende Komponente (SCHIFFERLE et al. 1985). Nach Untersuchungen von TEIXEIRA et al. (1990) wies der Serotyp Ia den höchsten Neuraminsäuregehalt innerhalb der beschriebenen Serotypen auf. B-Streptokokken mit Serotypen mit höherem Neuraminsäuregehalt waren nach NAGANO et al. (1989) vermehrt resistent gegenüber Tetracyclin.

YAMAMOTO et al. (1999a) haben das für das Polysaccharidantigen Ia spezifische Gen (*cps*) kloniert und sequenziert, Gendatenbank-Zugangsnummer: AB028896. Das *cps*-Gen des Serotyps Ia zeigte Ähnlichkeiten mit den Genen des Serotyps III und des Serotyps 14 von *S. pneumoniae*. Die *cps* Gensequenzen des

Serotyps Ib wurden von MIYAKE et al. (2001), Gendatenbank-Zugangsnummer: AB050723, beschrieben.

Nach Untersuchungen von PRITCHARD et al. (1988) konnten Kreuzreaktionen monoklonaler Ib-Antikörper mit Oligosacchariden der Frauenmilch sowie mit fetalen Antigenen nachgewiesen werden. Durch diese antigenen Ähnlichkeiten werden B-Streptokokken des Serotyps Ib möglicherweise von der Immunabwehr nicht erkannt.

B-Streptokokken mit den Polysaccharidantigenen Ia und Ib waren nach Untersuchungen von BAKER (1990) zu 40-50 % für "Early-onset"-Erkrankungen von Neugeborenen verantwortlich.

Das Fehlen der Ia-Polysaccharidkapsel, hervorgerufen durch Transposonmutagenese, bewirkte einen deutlichen Virulenzverlust im Mäuseversuch, verstärkte jedoch die Adhärenz an Epithelzellen vom Menschen (BULGAKOVA et al. 1992). Im Mäuseversuch zeigten monoklonale Antikörper gegen das „native“ Polysaccharidantigen Ib eine deutliche Schutzwirkung, während monoklonale Antikörper gegen das „core“ Polysaccharidantigen Ib keine Schutzwirkung aufwiesen (PRITCHARD et al 1988).

ELLIOT et al. (1990) berichteten, dass Gruppe B-Streptokokken des Serotyps Ib, isoliert von Mensch, Rind, Maus, Fisch und Frosch, trotz ähnlichem Proteinmuster phänotypische Unterschiede zeigten.

2.3.2.2 Typenantigen II

Das Polysaccharidtypenantigen II hat nach JENNINGS et al. (1983a) sowie GRAY et al. (1988) im Vergleich zu den übrigen Polysaccharidantigenen zwei Seitenketten; zum einen eine β -verknüpfte Galactose zum anderen α -verknüpfte Neuraminsäurereste. Daraus resultierten zwei verschiedene Antikörperklassen, wobei die eine nur mit dem „nativen“, neuraminsäurehaltigen Antigen und die andere mit dem „nativen“ und dem „core“ Antigen reagierten. Die durch Hitzeextraktion bei saurem pH gewonnene Polysaccharidantigen II-Präparation wurde später als unvollständiges oder „core“ Antigen bekannt. HCl zerstörte eine labile Determinante

der Antigenstruktur. Diese Determinante wurde als Neuraminsäure oder Sialinsäure beschrieben (KASPER et al. 1983). Antikörper, die mit beiden Antigenen reagierten, waren durch β -Methylgalactopyranosid hemmbar. Antikörper gegen das „native“ Antigen allein dagegen nicht (GRAY et al. 1988).

Das „native“ Polysaccharidantigen II bestand nach den Untersuchungen von JENNINGS et al. (1983a) aus Galactose, Glucose, 2-Acetamido-2-Deoxyglucose und Neuraminsäure im molaren Verhältnis von 3:2:1:1. Das „core“ Polysaccharidantigen II enthielt Galactose, Glucose und 2-Acetamido-2-Deoxyglucose im molaren Verhältnis von 3:2:1. Die Entfernung der Neuraminsäure vom „nativen“ Typenantigen II gelang durch Hitzeextraktion bei saurem pH, nicht aber durch Neuraminidasebehandlung des Antigens. Dagegen konnte die Neuraminsäure der Typenantigene Ia, Ib und III durch Neuraminidasebehandlung der entsprechenden Typenantigene entfernt werden. Diese Eigenschaft beruhte auf der Struktur bzw. auf der Verknüpfung der Neuraminsäure des „nativen“ Typenantigens II (JENNINGS et al. 1983a). Ähnliches wurde von GRAY et al. (1985) festgestellt. Die Typenantigene Ia, Ib und III reagierten aufgrund ihres Neuraminsäuregehaltes mit dem Lektin des Weizenkeimlings (GRAY et al. 1985). Nach Behandlung der „nativen“ Typenantigene Ia, Ib und III mit Neuraminidase waren in der Immundiffusion mit dem Lektin des Weizenkeimlings keine Reaktionen mehr nachweisbar. Eine vergleichbare Behandlung des „nativen“ Typenantigens II hatte dagegen keinen Einfluss.

Nach Untersuchungen von DMITRIEV et al. (1997) sowie SUVOROV et al. (1997) wurde durch konventionelle Elektrophorese bestätigt, dass die Serotypen I und II ähnlich waren, sich jedoch vom Serotyp III unterschieden. Nach UHLENBRUCK et al. (1985) enthielt das Polysaccharidantigen II endständige, unreduzierte β -(1-6)-D-Galactosyl-Gruppen. Da β -(1-6)-D-Galactosyl-Reste auch die vorherrschenden Endgruppen bei zahlreichen Galactanen aus pflanzlichen und tierischen Geweben sind, könnten Antiseren gegen B-Streptokokken vom Typ II auch als Anti-Galactane eingesetzt werden.

Streptokokken der serologischen Gruppe B mit dem Polysaccharidantigen II haben nach WILKINSON (1978) und GRAY et al. (1985) insbesondere eine Bedeutung als Erreger perinataler Infektionen des Menschen. Die Reaktion des Polysaccharidantigens II mit dem entsprechenden homologen, spezifischen Antikörper

konnte durch Milch, Saliva und Vaginalsekrete gehemmt werden. Die genannten Flüssigkeiten enthalten wahrscheinlich dem Typ II-Polysaccharid-ähnliche Strukturen. Saliva und Vaginalsekrete bestehen nach GRAY et al. (1988) aus zahlreichen mucinbindenden Oligosaccharidgalactosylkomplexen, die dem Polysaccharidtypen-antigen II sehr ähnlich sind.

Im Mäuseversuch zeigten spezifische Antiseren gegen „natives“ Antigen sowie gegen das „core“ Antigen des Polysaccharidantigens II eine Schutzwirkung (LANCEFELD et al. 1975).

2.3.2.3 Typenantigen III

Das Polysaccharidantigen III wurde zusammen mit den Polysaccharidantigenen Ia, Ib und II erstmals von LANCEFELD (1934) beschrieben. Das Polysaccharidantigen III bestand nach WESSELS et al. (1987) hauptsächlich aus Galactose, Glucose, Glucosamin, N-Acetylglucosamin und Neuraminsäure. Das Typenantigen III hat Glucuronsäure als determinierende Komponente. Dies konnte in Hemmversuchen ermittelt werden. Die Zugabe von Glucuronsäure führte zu einer Hemmung der spezifischen Reaktion des monospezifischen Typ III-Antiserums mit Typenantigen III. Das gereinigte Polysaccharidantigen III hatte ein Molekulargewicht von 15.000 Da.

Bei dem Typenantigen III konnten ebenso, wie bei den Typenantigenen Ia, Ib und II bereits beschrieben, zwei Formen des Antigens, d.h. das „native“ und das „core“ Antigen nachgewiesen werden. BAKER et al. (1976) stellten bei der Analyse des „nativen“ Antigens 24 % Neuraminsäure, 25 % Galactose, 21 % Heptose, 13 % Glucose, 10 % N-Acetylglucosamin und 7 % Mannose sowie Spuren einiger Aminosäuren fest. Das „core“ Antigen des Typenantigens III von B-Streptokokken zeigte Ähnlichkeiten mit dem Kapselpolysaccharid des Typs 14 von *S. pneumoniae*. Vergleichbare Kreuzreaktionen waren mit Typenantigen III Präparationen feststellbar, die durch Hitzeextraktion bei saurem pH gewonnen wurden (WESSELS et al. 1987). Das Pn 14-Antiserum zeigte nach ZOU et al. (1998) eine opsonierende Wirkung gegenüber B-Streptokokken vom Serotyp III.

Monoklonale Antikörper gegen das „native“ neuraminsäurehaltige Typenantigen III, unabhängig ob IgA, IgG oder IgM, zeigten im Mäuseversuch eine deutliche Schutzwirkung. Antikörper gegen das „core“ Antigen wiesen jedoch keinen vergleichbaren Schutz auf (EGAN et al. 1983). Weitere Unterschiede zwischen dem „nativen“ Antigen und dem „core“ Antigen konnten in der Immunelektrophorese nachgewiesen werden. Das „native“ Antigen wies nach DORAN et al. (1981) sowie WESSELS et al. (1987) eine anodale Wanderung auf, das „core“ Antigen dagegen zeigte eine katodale Wanderung.

Auf die Bedeutung der Neuraminsäure der B-Streptokokken-Mikrokapsel als Virulenzfaktor hatten bereits verschiedene Autoren hingewiesen (EDWARDS et al. 1980, DURHAM et al. 1981, KLEGERMAN et al. 1984). Mit Hilfe einer B-Streptokokkenkultur des Typs III und einer neuraminsäurefreien Mutante konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Die neuraminsäurefreien Mutanten wurden im Vergleich zu den jeweiligen neuraminsäurehaltigen Ausgangsstämmen vermehrt phagozytiert (WESSELS et al. 1987, 1992). Die Neuraminsäure der Polysaccharidkapsel des Ausgangsstamms verhinderte die Aktivierung des alternativen Komplementwegs und konnte so die Phagozytose hemmen (EDWARDS et al. 1982). In weiteren Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1991a) und WIBAWAN et al. (1992) zeigte die neuraminsäurefreie Mutante eine vermehrte Oberflächenhydrophobizität und eine vermehrte Adhärenz an Epithelzellen.

Neuraminsäure konnte ebenfalls als ein Bestandteil der Bakterienoberflächen von *E. coli* mit K1-Antigen (BARY 1958) und *Neisseria meningitidis* (LIU et al. 1971) nachgewiesen werden. Diese Bakterienarten, ebenso wie Streptokokken der serologischen Gruppe B, konnten häufig bei Infektionen von Neugeborenen mit Meningitis-Symptomen isoliert werden (JENNIGS et al. 1980). Eine direkte Beziehung zwischen der Pathogenität und dem Gehalt des ablösbaren Polysaccharidantigens III von B-Streptokokken konnte von DURHAM et al. (1981) festgestellt werden.

B-Streptokokkenkulturen des Serotyps III konnten im weiteren aufgrund ihres Lipoteichonsäuregehalts, ihres Wachstumsverhaltens in phosphathaltigem Medium sowie ihres Wachstums bei 40 °C in virulente und avirulente Stämme unterteilt werden (NEALON und MATTINGLY 1983, 1984, MATTINGLY 1990). Aufgrund der

herausragenden Bedeutung von B-Streptokokken mit dem Serotyp III bei neonatalen Infektionen gewannen genetische Methoden zur Identifizierung virulenter und avirulenter Klone innerhalb dieses Serotyps an Bedeutung (NAGANO et al. 1991, LIN et al. 1998).

RUBENS et al. (1993) gelang es, das Gen für die Typenantigen III-Kapselbildung zu isolieren, Gendatenbank-Zugangsnummer: AF163833. Dieses Gen *cpsD* erwies sich als Teil einer 30 Kb großen DNA-Region. Es kodierte eine 33.000 Da große Galactosyl-Transferase, die zur Ausbildung des Polysaccharidantigens III essentiell benötigt wird.

CHAFFIN et al. (2000) haben zusätzlich sieben den Serotyp III kodierende Gene *cps_{III}FGHIJKL* und zwei neue den Serotyp III kodierende Gene *cps_{III}B* und *cps_{III}C*, kloniert und sequenziert.

Der Serotyp III von Streptokokken der serologischen Gruppe B wurde von TAKAHASHI et al. (1998) genotypisch in drei unterschiedliche Untergruppen unterteilt: III-1, III-2 und III-3. Der Serotyp III-3 konnte häufig bei Infektionen von Neugeborenen (TAKAHASHI et al. 1999) und bei neonatalen Septikämien und Meningitiden (ADDERSON et al. 2000) festgestellt werden. Untersuchungen von BOHNSACK et al. (2001) ergaben, dass B-Streptokokkenkulturen vom Serotyp III-1 und III-3 das Enzym Hyaluronidase bildeten, B-Streptokokkenkulturen vom Serotyp III-2 waren dagegen keine Hyaluronidasebildner.

Das Polysaccharidantigen III war nach MUSSER et al. (1989) von allen vorkommenden Serotypen am häufigsten bei B-Streptokokken, isoliert von Neugeborenen mit Meningitis, nachweisbar. Nach Untersuchungen von WESSELS et al. (1992) war der B-Streptokokken-Serotyp III bei etwa 60 % der B-Streptokokken, isoliert von Septikämien, und bei 80-90 % der B-Streptokokken, isoliert von Neugeborenenenerkrankungen mit Meningitissymptomen, nachweisbar.

2.3.2.4 Typenantigene IV, V, VI, VII und VIII

Der Serotyp IV und der damals noch vorläufige Serotyp V wurden erstmals von JELINKOVA und MOTLOVA (1985) vorgestellt. Der Typenreferenzstamm IV

(3139) war ursprünglich von einem Neugeborenen mit septikämischem Erkrankungsbild isoliert worden (BERGNER-RABINOWITZ et al. 1980). Die Erstisolierung des Serotyps V (SS1169) erfolgte von WILKINSON et al. (1977).

Das Polysaccharidantigen IV bestand nach WESSELS et al. (1989) im wesentlichen aus Glucose, Galactose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure im molaren Verhältnis von 2:2:1:1. Im weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Neuraminsäureanteil des Typenantigens IV nicht die serologisch determinierende Komponente darstellte (WESSELS et al. 1989). Das Polysaccharidantigen V setzte sich, ebenso nach WESSELS et al. (1991), aus Glucose, Galactose, 2-Acetamido-2-Deoxyglucose und N-Acetylneuraminsäure im molaren Verhältnis von 3:2:1:1 zusammen.

Der Serotyp V wurde von LACHENAUER und MADOFF (1997) in *E. coli* kloniert und sequenziert. Der Serotyp V, mit einem Molekulargewicht von 90.000 Da, war gegenüber Pepsin empfindlich. Nach oben genannten Autoren war dieses Gen im Vergleich zu dem Gen, das das α -Protein kodierte, homolog, jedoch nicht identisch.

Bei Serotyp V-B-Streptokokken wurden von ARESCHOUG et al. (1999) zwei sehr häufig vorkommende neue Proteine, das Fbs-Protein und ein Rib-ähnliches Protein, beschrieben. Das Fbs-Protein hatte eine Größe von 110.000 Da und wurde bei 31 % der Serotyp V-B-Streptokokken nachgewiesen. Das Rib-ähnliche Protein wurde bei 59 % der Serotyp V-B-Streptokokken festgestellt. Die Isolierung und Reindarstellung dieser beiden Antigene war durch Ionenaustauschchromatographie möglich.

Die Polysaccharidantigene IV- und V-tragenden B-Streptokokken zeigten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine relativ geringe Bekapselung, die mit einem verminderten Neuraminsäuregehalt und mit einer geringeren Virulenz im Mäuseversuch einherging (MOLINARI et al. 1987). Neuraminsäure erwies sich bei diesen Serotypen nicht als die serologisch determinierende Komponente (JENNINGS et al. 1983a, WESSELS et al. 1989). Der geringere Neuraminsäuregehalt könnte mit einer geringeren Pathogenität der Kulturen korreliert sein (MOLINARI et al. 1987).

In den Untersuchungen von TISSI et al. (1990) und CORNACCHIONE et al. (1992) wurden B-Streptokokken mit Serotyp IV vermehrt bei septischen Arthritiden, B-Streptokokken mit Serotyp V, nach HERVÁS et al. (1993) sowie RENCH und

BAKER (1993), bei neonatalen Septikämien isoliert. Bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Rindermastitiden in Deutschland, war der Serotyp IV vereinzelt nachweisbar (WIBAWAN und LÄMMLER 1990b).

Für B-Streptokokken-Erkrankungen, insbesondere von Neugeborenen und Erwachsenen, haben nach Untersuchungen von BAKER und EDWARDS (1995) bis 1990 die Serotypen Ia, Ib, II und III eine herausragende Rolle gespielt. Nach Untersuchungen von HARRISON et al. (1995) sowie LIN et al. (1998) hat der Serotyp V nunmehr eine vergleichbare Bedeutung. Dies besonders bei B-Streptokokken-Erkrankungen von Kindern und Erwachsenen in den USA (ELLIOTT et al. 1998).

Das Polysaccharidantigen VI wurde von von HUNOLSTEIN et al. (1993) vorgestellt und näher charakterisiert. Erstmals war von WILKINSON (1977) eine Kultur mit dem Typenantigen VI als Typenantigenkandidat „NT6“ beschrieben worden, wobei der Serotyp VI jedoch, außer in Japan, vergleichsweise selten vorkam (MURAI und MOCHIDA 1993). Das Polysaccharidantigen VI bestand nach Untersuchungen von von HUNOLSTEIN et al. (1993) aus Glucose, Galactose und N-Acetylneuraminsäure im molaren Verhältnis von 2:2:1 und enthielt im Gegensatz zu allen anderen bisher charakterisierten Antigenen kein N-Acetylglucosamin. Ein spezifisches Antiserum gegen das Polysaccharidantigen VI zeigte im Mäuseversuch eine Schutzwirkung und beeinflusste in Phagozytoseversuchen die Opsonisierung der Kulturen (von HUNOLSTEIN et al. 1993).

Die *cps* Gensequenzen der Serotypen IV, V und VI wurden von McKINNON et al. (2001) beschrieben, Gendatenbank-Zugangsnummer: AF355776, AF349539 und AF337958.

Das Polysaccharidantigen VII wurde erstmals von PERCH et al. (1979) isoliert und als der B-Streptokokken-Typenantigenkandidat „7271“ beschrieben. Das Polysaccharidantigen VII bestand nach Untersuchungen von von HUNOLSTEIN et al. (1993) aus 26 % Glucose, 26 % Galactose, 24 % N-Acetylneuraminsäure und 9 % N-Acetylglucosamin. Der Referenzstamm des Serotyps VII war ebenfalls deutlich bekapselt und besaß im Mäuseversuch eine hohe Virulenz. Typenspezifische Antikörper zeigten sowohl im Mäuseversuch als auch in einem Hühnerembryomodelle eine Schutzwirkung (von HUNOLSTEIN et al. 1993). Nach weiteren Untersuchungen

von von HUNOLSTEIN et al. (1999) wurde der Serotyp VII bei invasiven Infektionen des Menschen isoliert. Der Serotyp VII war häufig gemeinsam mit den Proteinantigenen c oder R nachweisbar. Das Serotyp VII-spezifische Antiserum reagierte nach Untersuchungen von oben genannten Autoren mit den homologen Kulturen und zeigte eine Kreuzreaktion mit Zellextrakten des Serotyps V. Um ein gereinigtes Typ VII Antiserum zu erhalten, war eine Absorption mit einer Bakteriensuspension des Serotyps V nötig.

Nach den Untersuchungen von von HUNOLSTEIN et al. (1999) war der Serotyp VII nicht nur aus Proben des Urogenital- oder Rektaltraktes isolierbar, sondern auch aus Zerspinalflüssigkeit und aus Blutproben.

Das Polysaccharidantigen VIII wurde zunächst als „M9“, später als JM9 bezeichnet und wurde nachfolgend als vorläufiger Serotyp VIII geführt. (MURAI et al. 1990). Der erste bekannte Fall einer B-Streptokokkenseptikämie eines Patienten durch JM9 trat 1983 in Nagoya City, Japan auf (MURAI et al. 1992). Im Jahr 1990 wurde in weiteren Untersuchungen bei 25 % der isolierten B-Streptokokkenkulturen Japans das Polysaccharidantigen JM9 nachgewiesen (MURAI et al. 1992, WAGNER et al. 1994). Ähnliches galt für das zuvor seltene Polysaccharidantigen VI, das inzwischen neben dem Serotyp III und dem Serotyp VIII (JM9) zu den häufigsten Typenantigenen Japans zählt (MURAI et al. 1992). Im Gegensatz zu Japan wurden in den USA nach HARRISON et al. (1995) sowie LIN et al. (1998), die Serotypen VI und VIII selten beobachtet.

Das Polysaccharid VIII besteht nach KOGAN et al. (1996) hauptsächlich aus D-Glucose, D-Galactose, L-Rhamnose und N-Acetylneuraminsäure im molaren Verhältnis von 1:1:1:1.

Alle JM9-Kulturen enthielten N-Acetylneuraminsäure als Bestandteil des Polysaccharidantigens und bei etwa der Hälfte der Kulturen war gleichzeitig das Proteinantigen R festzustellen (WAGNER et al. 1994). In Untersuchungen von MURAI und MOCHIDA (1993) gelang es, spezifische Antikörper gegen das Polysaccharidantigen JM9 in Seren schwangerer Frauen nachzuweisen.

In einem Hühnerembryomodelle ließ sich eine hohe Virulenz von B-Streptokokken des Serotyps VIII nachweisen, die z.T. die Virulenz der Serotypen Ia und III übertraf. Anhand dieses Modells konnte nach WAGNER et al. (1994) ebenso

eine Schutzwirkung von typenspezifischen Antikörpern gegen JM9 demonstriert werden.

LACHENAUER et al. (1999) sowie PAOLETTI et al. (1999) beschrieben den klinischen Verlauf einer Infektion mit B-Streptokokken vom Serotyp VIII bei Neugeborenen. Neonatale B-Streptokokkeninfektionen, untersucht von HOSHINA et al. (1994) von 1988 bis 1992 ergaben, dass von insgesamt 301 B-Streptokokkenkulturen 99 Kulturen eine "Early-onset"-Erkrankung verursachten. Unter diesen befanden sich 11 (11,1 %) B-Streptokokkenkulturen des Serotyps VI und 9 (9,1 %) B-Streptokokkenkulturen des Serotyps VIII.

2.3.3 Proteinantigene

2.3.3.1 Antigen R, Rib und „R-associated antigen“ (Ra)

Die Proteinantigene R und X wurden erstmalig bei B-Streptokokkenkulturen vom Rind beschrieben (PATTISON et al. 1955). Das Proteinantigen R konnte, vergleichbar dem M- und T-Protein, erstmals als Oberflächenantigen bei Streptokokken der serologischen Gruppe A nachgewiesen werden (LANCEFIELD und PERLMAN 1952). Das Proteinantigen R war durch eine Resistenz gegenüber Trypsin und eine Empfindlichkeit gegenüber Pepsin gekennzeichnet. Nach Untersuchungen von den oben genannten Autoren sowie FLORES und FERRIERI (1993) war die antigene Eigenschaft des Proteinantigens R von Streptokokken der serologischen Gruppe B mit dem R 28-Antigen von Streptokokken der serologischen Gruppe A und von Streptokokken der serologischen Gruppen C, F, G und L identisch. WILKINSON (1972) konnte in Immundiffusionsreaktionen bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, B und C vier serologisch unterscheidbare R-Proteine (R1, R2, R3 und R4) feststellen. In den Untersuchungen von FLORES und FERRIERI (1993) war bei B-Streptokokkenisolaten vom Menschen hauptsächlich das Proteinantigen R4 feststellbar. Die übrigen R-Antigene hatten nur eine untergeordnete Bedeutung. Das Proteinantigen R4 stellte sich im „Western Blot“ mit zwei Banden dar, die ähnliche

Molekulargewichte besaßen. Eine Doppelbande war innerhalb einzelner R4-Kulturen in einem variablen Bereich zwischen 84.000 Da und bis zu über 200.000 Da nachweisbar (FLORES und FERRIERI 1993). Das Proteinantigen R1 zeigte jedoch im „Western Blot“ vergleichbar dem Proteinantigen α ein leiterähnliches Muster, wobei die Obergrenze dieser Proben über 200.000 Da lag (FLORES und FERRIERI 1993).

Nach Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1991b) wies das von B-Streptokokkenkulturen isolierte R-Protein mehrere Banden im Bereich von 116.000 Da auf. Das isolierte R-Protein ließ sich eindeutig vom Proteinantigen X abgrenzen (WIBAWAN und LÄMMLER 1991b).

Bei B-Streptokokken, isoliert vom Menschen, konnte das Proteinantigen R sehr häufig in Verbindung mit den Polysaccharidantigenen II und III nachgewiesen werden (JELINKOVA 1977, LINDEN 1983a, FLORES und FERRIERI 1993, WIBAWAN 1993b). Das Vorkommen des typenspezifischen Polysaccharidantigens und des R-Proteinantigens in steril filtrierten Kulturüberständen von B-Streptokokken bzw. deren L-Formen wurde von FLORES und FERRIERI (1989) mit verschiedenen immunologischen Verfahren untersucht. Beide Antigene ließen sich von L-Formen regelmäßig als getrennte Moleküle nachweisen. Das R-Protein im Überstand der L-Form erwies sich immunologisch als identisch mit dem R-Antigen im Überstand und mit R-Antigen, das mit 1 %igem Trypsin von der Zelloberfläche extrahiert wurde, sowie mit dem gemeinsamen R-Antigen von Streptokokken der Gruppen A, B und C. Auf Grund der serologischen Ergebnisse wurde nach Untersuchungen von FLORES und FERRIERI (1985) das R-Antigen dieses Stammes dem R4-Typ von WILKINSON (1972) zugeordnet. Die R-Proteine der L-Form und der Bakterien waren resistent gegen 5 % Trypsin und empfindlich gegen 0,5 % Pepsin (FLORES und FERRIERI 1989).

Nach KWAM et al. (1999) stellte sich durch immunologische Untersuchungen heraus, dass das Protein Rib identisch mit dem R4-Protein sein könnte. Bei dem häufig bei B-Streptokokkenisolaten des Serotyps V gefundenen Proteinantigen handelte es sich möglicherweise um das R1-Protein (LACHANAUER und MADOFF, 1996).

In Untersuchungen von LINDEN (1983a) war mit Antiserum gegen das R-Protein in Mäuseversuchen eine Schutzwirkung festzustellen. Diese Schutzwirkung war jedoch nur nachweisbar, wenn das Proteinantigen R in Kombination mit dem

Polysaccharidantigen II auftrat. Das Proteinantigen R wies in der Immunelektrophorese im Vergleich zu dem Proteinantigen X eine geringere anodale Wanderungsgeschwindigkeit auf (WIBAWAN 1993b).

Das Proteinantigen Rib wurde von STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) und ein als „R-associated antigen“ (Ra) bezeichnetes Proteinantigen von KVAM et al. (1993) vorgestellt und näher charakterisiert.

Das Protein Rib (resistance to protease, immunity, group B) konnte nach Untersuchungen von STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) erstmals in Schweden in Extrakten einer vom Menschen isolierten B-Streptokokkenkultur (BS30) vom Serotyp III nachgewiesen werden. Nach Isolierung wies das Proteinantigen Rib ein Molekulargewicht von 95.000 Da auf. Das Proteinantigen Rib kam vor allem in Kombination mit dem Polysaccharidantigen III vor (BOPP 1994, BAKER 1997, STALHAMMAR-CARLEMALM et al. 2000). Rib-Antiserum, hergestellt gegen isoliertes Protein Rib, reagierte mit Antigenpräparationen aus 31 von 33 Typ-III-Kulturen, aber nur mit einer Antigenpräparation von 25 Kulturen mit anderen Polysaccharidenantigenen (STALHAMMAR-CARLEMALM et al. 1993).

Das Proteinantigen Rib besaß nach den Untersuchungen von STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) keine immunologische Beziehung zu den Proteinantigenen R und c β , zeigte jedoch einige Gemeinsamkeiten mit dem c α -Protein. Das Proteinantigen Rib von Streptokokken der serologischen Gruppe B wies nach STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1999, 2000) eine Kreuzreaktion mit dem R 28-Antigen von Streptokokken der serologischen Gruppe A auf.

Das Gen, das das Proteinantigen Rib kodiert, wurde von WÄSTFELD et al. (1996) kloniert und sequenziert. Das Rib-Gen kodierte 55 Aminosäuren und bestand aus einer Serie von 12 identischen und sich wiederholenden Einheiten, wovon jede Einheit 79 Aminosäuren aufwies.

Nach den Untersuchungen von BOPP und LÄMMLER (1994) schienen die Proteinantigene Rib und Ra zur R-Proteinfamilie zu gehören. Unabsorbierte Antiseren gegen alle drei Proteine reagierten mit R-, Rib- und Ra-Antigenpräparationen der Referenzstämme R (Compton 25/60), Rib (BS30) und Ra (GBS 65604). Die ebenso auftretende Kreuzreaktion des R-spezifischen Antiserums mit dem Proteinantigen X entsprach den Untersuchungen von PATTISON und HOWELL (1955). Nach

STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) und KVAM et al. (1993) besaßen die Rib- und Ra-Referenzstämme die Serotypen III/Rib bzw. III/Ra. Der Referenzstamm c β (70339) wies die Typenantigenkombination Ia/c β /Ra auf. Die Kreuzreaktionen der Rib- und Ra-spezifischen Antiseren mit Antigenpräparationen der Referenzstämme c β (70339) und III (6313) ließen sich anhand der Typenantigenkombinationen dieser Stämme erklären.

Im Gegensatz zu den Proteinen R, c α und c β erwies sich das Protein Rib als pepsinresistent. In Mäuseversuchen ließ sich eine deutliche Schutzwirkung von Rib-spezifischen Antikörpern nachweisen (STALHAMMAR-CARLEMALM et al. 1993).

Das Proteinantigen Ra war erstmals in Norwegen bei Untersuchungen des Referenzstammes c β (70339) bei einer vom Menschen isolierten B-Streptokokkenkultur (GBS 65604) beschrieben worden (KVAM et al. 1993). Im „Western Blot“ schien das Proteinantigen Ra jedoch, trotz Absorption, genau wie die monoklonalen Antikörper, hergestellt gegen das Protein Ra, noch in geringem Maße gemeinsame Epitope mit dem Proteinantigen R zu besitzen. Darin unterschied es sich in geringem Maße vom Protein Rib. Im weiteren ergaben sich Ähnlichkeiten mit dem c α -Protein (BOPP und LÄMMLER 1994).

Die Proteine Rib und Ra zeigten nach Untersuchungen von KVAM et al. (1993) und STALHAMMAR-CARLEMALM et al. (1993) Kreuzreaktionen mit einem 180.000 Da großen Protein des A-Streptokokkenreferenzstamm R28.

Zusätzlich wiesen sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper gegen die Referenzkultur GBS 65604 (Ra) eine Reaktion mit der Referenzkultur für Protein R, „Compton“ (NCTC 9828), und der A-Streptokokken-Referenzkultur T28 (NCTC 8308) auf. Dies deutete auf ein R-Protein-ähnliches Antigen hin (KVAM et al. 1993).

Bei den Untersuchungen von weiteren B-Streptokokkenkulturen reagierten 24 von 28 Typ-III-Kulturen mit monoklonalen Antikörpern gegen die B-Streptokokkenkultur GBS 65604 (Ra). Bei weiteren Kulturen mit Proteinantigen c konnten keine Reaktionen mit Antiserum gegen Ra gefunden werden (KVAM et al. 1993).

2.3.3.2 Antigen X

Als weiteres Proteinantigen der B-Streptokokkenoberfläche beschrieben PATTISON et al. (1955) das Proteinantigen X. Das X-Antigen erwies sich als pepsinempfindlich und teilweise empfindlich gegenüber Trypsin. Eine Isolierung und Charakterisierung des Proteinantigens X ergab im „Western Blot“ eine Hauptbande im Bereich von 200.000 Da und eine kleinere Bande bei 100.000 Da (LAUTROU et al. 1991, RAINARD et al. 1991a, b), nach Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1991b) jedoch mehrere Banden im Bereich von 180.000 Da. Nach RAINARD et al. (1991a, b) besaßen Antikörper gegen das Proteinantigen X im Tierversuch eine Schutzwirkung. Immunisierte Kühe reagierten nach experimenteller Infektion mit einem schnelleren Anstieg der Zellzahl in der Milch als nicht immunisierte Kühe. Die Milch dieser Kühe besaß in vitro im Vergleich mit der Milch nicht immunisierter Kühe eine erhöhte bakterizide Aktivität für Kulturen mit dem Proteinantigen X (RAINARD et al. 1991a, b). Im Serum dieser mit Proteinantigen X immunisierten Kühe konnten nach RAINARD et al. (1991a, b) X-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die in vitro die Opsonisierung und Phagozytose von B-Streptokokkenkulturen mit dem Proteinantigen X deutlich steigerten.

B-Streptokokken von Rind und Mensch unterschieden sich in der Verteilung ihrer Polysaccharid- und Proteinantigene. Unter letzteren handelte es sich bei B-Streptokokken aus Rindermastitiden überwiegend um das Antigen X (MORRISON und WRIGHT 1984, COLMAN 1988). Das Proteinantigen X kam dabei entweder allein oder in Kombination mit Polysaccharidantigenen, insbesondere dem Typenantigen IV, vor (WIBAWAN und LÄMMLER 1990a, b, WIBAWAN 1993b). Nach Untersuchungen von FINK et al. (2000) trat das Proteinantigen X überwiegend in Kombination mit dem Polysaccharidantigen Ia auf. Das Proteinantigen X wurde von verschiedenen Autoren als das bedeutendste Proteinantigen bei B-Streptokokken vom Rind beschrieben (BRGLEZ 1981, MORRISON und WRIGHT 1984, PASARIBU et al. 1985, COLMAN 1988, DEVRIESE 1991).

Bei Untersuchungen von BERGNER-RABINOWITZ et al. (1981), LÄMMLER et al. (1987) sowie WIBAWAN und LÄMMLER (1990a) gelang der Nachweis des

Proteinantigens X auch bei rinderpathogenen Streptokokken der serologischen Gruppen G und L.

2.3.3.3 Antigen c

Die Benennung des Proteinantigens c erfolgte von HENRICHSEN et al. (1984). Das Proteinantigen c ließ sich in zwei serologisch unterscheidbare Determinanten einteilen, wobei die eine durch eine Empfindlichkeit gegenüber Pepsin und Trypsin und die andere durch eine Empfindlichkeit gegenüber Pepsin, nicht aber gegenüber Trypsin gekennzeichnet war (WILKINSON und EAGON 1971). Die trypsinresistente Komponente des Proteinantigens c wurde als α -Antigen und die trypsinempfindliche Komponente als β -Antigen bezeichnet (BEVANGER und MAELAND 1979, BEVANGER 1983, BEVANGER und IVERSEN 1983, JOHNSON und FERRIERI 1984). Ein Nachweis der α oder β Komponente war auch mit Hilfe der Serum Soft-Agar Technik und durch Elektronenmikroskopie möglich (WIBAWAN und LÄMMLER 1990c, WIBAWAN et al. 1991c). Zwei weitere Determinanten des c-Antigens, die Komponenten γ und δ , wurden beschrieben (BRADY et al. 1988). Alle c-Komponenten traten nach den Untersuchungen von CHUN et al. (1991) unabhängig voneinander auf. Das γ Proteinantigen kam insbesondere bei B-Streptokokkenkulturen vor, die von Patienten mit neonataler Septikämie isoliert worden waren. Unabhängig vom Polysaccharidantigen konnte γ bei 15 von 41 c-Protein-positiven Kulturen, die von Neugeborenen mit "Early-onset"-Septikämie isoliert worden waren, gefunden werden (CHUN et al. 1991).

Bei der B-Streptokokkenreferenzkultur Ic (A 909) war der Serotyp Ia/ α , β , bei der α -Referenzkultur 335 der Serotyp Ia/ α und bei der β -Referenzkultur 70339 der Serotyp Ia/ β nachweisbar (NAESS et al. 1991). In immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten WIBAWAN et al. (1991c) zeigen, dass die α - und β -Antigene hauptsächlich in den äußersten Schichten der Zellwand und auf der gesamten Bakterienoberfläche verteilt vorkamen.

Das c-Proteinantigen lag nach den Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1990a) häufig als α Komponente allein, oder als α , β -Komponente gemeinsam vor, dagegen weniger häufig als $c\beta$ -Komponente allein. Das Proteinantigen α konnte nach den Untersuchungen von FLORES und FERRIERI (1993), LI et al. (1997) sowie BERNER et al. (2002) in Kombination mit den Polysaccharidantigenen Ia, Ib und II nachgewiesen werden, dagegen weniger häufig mit den übrigen Polysaccharidantigenen. BERNER et al. (1999) stellten fest, dass das β -Antigen zusammen mit den Serotypen Ia, Ib und II nicht aber zusammen mit dem Serotyp III nachweisbar war. Das β -Antigen war mit 93 % am häufigsten mit dem Serotyp Ib und mit 57 % am zweithäufigsten mit dem Serotyp II kombiniert.

Bei der Charakterisierung des α -Proteins stellten sich im „Western Blot“ Proteine mit Molekulargewichten zwischen 70.000 Da und 200.000 Da dar (BEVANGER et al. 1992). MICHEL et al. (1992) konnten das α -Protein aufgrund spezifischer Muster im „Western Blot“ und im „Southern Blot“ in eine α_1 - und α_2 -Klasse unterteilen.

Das α -Strukturgen des Referenzstammes A 909, auch *bca* (B-Streptokokken, Protein α) genannt, wies 3060 Nukleotide auf, die ein 108.000 Da großes Präprotein kodierten. Nach den Untersuchungen von MICHEL et al. (1992) bestand der Hauptteil des α -Proteins aus einer Serie von 9 identischen und sich wiederholenden Einheiten, wovon jede Einheit 82 Aminosäuren aufwies, 8.665 Einheiten groß war und von 246 Nukleotiden kodiert wurde. Dies wurde von DEBRA et al. (1993) sowie PUOPOLO et al. (2001) bestätigt.

LACHENAUER et al. (2000) haben zwei neue dem α -Protein ähnlichen Proteine Alp2 und Alp3 nachgewiesen und sequenziert. Diese zwei neuen Proteine von B-Streptokokken zeigten Ähnlichkeiten auf mit dem α -Protein und dem Protein Rib. Alp2 und Alp3 kamen meist gemeinsam mit den Serotypen V und VIII jedoch nicht mit anderen Serotypen von B-Streptokokken vor.

Das $c\beta$ -Gen, das mit einer Größe von 3500 Bp bzw. 3700 Bp angegeben wurde (JERLSTRÖM et al. 1991, MADOFF et al. 1992), kodierte ein Protein mit 1.164 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 131.000 Da (JERLSTRÖM et al. 1991). Alle B-Streptokokkenkulturen mit dem Proteinantigen $c\beta$ banden

Immunglobulin A (RUSSELL-JONES et al. 1984, FERRIERI et al. 1992, KWAM et al. 1992, BERNER et al. 2002). Diese Bindung könnte nach KREIKEMEYER und JERLSTROM (1999) zur Verhinderung der Opsonisierung und Phagozytose der Bakterien führen. Das Immunglobulin A konnte nach PAYNE et al. (1987) sowie PLEASS et al. (2001) nach Bindung an zwei verschiedenen Regionen des c β -Proteins lokalisiert werden.

Nach Untersuchungen von HEDÉN et al. (1991) bestand das c β -Protein aus 1097 Aminosäuren. In der C-terminalen c β -Antigenregion war eine neuartige, periodische Proteinstruktur feststellbar, die als „XPZ-Motiv“ bezeichnet wurde.

BERNER et al. (2002) haben das Proteinantigen c β zu 19 % bei B-Streptokokken, isoliert von Neugeborenen, und zu 22 % bei B-Streptokokken, isoliert von schwangeren Frauen, festgestellt.

Antikörper gegen die Proteinantigene c α und c β zeigten im Mäuseversuch eine Schutzwirkung (FERRIERI 1988, MICHEL et al. 1991). In vitro wurden B-Streptokokkenkulturen mit dem Proteinantigen c geringer phagozytiert und nach der Phagozytose weniger häufig abgetötet (FERRIERI 1988).

2.4 Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren von Streptokokken der serologischen Gruppe B

2.4.1 Hämolysin und CAMP-Faktor

S. agalactiae wächst auf Schafblutagarplatten unter Ausbildung einer α -, β - oder γ -Hämolysen (SELBITZ 1992, LÄMMLER und HAHN 1994, NIZET et al. 1996). Das Hämolysin der B-Streptokokken konnte erstmals von MARCHLEWICZ und DUNCAN (1980) isoliert und charakterisiert werden. Diese Autoren zeigten, dass die extrazelluläre Freisetzung des Hämolysins einen aktiven metabolischen Prozess darstellt und die Beteiligung eines Carriermoleküls benötigt. Das Hämolysin der B-Streptokokken wies nach diesen Untersuchungen Ähnlichkeiten mit dem Streptolysin S von Streptokokken der serologischen Gruppe A auf. Während

Hämolysine anderer grampositiver Kokken bedeutende Virulenzfaktoren darstellen, konnten WEISER und RUBENS (1987) keine Unterschiede in der Pathogenität zwischen β -hämolysierenden B-Streptokokkenkulturen und ihren hämolysinfreien Mutanten feststellen. TAPSALL und PHILLIPS (1987) wiesen zytolytische Aktivitäten des B-Streptokokken-Hämolysins nach. Nach Untersuchungen von WENNERSTRÖM et al. (1985) sowie NIZET et al. (1996) setzte isoliertes Hämolysin Enzyme aus Makrophagen frei. Nach Angaben dieser Autoren könnte das β -Hämolysin eine Rolle bei "Early Onset"-Septikämien spielen.

LÜTTICKEN et al. (1988) und CONDRAD et al. (1991) gelang die Klonierung und Sequenzierung der genetischen Determinanten, die die Hämolysinbildung kodieren. Das Gen war 3900 Bp groß bzw. das Gen kodierte 230 Aminosäuren, wobei die ersten 130 Aminosäuren essentiell für die Hämolysseaktivität waren. Nach ROSS et al. (1984) wurde eine β -Hämolysse vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Mensch, eine α - und γ -Hämolysse vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, nachgewiesen. Im Gegensatz zu der β -Hämolysse anderer Streptokokkenarten handelte es sich bei B-Streptokokken meist um eine schwach ausgeprägte, vollständige bzw. β -Hämolysse (MARCHLEWICZ und DUNCAN 1980, ROTTA 1986).

In Untersuchungen von WENNERSTRÖM et al. (1985) verloren B-Streptokokken nach mutagener Behandlung stets gleichzeitig die Hämolysinaktivität und das Pigmentbildungsvermögen. Nicht hämolysierende B-Streptokokken waren in der Regel auch unpigmentiert. Die so erzeugten Streptokokkenmutanten besaßen in Mäuseversuchen eine verminderte Virulenz. In Untersuchungen von SPELLERBERG et al. (2000) wurde ebenso auf eine Beziehung zwischen Hämolysse und Pigmentbildung hingewiesen. Von oben genannten Autoren wurde festgestellt, dass die zwei Gene, die Hämolysin- und Pigmentbildung kodieren, auf einem Genabschnitt lokalisiert sind.

Als charakteristische Eigenschaft der B-Streptokokken erwies sich im weiteren die positive CAMP-Reaktion, die nach den Anfangsbuchstaben der Erstbeschreiber CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN (1944) bezeichnet wurde. Bei dieser Reaktion bildet der CAMP-Faktor von Streptokokken der serologischen Gruppen B im Bereich der unvollständigen Staphylokokken- β -Hämolysse eine halbmondförmige

Zone vollständiger Hämolyse. Die CAMP-Reaktion wurde auf die synergistische Wirkung des Staphylokokken- β -Toxins, einer Sphingomyelinase C, und dem B-Streptokokken-CAMP-Faktor zurückgeführt (BERNHEIMER et al. 1979). Der CAMP-Faktor wurde als thermostabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 23.500 Da und einem isoelektrischen Punkt bei pH 8,3 beschrieben (BERNHEIMER et al. 1979). JÜRGENS et al. (1985) stellten ein Molekulargewicht von 25.000 Da und einen isoelektrischen Punkt bei pH 8,9 fest. Das CAMP-Protein reagierte nicht enzymatisch mit dem Ceramid-Phosphat, welches nach vorheriger Einwirkung der Staphylokokken-Sphingomyelinase C aus dem Sphingomyelin der Erythrozytenmembran entstand. Die Bindung des CAMP-Proteins an Ceramid-Phosphat führte zu einer Disorganisation der Lipiddoppelschicht und schließlich zur Hämolyse (BERNHEIMER et al. 1979). JÜRGENS et al. (1987) konnten unspezifische Bindungen von Immunglobulinen an den CAMP-Faktor von B-Streptokokken feststellen. Die Aminosäuresequenz des CAMP-Faktors wies Sequenzhomologien mit dem Protein A von *S. aureus* und dem Apolipoprotein aus Humanseren auf. Der CAMP-Faktor wurde deshalb auch als Protein B bezeichnet (RÜHLMANN et al. 1989).

Das für den CAMP-Faktor verantwortliche Gen wurde von SCHNEEWIND et al. (1988) sowie PODBIELSKI et al. (1994) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das CAMP-Gen *cfb* kodierte ein Protein, das zwischen 22.000 Da und 26.000 Da groß war.

Die PCR-vermittelte Amplifizierung des CAMP-Gens *cfb* konnte bereits zur molekularen Identifizierung von B-Streptokokken unterschiedlicher Herkunft eingesetzt werden (FINK et al. 2000, HASSAN et al. 2000, KE et al. 2000, ESTUNINGSIH et al. 2002).

Der CAMP-Test ermöglichte eine schnelle vorläufige Identifizierung von B-Streptokokken (TAPSALL und PHILLIPS 1987). WILKINSON (1977) beschrieb eine CAMP-Nachweismethode mit Filterpapierblättchen, die mit Staphylokokken- β -Lysin versetzt waren. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer vollständigen Hämolyse um das Filterpapierblättchen. PHILLIPS et al. (1980) konnten in einem Röhrchentest bereits nach 4 h eine positive CAMP-Reaktion ablesen. Nach Untersuchungen von LÄMMLER et al. (1984) entwickelten sich positive CAMP-

Reaktionen, nach Zusatz von Maltose oder Glucose zu dem Blutagargrundmedium in einer Endkonzentration von 0,04 %, schon innerhalb von 8 h. Konzentrationen von mehr als 0,64 % Maltose oder Glucose jedoch verhinderten die Ausbildung der CAMP-Reaktion.

Der CAMP-Reaktion vergleichbare Hämolysereaktionen wurden für Kulturen der Spezies *S. pyogenes* (GASE et al. 1999) und *S. uberis* (JIANG et al. 1996) und als konstantes Merkmal für *S. canis* und *S. porcinus* (LÄMMLER und BLOBEL 1987b) beschrieben. Bei einigen koagulasenegativen Staphylokokkenkulturen, sowie bei *Rhodococcus equi* und *Corynebacterium renale* wurden ebenfalls CAMP-ähnliche Reaktionen nachgewiesen (LÄMMLER und BLOBEL 1987b). Die CAMP-Reaktion wird auf Rinder- oder Schafblutagarplatten durchgeführt. Bei der Verwendung von Blut von Pferd, Mensch, Kaninchen oder Meerschweinchen konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden (LÄMMLER und BLOBEL 1987b).

Kühe mit experimentell induzierter *S. agalactiae*-Mastitis wiesen einen Anstieg neutralisierender Antikörper auf, welche die CAMP-Reaktion hemmten (BROWN et al. 1974). Die parenterale Applikation des CAMP-Faktors an Versuchstiere führte zum Tod der Kaninchen und der Mäuse (SKALKA und SMOLA 1981).

2.4.2 Hyaluronidase

Das Enzym Hyaluronidase wird zu den gewebeinvasiven Faktoren gezählt. Hyaluronidasen wurden bislang bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, B, C, G und L sowie *S. mitis* nachgewiesen (GERLACH und KÖHLER 1972). Die Bildung des Enzyms Hyaluronidase von Streptokokken der serologischen Gruppe B wurde erstmals von McCLEAN (1941) beschrieben. WERNER et al. (1951) unterschieden die Hyaluronidase der B-Streptokokken von der Hyaluronidase der A-, C- und G-Streptokokken.

Die Hyaluronidase spaltet Hyaluronsäure, welche eine Funktion als Kittsubstanz des Bindegewebes hat (LUDOWIEG et al. 1961). Das Enzym Hyaluronidase könnte als sogenannter „Spreading Factor“ eine vermehrte Ausbreitung der Bakterien im Gewebe bedingen (KARLSON 1984). WILLIAM (1955) stellte bei

Ratten nach regelmäßiger subkutaner Gabe von Hyaluronidase Entzündungserscheinungen und Hauterosionen fest. Hyaluronidase stimulierte, vergleichbar mit der DNase, die Bildung von spezifischen Antikörpern, deren Nachweis zur Diagnostik von Streptokokkeninfektionen geeignet war (TARANTA et al. 1960).

OZEGOWSKI et al. (1994) konnten das Enzym Hyaluronidase von B-Streptokokken isolieren und näher charakterisieren. Die isolierte Hyaluronidase besaß ein Molekulargewicht von 116.000 Da und ihr isoelektrischer Punkt lag bei pH 8,75. Sie hatte im weiteren ihr Temperaturoptimum bei 40°C und ihr pH-Optimum bei pH 6,3. Das Hyaluronidase-kodierende Gen *hylB* von Streptokokken der serologischen Gruppe B wurde zunächst von LIN et al. (1994) bei der *S. agalactiae*-Kultur 3502 teilweise und später von GASE et al. (1998) bei der *S. agalactiae*-Kultur 4755 vollständig kloniert und sequenziert. Das von der *S. agalactiae*-Kultur 4755 sequenzierte *hylB*-Gen zeigte nach GASE et al. (1998) zu 99,4 % Ähnlichkeit mit dem von der *S. agalactiae*-Kultur 3502 sequenzierten *hylB*-Gen.

Nach GRANLUND et al. (1998) ermöglichten das *hylB*-Gen einschließende Oligonukleotidprimer die Amplifizierung dieses Gens.

B-Streptokokken erwiesen sich im Vergleich zu anderen Streptokokkenarten als vermehrte Hyaluronidasebildner, wobei jedoch vom Rind isolierte B-Streptokokkenkulturen das Enzym relativ wenig produzierten (JELINKOVA 1977). Beim Menschen wurden bei schweren B-Streptokokkeninfektionen Neugeborener mehr als doppelt so häufig hyaluronidaseproduzierende-B-Streptokokkenkulturen gefunden als bei symptomlosen Trägerinnen von B-Streptokokken (KJEMS et al. 1980).

Die bisherigen Erkenntnisse über das Enzym Hyaluronidase bei B-Streptokokkenkulturen wurden von WAYNE und WALTON (2000) zusammengefasst.

Untersuchungen von GRANLUND et al. (1998) zeigten, dass das *hylB*-Gen inaktivierende-Insertionselement 1548 charakteristisch für Streptokokken der serologischen Gruppe B mit Serotyp III war, welche bei Endokarditisfällen des Menschen vorkamen. In Frankreich wurde von ROLLAND et al. (1999) das *hylB*-

Gen-Insertionselement 1548 bei *S. agalactiae*-Kulturen mit Serotyp III, isoliert aus dem Genitaltrakt und von Neugeborenen, nachgewiesen.

2.4.3 C5a-Peptidase

HILL et al. (1988) konnten bei Streptokokken der serologischen Gruppe B eine Protease nachweisen, die den Komplementfaktor C5a und dessen Derivat C5a_{desarg} inaktivierte. Diese C5a-Peptidase ließ sich enzymatisch von der B-Streptokokkenoberfläche ablösen, wies ein Molekulargewicht von 120.000 Da auf und spaltete den Komplementfaktor C5a zwischen den C-terminal gelegenen Aminosäuren Histidin und Lysin. Durch die Spaltung verlor C5a die Fähigkeit, sich an Granulozyten zu binden und deren Adhärenz und Chemotaxis zu stimulieren (BOHNSACK et al. 1991). Die Aktivität der Peptidase hatte nach oben genannten Autoren keinen Einfluss auf den Infektionsausbruch, sie griff aber in das Entzündungsgeschehen ein und verzögerte die Anhäufung von Granulozyten am Ort der Infektion. In weiteren Untersuchungen mit C5a verschiedener Tierarten zeigte das B-Streptokokkenenzym deutliche Aktivitätsunterschiede. Die C5a-Peptidase inaktivierte C5a-Moleküle von Mensch, Affe und Rind, nicht aber von Schwein, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte und Maus (BOHNSACK et al. 1993). Nach weiteren Untersuchungen von BOHNSACK et al. (2000) wurden C5a-Peptidasen bei Streptokokken der serologischen Gruppe B und ebenso bei Streptokokken der serologischen Gruppen A und G nachgewiesen.

Der Nachweis von C5a-Peptidase-Aktivitäten bei Streptokokken der serologischen Gruppen A und B deutete darauf hin, dass die Ausschaltung von Stoffen, die eine positive Chemotaxis bei Phagozyten bewirken, einen bedeutenden Virulenzmechanismus darstellen könnte (CLEARY et al. 1992).

Das B-Streptokokken C5a-Peptidase-Gen *scpB* schien nach Analysen von CLEARY et al. (1992) das C5a-Peptidaseprotein zu kodieren. Die Restriktionskarte des *scpB*-Gens zeigte Ähnlichkeiten mit dem bereits bekannten C5a-Peptidasegen *scpA* 12 von Streptokokken der serologischen Gruppe A (CLEARY et al. 1992,

CHMOURYGUINA et al. 1996) und mit *scpG* von Streptokokken der serologischen Gruppe G (CLEARY et al. 1992).

Nach FRANKEN et al. (2001) schienen die Gene *scpB* und *lmb* (Laminin-bindendes Protein-Gen) bei B-Streptokokkenkulturen vom Mensch weit verbreitet zu sein, nicht aber bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind.

2.4.4 Bindung von Proteinen

2.4.4.1 Fibrinogen

Fibrinogenbindende Oberflächenstrukturen von *Staphylococcus aureus*, bekannt als Clumping-Faktor, wurden bereits von MUCH (1908) beschrieben. Dem Clumping-Faktor von *S. aureus* ähnliche Oberflächenstrukturen konnten bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, B, C und G festgestellt werden (SCHÖNBECK et al. 1981, LÄMMLER et al. 1983a). Im Gegensatz zu A-, C- und G-Streptokokken waren jedoch bei Streptokokken der serologischen Gruppe B keine Bindungsaktivitäten für Immunglobulin G und α_2 -Makroglobulin nachweisbar (CHHATWAL et al. 1985). KANTOR (1965), WHITNACK und BEACHEY (1982) sowie WHITNACK et al. (1984) konnten bei Streptokokken der serologischen Gruppe A nachweisen, dass der Fibrinogenrezeptor mit dem M-Protein identisch zu sein schien. Die Fibrinogenbindung wurde als ein die Opsonisierung und die Phagozytose hemmender Faktor angesehen (KORNVALL et al. 1979). CHHATWAL et al. (1985) schlossen aus der Beobachtung, dass Fibrinogen sowohl mit M-Protein-positiven als auch negativen A-Streptokokken reagierte, dass außer dem M-Protein weitere fibrinogenbindende Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien vorhanden sein müssen.

Das Plasmaprotein Fibrinogen besteht aus drei verschiedenen Polypeptidketten, die als $A\alpha$ - $B\beta$ - und als γ -Kette bezeichnet werden und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (BÖGLI et al. 1988). B-Streptokokken banden vermehrt an die α - und β -Polypeptidketten des Fibrinogens, Streptokokken der serologischen Gruppen A, C und G wiesen dagegen eine vermehrte Bindung des kompletten

Fibrinogenmoleküls auf. Der Fibrinogenrezeptor der B-Streptokokken schien für die α - und β -Kette besser zugänglich zu sein als für das vollständige Fibrinogenmolekül (LÄMMLER et al. 1983a).

Ferner konnten Unterschiede in der Bindungsaktivität der B-Streptokokken für Fibrinogenpräparationen verschiedener Tierarten festgestellt werden (LÄMMLER et al. 1983a, REUTERSWÄRD et al. 1985). Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert von Rindermastitiden, besaßen deutliche Bindungsaktivitäten für Humanfibrinogen, dagegen nur schwache Bindungsaktivitäten für von Rindern und Schafen isoliertes Fibrinogen und keine Bindungsaktivitäten für Fibrinogen, isoliert von Pferden und Hunden (LÄMMLER et al. 1983b).

Die Guanidiniumchloridvorbehandlung schien überlagernde Kapselstrukturen der B-Streptokokkenoberfläche zu entfernen, löste aber den kovalent gebundenen Fibrinogenrezeptor nicht ab. Sie führte zu einer Steigerung der Fibrinogenbindung. Eine Trypsin- und Hitzevorbehandlung der B-Streptokokken zerstörte jedoch die Fibrinogenbindungsaktivität. Dies wies auf den Proteincharakter des Fibrinogenrezeptors der B-Streptokokken hin (CHHATWAL et al. 1984, 1985). Die Fibrinogenbindung an Streptokokken der serologischen Gruppe B könnte nach BILLINGS et al. (1994) einen möglichen Pathogenitätsfaktor darstellen. Diese Autoren wiesen nach, dass durch Interaktion von B-Streptokokken mit Fibrinogen die C3-Fixierung an der Bakterienoberfläche blockiert wurde.

2.4.4.2 Fibronektin

Fibronektin ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das sowohl in löslicher Form im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten, als auch in nicht-löslicher, gebundener Form an der Oberfläche verschiedener Zellen und als Zwischenzellsubstanz vorkommt (MOSHER und PROCTOR 1980, HYNES 1985). Dieses Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 440.000 Da besteht aus etwa 2300 Aminosäuren und einem 5 %igen Kohlenhydratanteil. Das Molekül setzt sich aus zwei nahezu identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 220.000 Da zusammen, die durch Disulfidbrücken am C-Terminus miteinander verbunden sind (PROCTOR 1987).

Fibronectin kann an verschiedene Makromoleküle, Oberflächenrezeptoren von Zellen und auch an Bakterien adhären (PROCTOR 1987).

Fibronectin-Bindungsaktivitäten wurden sowohl bei *S. aureus* (KUUSELA 1978) als auch bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, C, G, L und U beschrieben (MYHRE und KUUSELA 1983, SPEZIALE et al. 1984, CHHATWAL et al. 1985, CHHATWAL und BLOBEL 1987). Vergleichbares war bei Streptokokken der serologischen Gruppe B nicht nachweisbar (KUUSELA et al. 1984, CHHATWAL et al. 1985, BUTLER et al. 1987). Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen konnte RAINARD (1993a) bei B-Streptokokken, isoliert vom Rind, eine geringe Fibronectin-Bindungsaktivität feststellen. Nach HILL et al. (1993) wurden durch Antikörper opsonisierte B-Streptokokkenkulturen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vermehrt phagozytiert, wenn sie zusätzlich Fibronectin gebunden hatten. Die niedrige Fibronectinbindungskapazität der B-Streptokokken reichte aus, um die Phagozytose anzuregen. Nach den Untersuchungen von WRIGHT und MEYER (1985) sowie HILL et al. (1993) erfolgte die Stimulation der Phagozyten über die Peptidsequenz „Arg-Gly-Asp“ (RGD) des Fibronectinmoleküls, die an den Komplementrezeptor CR3 (CD11b/CD18) band. Die Peptidsequenz „Arg-Gly-Asp“ des Fibronectins reagierte ebenfalls mit dem IIb/IIIa-Glykoprotein zahlreicher Zelloberflächen und vermittelte so die Adhärenz von Bakterien (PROCTOR 1987). Nach Untersuchungen von RAINARD (1993a) förderte Fibronectin die Adhärenz der B-Streptokokken an das Eutergewebe; eine durch Fibronectin gesteigerte Phagozytose der B-Streptokokken konnte er jedoch nicht bestätigen.

Nach Untersuchungen von ZABEL et al. (1996) wurde eine Fibronectin-vermittelte Adhärenz von Streptokokken der serologischen Gruppe B an Vaginalzellen von Frauen festgestellt.

2.4.4.3 Laktoferrin

Laktotferrin ist ein eisenbindendes Protein, das von Schleimhautepithelzellen gebildet wird. In der Milchdrüse des Rindes wird es insbesondere in der Trockenstehzeit oder während einer Infektion in hohen Konzentrationen gefunden

(SMITH und SCHANBACHER 1977). Laktoferrin wird einerseits ein bakterizider Effekt zugeschrieben, andererseits können viele Bakterien das an das Laktoferrin gebundene Eisen für essentielle Stoffwechselfunktionen verwenden (ARNOLD et al. 1980).

Nach RAINARD (1986), GUTTEBERG et al. (1990) und von HUNOLSTEIN (1992) konnte bei Streptokokken der serologischen Gruppe B in vitro kein bakterizider Effekt des Laktoferrins nachgewiesen werden. Dagegen war in Untersuchungen von RAINARD (1992) bei B-Streptokokken, isoliert vom Rind, eine Bindung von Laktoferrin an der Oberfläche der B-Streptokokken nachweisbar. Ferner konnte RAINARD (1993a, b) nachweisen, dass die Bindung von bovinem Laktoferrin an *S. agalactiae* den klassischen Komplementweg aktivierte. Dadurch wurden die B-Streptokokkenkulturen in Abwesenheit spezifischer Antikörper opsonisiert und vermehrt von neutrophilen Granulozyten phagozytiert.

2.4.4.4 Immunglobulin A

Eine nicht immunogene Bindung des Fc-Fragments von Immunglobulin A (IgA) an B-Streptokokkenkulturen wurde erstmals von RUSSELL-JONES et al. (1984) beschrieben. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der IgA-Bindung von Streptokokken der serologischen Gruppe B und dem Vorkommen des c β -Proteinantigens festgestellt werden (CLEAT und TIMMIS 1987, FERRIERI et al. 1992, KWAM et al. 1992). Die IgA-Bindungsaktivität war an zwei verschiedenen Regionen des c β -Proteins lokalisiert (JERLSTRÖM et al. 1991 und 1996).

Die Untersuchungen von PAYNE und FERRIERI (1985), BAKER et al. (1986) sowie PAYNE et al. (1987) ergaben, dass die nicht immunogene Bindung von IgA an Kulturen mit c β -Proteinantigen zu einer Verhinderung der Opsonisierung und Phagozytose der Bakterien führten.

Das für die Bindung des Proteinantigen c β und IgA verantwortliche Gen wurde von USTINOVITCH et al. (1999) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Dieses Gen kodierte ein Protein mit einer Größe von 45.000 Da.

Nach Untersuchungen von SCHALEN (1993) wurde ebenso eine Bindung des Fc-Fragments von IgA an A- und B- Streptokokkenoberflächen nachgewiesen. Im weiteren konnte eine Korrelation zwischen der IgA-Bindung von Streptokokken der serologischen Gruppe B und dem Vorkommen des Ib-Polysaccharidantigens festgestellt werden.

Eine Bindung des Fc-Fragments von Immunglobulin A an B-Streptokokkenkulturen beschrieben ebenfalls PLEASS et al. (2001).

2.4.4.5 Immunglobulin G

Über das Fc-Stück ist das Protein A von *S. aureus* in der Lage, Immunglobulin G (IgG) zu binden (FORSGREN und SJÖQUIST 1966). Der Fc-Anteil des Immunglobulin-Moleküls reagiert mit dem IgG-Rezeptor und wird aus diesem Grund allgemein als Fc-Rezeptor bezeichnet (KRONVALL 1973). Bei Streptokokken der serologischen Gruppen A, C und G waren dem Protein A ähnliche Fc-Rezeptoren nachweisbar (KRONVALL 1973, REIS et al. 1984, CHHATWAL et al. 1985). Eine vergleichbare Bindung des Fc-Fragments von IgG war bei *S. suis* und bei Streptokokken der serologischen Gruppen D, L und U (CHHATWAL et al. 1985b, SCHAUFUSS 1986, SERHIR et al. 1993, SALASIA 1994, SIPPEL und LÄMMLER 1995) und bei *Staphylococcus intermedius* (LÄMMLER et al. 1985) nachweisbar.

Erstmals wurde von JÜRGENS et al. (1987) eine Bindungsstelle für Immunglobulin G bei Streptokokken der serologischen Gruppe B beschrieben.

2.4.4.6 β_2 -Mikroglobulin

β_2 -Mikroglobulin wurde erstmals 1968 als ein niedermolekulares Protein beschrieben, das sich bei verschiedenen Nierenerkrankungen des Menschen vermehrt im Urin nachweisen ließ (BERGGARD und BEARN 1968). Bezüglich seiner Größe und Aminosäuresequenz ähnelt das β_2 -Mikroglobulin dem Immunglobulin-G

(PETERSON et al. 1972, CHHATWAL et al. 1986). Aggregiertes β_2 -Mikroglobulin vom Menschen war in der Lage, Komponenten des Komplementbindungssystems zu binden (PAINTER et al. 1974).

Eine Bindung von β_2 -Mikroglobulin an Streptokokken der serologischen Gruppe B konnte erstmals von SCHÖNBECK et al. (1981) nachgewiesen werden. B-Streptokokken mit den Proteinantigenen R und X reagierten nach CHHATWAL et al. (1986) hauptsächlich mit monomerem β_2 -Mikroglobulin, während B-Streptokokken mit Serotypen ohne Proteinantigene bevorzugt aggregiertes β_2 -Mikroglobulin banden. Nicht typisierbare B-Streptokokkenkulturen konnten nach den oben genannten Autoren weder aggregiertes noch monomeres β_2 -Mikroglobulin binden. Die Behandlung der B-Streptokokken mit Trypsin reduzierte die Bindung von monomerem β_2 -Mikroglobulin, weniger die Bindung von aggregiertem β_2 -Mikroglobulin (CHHATWAL et al. 1986).

2.4.4.7 Laminin

Laminin hat ein Molekulargewicht von etwa 850.000 Da und besteht aus einer α -, β - und γ -Untereinheit (GANTEN und RUCKPAUL 2000).

SPELLERBERG et al. (1999) konnten ein Laminin-bindendes Protein an der Oberfläche von B-Streptokokken nachweisen. Dies zeigte Ähnlichkeiten mit dem Streptokokken-Lipoprotein-Rezeptor-(LraI) anderer Streptokokkenspezies, welcher eine Rolle als Magnesiumtransporter spielt. Das Laminin-bindende Protein-kodierende Gen *lmb* konnte ebenso von SPELLERBERG et al. (1999) kloniert und sequenziert werden. Wie die Studie von FRANKEN et al (2001) zeigte, hatte die Mehrzahl der B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, kein *lmb*-Gen, was zu der Erkenntnis führte, dass das Laminin-bindende Protein keine bedeutende Rolle im Magnesiumtransport dieser Bakterien spielen kann. Bei humanpathogenen B-Streptokokken konnte dagegen das Gen *scpB* und *lmb* vermehrt nachgewiesen werden.

2.4.4.8 Cytokeratin 8

Nach den Untersuchungen von TAMURA und NITTAYAJARN (2000) lagerten sich Streptokokken der serologischen Gruppe B an zwei Proteine mit Molekulargewichten von ca. 50.000 Da und 57.000 Da an. Diese Proteine stammten aus Präparationen von Epithelzellen.

Die beiden Proteine konnten als zwei Formen von Cytokeratin 8 (CK8) identifiziert werden. Die Bindung wurde durch ein Oberflächenprotein der B-Streptokokken vermittelt. Die Polysaccharidkapsel der B-Streptokokken schien nicht an der Bindung beteiligt zu sein. Die Bindung von CK8 an B-Streptokokken erwies sich als eine häufig vorkommende Bindungseigenschaft der B-Streptokokken.

Welche Rolle die Bindung von CK8 an Streptokokken der serologischen Gruppe B bei *S. agalactiae*-Erkrankungen spielt, ist bislang noch unklar.

3. Material und Methoden

3.1 Bakterienkulturen

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 101 Streptokokkenkulturen der serologischen Gruppe B zur Verfügung. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. WEISS (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen) und Dr. P. KOPP (Institut für klinische Prüfung Ludwigsburg Veterinärmedizinisches Labor, Ludwigsburg) durchgeführt. Die Isolierung der *S. agalactiae*-Kulturen erfolgte aus unterschiedlichen Untersuchungsproben von Hunden (n=48) [Auge (n=10), Nase (n=10), Haut (n=6), Vagina (n=6), Kot (n=2), Exsudat (n=2), Urin (n=1), Wunde (n=1), Ohr (n=1), Lunge (n=1), Milz (n=1), Larynx (n=1), Trachea (n=1), unbekannt (n=5)], Katzen (n=7) [Haut (n=2), Urin (n=2), Wunde (n=1), Mund (n=1), unbekannt (n=1)], Kaninchen (n=2) [Vagina (n=1), Auge (n=1)], Meerschweinchen (n=2) [Nase (n=2)], Affen (n=2) [Leber (n=1), Kot (n=1)] und Pferden (n=7) [Lunge (n=1), Milz (n=1), Nieren (n=1), Leber (n=1), Gelenk (n=1), Zervix (n=2)].

Desweiteren wurden B-Streptokokkenkulturen von Mensch (n=9), Rind (n=10), Schwein (n=7) und Nutria (n=7), entnommen aus der Stammsammlung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen, verwendet. Einbezogen in die Untersuchungen wurden ferner die B-Streptokokken-Typenantigenreferenzkulturen 090 (Ia), H36B (Ib), 18 RS 21 (II), 6313 (III), 3139 (IV), SS 1169 (V), NT6 (VI), 7271 (VII), JM9-130013 (VIII), Compton 24/60 (X), Compton 25/60 (R), BS 30 (Rib), GBS 65604 (Ra „R-associated antigen“), 335 (c α), 70339 (c β) und A 909 (Ia/c).

Die B-Streptokokkenkulturen COH 1, COH 1-11, 395/2 und G 28, die Kulturen "*Streptococcus difficile*" ND 2-13 und ND 2-22, *S. equi* subsp. *equi* CF 32 und *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60, *S. porcinus* K129, *S. suis* S 428/1986, *Enterococcus faecalis* EK1, *S. uberis* NCDO 2022 und *S. parauberis* NCDO 2020 wurden ebenso der Stammsammlung der Professur entnommen.

Im weiteren wurde eine β -hämolyisierende *Staphylococcus aureus*-Kultur (Stamm *Pertsch*) verwendet.

3.2 Anzüchtungsmedien

Die Anzüchtung der Kulturen erfolgte auf Schafblutagarplatten. Der Blutagar bestand aus Blutagarbasis (Merck, Darmstadt) und 5 % defibrinierten aseptisch entnommenem Schafblut. Alle 4 Wochen erfolgte eine Subkultivierung der Bakterienkulturen auf frisch zubereiteten Blutagarplatten, mit anschließender Inkubation für 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen.

Zur Kultivierung der Streptokokkenkulturen in flüssigem Medium wurde Todd-Hewitt-Bouillon (THB, Oxoid, Wesel) verwendet. Die nach den Angaben des Herstellers angefertigte Bouillon wurde in unterschiedlichen Mengen, entsprechend den verschiedenen Versuchsanordnungen, in Erlenmeyerkolben oder Röhrchen abgefüllt und autoklaviert. Zur Anzüchtung der Bakterien erfolgte eine Inkubation der beimpften Kolben bzw. Röhrchen für 18-24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen.

Das Flüssigmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Todd-Hewitt-Bouillon (THB; Oxoid):

Fleischinfusion	10,0 g
Caseinpepton	20,0 g
Glucose	2,0 g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	2,0 g
NaCl	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	0,4 g
Aqua dest.	1000 ml
pH: 7,8 $\pm$ 0,2	

3.3 Identifizierung

Die Identifizierung der Streptokokken der serologischen Gruppe B erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von HAHN (1980), SCHLEIFER (1986), FACKLAM und CAREY (1985) sowie LÄMMLER und HAHN (1994). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Hämolyse, die CAMP-Reaktion, biochemische Eigenschaften und die Serogruppe bewertet.

3.3.1 Hämolyse und CAMP- Test

Eine Beurteilung der Hämolyse der Kulturen erfolgte nach Anzüchtung auf Schafblutagar (3.2). Hierbei wurden drei Hämolyseformen unterschieden.

α -Hämolyse: Die B-Streptokokkenkolonien waren von einer unvollständigen Hämolysezone, teilweise mit vergrünenden Höfen, umgeben.

β -Hämolyse: Die Kolonien waren von einer mehr oder weniger breiten Zone vollständiger Hämolyse umgeben.

γ -Hämolyse: Auch in unmittelbarer Umgebung der Kolonien blieben die Erythrozyten unverändert.

Der Nachweis des CAMP-Faktors erfolgte mittels Plattentest. Auf einer Schafblutagarplatte (3.2) wurde eine β -hämolisierende *S. aureus*-Kultur (Referenzstamm *Pertsch*) quer ausgestrichen und senkrecht dazu, bis etwa 3-5 mm an den Staphylokokken-Impfstrich heran, die zu untersuchenden Streptokokken. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 h bei 37 °C zeigte sich eine positive Reaktion in der Ausbildung einer halbmondförmigen Zone vollständiger Hämolyse im Bereich der unvollständigen Staphylokokken- β -Hämolyse.

3.3.2 Biochemische Eigenschaften

3.3.2.1 Abbau von Kohlenhydraten

Als Grundmedium diente 5 ml Phenolrot-Bouillon (Merck), der jeweils Arabinose, Glucose, Inulin, Lactose, Maltose, Mannit, Saccharose, Salicin, Sorbit bzw. Trehalose (Merck) in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt worden war. Nach einer Inkubationszeit für 18-24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen konnten Abbaureaktionen beurteilt werden. Positive Reaktionen, d.h. der Abbau des enthaltenen Zuckers, zeigten sich durch das Auftreten einer deutlichen Gelbfärbung des zuvor roten Mediums.

3.3.2.2 Hydrolyse von Äskulin

Das zum Nachweis der Äskulin-Hydrolyse verwendete Nährmedium bestand aus 5 ml Brain-Heart-Infusion (BHI, Hirn-Herz-Bouillon, Oxoid), der Äskulin in einer Endkonzentration von 0,1 % und Eisen-(III)-Citrat in einer Endkonzentration von 0,05 % zugesetzt worden waren. Nach einer Inkubationszeit für 18-24 h bei 37 °C konnte die Hydrolyse von Äskulin durch eine Schwarzfärbung des Mediums festgestellt werden.

3.3.2.3 Hydrolyse von Natrium-Hippurat

Der Nachweis der Hydrolyse von Na-Hippurat beruhte auf der von HWANG und EDERER (1975) beschriebenen Methode. Dazu wurden in 2 ml-Röhrchen jeweils 0,4 ml einer wässrigen 1 %-igen Na-Hippuratlösung (Sigma, Deisenhofen) gegeben und diese bis zum Gebrauch bei -10 °C aufbewahrt. Nach Zugabe einer Öse mit der zu

untersuchenden Streptokokkenkultur und dem Herstellen einer homogenen Suspension folgte eine Inkubation für 2 h bei 37 °C. Danach wurden 0,2 ml einer 3,5 %igen Ninhydrinlösung zugefügt. Eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C führte im positiven Fall zu einer blavioletten Färbung des Mediums.

3.3.3 Serologische Gruppenbestimmung

3.3.3.1 Extraktion des Gruppenpolysaccharidantigens

Zur Extraktion der Gruppenantigene der zu untersuchenden Streptokokkenkulturen kam die von RANTZ und RANDALL (1955) beschriebene Extraktionsmethode durch Autoklavieren zur Anwendung. Die Anzüchtung der Streptokokkenkulturen erfolgte dazu in 50 ml THB (3.2) für 18 h bei 37 °C. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 x g, 4 °C, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R, Heraeus Instruments, Hanau) und Aufschwemmung der Bakterien in 0,5 ml 0,14 mol/ l NaCl wurde die Bakteriensuspension durch Zugabe von wenigen Tropfen 1 mol/ l NaOH neutralisiert, wobei 0,05 %-iges alkoholisches Phenolrot (Merck) als Indikator diente. Nach Autoklavieren der Suspension für 20 min bei 120 °C und erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13, Heraeus Instruments) wurde das Gruppenantigen im Überstand durch serologische Nachweisreaktionen beurteilt.

3.3.3.2 Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony

Der serologische Nachweis der Gruppenpolysaccharidantigene erfolgte durch Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (1949). Dafür wurde eine Agaroselösung, bestehend aus 0,4 g Agarose (Standard EEO, Serva, Heidelberg), 1,2 g Polyethylenglycol (PEG 6000, Roth, Karlsruhe) und 0,02 g Natriumazid (Merck) in 20 ml Aqua dest. und 20 ml Phosphatpuffer (0,5 mol/ l, pH 7,5), durch Erhitzen gelöst

und 20 ml dieser Lösung auf eine Schiene mit 6 Objektträgern aufgetragen. Nach Erstarren der Agarose konnten mit einer Gelstanze (LKB, Stockholm, Schweden) ein Zentralloch und vier Marginallöcher ausgestanzt und mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben werden. Die Löcher hatten einen Durchmesser von 2,5 mm und wurden mit 10 µl der nach 3.3.3.1 gewonnenen Antigene in die Marginallöcher und mit 5 µl gruppenspezifischem Antiserum in das Zentralloch gefüllt. Das spezifische Antiserum gegen Streptokokken der Lancefield-Serogruppe B wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ch. LÄMMLER, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, Giessen, zur Verfügung gestellt. Nach einer Inkubation von 18-24 h bei Zimmertemperatur (25 °C) in einer feuchten Kammer erfolgte die Beurteilung der Präzipitationsbanden.

3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)-vermittelte Identifizierung

3.3.4.1 Analyse des 16S ribosomalen RNA-Gens mittels PCR

3.3.4.1.1 Präparation der bakteriellen DNA

Die Aufbereitung der als „Template“ eingesetzten DNA erfolgte nach einer von BENTLEY et al. (1993) beschriebenen und von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) modifizierten Methode.

Dazu wurden einige Kolonien der zu untersuchenden, nach 3.2 angezüchteten Kulturen in Reaktionsgefäße mit 100 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0) überführt, jeweils 5 µl Mutanolysin (10 U/µl; Sigma,) zugesetzt und die Suspension für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zufügen von 10 µl Proteinase K (14,8 mg/ml, Boehringer, Mannheim) zur Deproteinisierung für 2 h bei 56 °C im Wasserbad und 10 min Kochen zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die Probe 30 s bei 10000 x g zentrifugiert und 2,5 µl des Überstands als „Template“ in die PCR eingesetzt.

3.3.4.1.2 Amplifizierung des 16S rRNA-Gens

Zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens wurde der von BENTLEY und LEIGH (1995) beschriebene universelle Primer AR1 mit der Sequenz 5'-GAGAGTTTGAT CCTGGCTCAGCA-3' und der Primer AmII, beschrieben von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999), mit der Sequenz 5'-CGGGTGTACAACTCTCGTGGT-3' (Primersynthese: MWG-Biotech, Ebersberg) eingesetzt. Zur Durchführung der PCR erfolgte zunächst das Pipettieren des Mastermixes.

Der Mastermix für einen Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Aqua bidest.	19,9 µl
Inkubationspuffer	3,0 µl (10x Puffer, Promega, Mannheim)
MgCl ₂	1,8 µl (25 mmol/l, Promega)
dNTP	0,6 µl (10 mmol/l, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Primer I	1,0 µl (10 pmol/l)
Primer II	1,0 µl (10 pmol/l)
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl (5 U/µl, Promega)

Nach gründlichem Mischen wurden 27,5 µl Mastermix/Ansatz in 0,2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und 2,5 µl der nach 3.3.4.1.1 präparierten DNA zugegeben. Das anschließende Temperaturprogramm, durchgeführt nach Angaben von BENTLEY und LEIGH (1995), umfaßte einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 35 Zyklen: Denaturierung 1,5 min bei 94 °C, Primeranlagerung 1,5 min bei 56 °C und Polymerisierung 1,5 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloß sich ein weiterer Zyklus von 4 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler (Techne-Progene bzw. Gene E, Thermodux, Wertheim bzw. Biometra, personal cycler, Göttingen).

3.3.4.1.3 Restriktionsverdau des 16S r RNA-Gens

Zur Darstellung von Genpolymorphismen erfolgte nach JAJARAO et al. (1992) ein Restriktionsverdau des nach 3.3.4.1.2 amplifizierten 16S r RNA-Genabschnittes mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* (BioLabs, Schwalbach/Taunus).

Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Produkt	18,0 µl
Enzym	1,0 µl
Puffer (10X) (BioLabs)	3,0 µl
Rinderserumalbumin	3,0 µl
Aqua dest.	5,0 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und die entstandenen Fragmente anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.4.1.4 Nachweis der Amplifikate und Fragmente im Agarosegel

Der Nachweis der Amplikons erfolgte in 1 %-igem, der Nachweis der DNA-Fragmente in 2 %-igem Agarosegel (NEEO, Roth). Dazu wurden 1 bzw. 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE- Puffer (40 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 1,14 mol/l Eisessig, pH 7,8) unter Erhitzung geschmolzen und in Flachbettformen gegossen. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurden 12 µl des PCR-Produkts bzw. der Restriktionsverdau mit 3 µl 6x „Loading Solution“ (MBI Fermentas) vermischt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 120 mA für 2,5 h im Horizontalgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TAE-Puffer. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte bzw. der Fragmente nach Restriktionsverdau wurde in der ersten Spur des Gels 3 µl eines Markers (100 Bp DNA Ladder, Gibco

BRL, Eggenstein bzw. 1 Kb Molekuler Ruler/EZ Load, Bio-Rad, München) aufgetragen.

Zur Darstellung der Fragmente erfolgte nach der Gelelektrophorese das Färben des Gels mit einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (5µg/ml, Sigma) für 5 min. Das Ethidiumbromid, ein fluoreszierender Farbstoff, lagerte sich dabei als interkalierende Substanz in die Doppelstränge der DNA ein. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Gele durch Schwenken in Aqua dest. für 20 min bei Raumtemperatur entfärbt und anschließend unter UV-Licht fotografisch dokumentiert (Pharmacia Biotech Image Master VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg i. Br.).

Die Fragmente stellten sich als helle Streifen vor dunklem Hintergrund dar.

3.3.4.2. PCR mit *S. agalactiae*-16S r RNA-spezifischen Oligonukleotid-primern

Zur Amplifizierung eines speziesspezifischen Genabschnitts des 16S rRNA-Gens wurden die von ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) beschriebenen Primer agal I mit der Sequenz 5'-ATAAGAGTAATTAACACATGTTAG-3' und agal II mit der Sequenz 5'-ACTTCGGGTGTTACAAAC-3' eingesetzt. Zur Durchführung der PCR erfolgte zunächst das Pipettieren des Mastermixes, der nach den unter 3.3.4.1.2 beschriebenen Angaben hergestellt wurde.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen: Denaturierung 1,5 min bei 94 °C, Primeranlagerung 1,5 min bei 58 °C und Polymerisierung 1,5 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 4 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.3.4.3 PCR mit *S. agalactiae*-16S–23S rRNA-„intergenic spacer“-Region-spezifischen Oligonukleotidprimern

Die Amplifizierung eines speziesspezifischen Abschnitts der 16S–23S rRNA-„intergenic spacer“-Region von *S. agalactiae* erfolgte mit Hilfe der von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Primer STRA-AgI mit der Sequenz 5'GGAAACCTGCCATTGCG-3' und STRA-AgII mit der Sequenz 5'-TAACTTAACCTTATTAACCTAG-3'. Der Mastermix wurde nach den unter 3.3.4.1.2 beschriebenen Angaben hergestellt.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen: Denaturierung 0,5 min bei 94 °C, Primeranlagerung 0,5 min bei 58 °C und Polymerisierung 0,5 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 5 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.3.4.4 Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens *cfb*

Für die Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens *cfb* wurden die von PODBIELSKI et. al (1994) beschriebenen Primer camp 13 mit der Sequenz 5'-ATCGTTATGGTTTTTACATGA-3' und clon 2 mit der Sequenz 5'-TTATTTTAAATGCTGTTTGAAGTG-3' sowie die nach 3.3.4.1.1 aufbereitete DNA und das unter 3.3.4.1.2 beschriebene Temperaturprogramm eingesetzt.

3.4 Phäno- und genotypische Charakterisierung

3.4.1 Serotypisierung

3.4.1.1 Extraktion der Typenantigene

Die Extraktion der Typenantigene, ursprünglich von LANCEFIELD (1933) beschrieben, erfolgte nach den Angaben von PATTISON et al. (1955), PATTISON und HOWELL (1955) sowie JELINKOVA (1977). Dazu wurden die Streptokokkenkulturen in 50 ml THB (siehe 3.2) für 18-24 h bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22), 2x in 5 ml 0,14 mol/l NaCl gewaschen und schließlich in 0,35 ml 0,2 mol/l HCl resuspendiert. Nach 2 stündiger Inkubation bei 52 °C im Wasserbad und Neutralisation der Suspension mit 1 mol/l NaOH und Phenolrot als Indikator und anschließender Zentrifugation (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13) konnten die Typenantigene im Überstand nachgewiesen werden.

3.4.1.2 Absorption der Antiseren

Zur Herstellung von monospezifischen Antiseren, freundlicherweise von Prof. Dr. Ch. LÄMMLER (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Professur für Milchwissenschaften, Giessen) zur Verfügung gestellt, wurden die Antiseren mit den jeweils kreuzreagierenden B-Streptokokkenreferenzkulturen bzw. mit weiteren B-Streptokokkenkulturen definierten Serotyps absorbiert. Hierzu wurden die Absorptionsstämme in 40 ml THB (siehe 3.2) 18-24 h bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 10000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 22), 2x in 10 ml 0,14 mol/l NaCl gewaschen und anschließend in 2 ml 0,14 mol/l NaCl resuspendiert. Nach Hitzeaktivierung (2 h bei 60 °C) der Absorptionsstämme erfolgt die Inkubation von

500 µl der zu behandelnden Antiseren mit den jeweiligen Absorptionsstämmen für 4 h bei 37 °C (siehe Tabelle 1) und die anschließende Zentrifugation (5 min, 13000 x g, Heraeus Sepatech Biofuge 13). Nach Überprüfung der Monospezifität der Antiseren mit den nach 3.4.1.1 hergestellten HCl-Extrakten der verschiedenen Typenantigenreferenzkulturen konnten die so präparierten Antiseren zum Nachweis der Typenantigene eingesetzt werden.

Tabelle 1

Absorption der Antiseren mit den jeweils kreuzreagierenden Absorptionsstämmen

Antiserum	Menge des Antiserums und der verwendeten Bakteriensuspension
Ia	500 µl Ia-AS + 250 µl Ib-BS
Ib	500 µl Ib-AS + 250 µl NF 25 (Ia/cβ)-BS + 250 µl FHBS 12 (IV/cα)-BS
II	500 µl II-AS + 250 µl III-BS
III	500 µl III-AS + 250 µl Stamm 2202/99 (II/Rib)-BS
IV	500 µl IV-AS + 250 µl II-BS + 250 µl VI-BS
V	500 µl V-AS + 250 µl III-BS
VI	500 µl VI-AS + 250 µl II-BS + 250 µl IV-BS
VII	500 µl VII-AS + 250 µl II-BS + 250 µl III-BS
VIII	500 µl VIII-AS + 250 µl X-BS + 250 µl R-BS
R	500 µl R-AS + 250 µl X-BS + 250 µl III-BS
Rib	500 µl Rib-AS + 150 µl R-BS + 250 µl Stamm N 3129 (III)-BS
X	500 µl X-AS + 250 µl R-BS + 250 µl III-BS
cα	500 µl cα-AS + 250 µl NF 25 (Ia/cβ)-BS
cβ	500 µl cβ-AS + 250 µl FHBS 12 (IV/cα)-BS + 250 µl Stamm 2202/99 (II/Rib)-BS

AS = Antiserum

BS = Bakteriensuspension eines kreuzreagierenden B-Streptokokkenstammes definierten Serotyps zur Absorption der Antiseren

3.4.1.3 Nachweis der Typenantigene durch Immundiffusion

Der Nachweis der Typenantigene durch Immundiffusion erfolgte wie unter 3.3.3.2 beschrieben. In die jeweiligen Zentrallöcher wurden 5 µl der nach 3.4.1.2 absorbierten monospezifischen Antiseren, in die Marginallöcher die nach 3.4.1.1 hergestellten Typenantigenextrakte pipettiert.

3.4.2 PCR-vermittelte Typisierung

3.4.2.1 Amplifizierung des *bag*- Gens (Proteinantigen cβ)

Die PCR-Analyse des *bag*-Gens erfolgte nach Angaben von MAELAND et al. (1997) mit der nach 3.3.4.1.1 präparierten bakteriellen DNA. Zur Amplifizierung des *bag*-Gens von *S. agalactiae* wurden die Primer CBETA I mit der Sequenz 5'-AAGGCTATGAGTGAGAGCTTGGAG-3' und CBETA II mit der Sequenz 5'-CTGCTCTGGTGTTTTAGGAACTTG-3' und ein nach 3.3.4.1.2 hergestellter Mastermix verwendet.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 37 Zyklen: Denaturierung 1,0 min bei 94 °C, Primeranlagerung 1,0 min bei 60 °C und Polymerisierung 1,0 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 5 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.4.2.2 Amplifizierung des *rib*-Gens (Proteinantigen Rib)

3.4.2.2.1 Abrufen der Gensequenzen aus der Gendatenbank und Auswahl der Oligonukleotidprimer

Der Nachweis des *rib*-Gens erfolgte unter Verwendung der Primer RibAK I und RibAK II. Diese wurden mit Hilfe der Internet-Sequenzdatenbank „GenBank“, die über das „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ unter der Internetadresse „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>“ und unter der Gendatenbank-Zugangsnummer: U58333 abgerufen worden war, ausgewählt.

Die Primerauswahl erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO 4.0. In der Abb.1 ist die Gesamtsequenz des *rib*-Gens dargestellt. Die Anlagerungsstellen der Oligonukleotidprimer RibAK I an Position 256 bis 280 und RibAK II an Position 508 bis 532 sind markiert.

AATATTTGTT TTTAAAGCCT ATACTTTACT ATGTATAGAG CTATACAGAA TAAAGTAAAG
 GAGAATATTA TGTTTAGAAG GTCTAAAAAT AACAGTTATG ATACTTTACA GACGAAACAA
 CGGTTTTCAA TTAAGAAGTT TAAGTTTGGT GCAGCTTCTG TACTAATTGG TATTAGTTTT
 TTAGGAGGTT TTAAGTCAAG GCAATTTAAT ATTTCTACAG ATACTGTGTT TGCAGCTGAA
 GTAATTTTCA ²⁵⁶ **GCTGT TACGTTAAAC ACAAATATGA** ^{RibAK I} CTAAAAATGT TCAGAATGGT
 AGAGCATATA TAGATTTATA TGATGTGAAA AATGGGAAAA TAGATCCATT ACAATTAATT
 ACGTTAAATT CACCTGATTT AAAAGCTCAG TATGTCATTA GGCAAGGCGG CAATTATTTT
 ACACAACCTT CTGAATTGAC TACTGTTGGT GCAGCTAGTA TTAATTATAC AGTATTGAAG
 ACAGATGGAA GTCCTCATA GAAGCCT **GAT GGACAAGTGG ATATTATAAA CG** ^{RibAK II} ⁵³² TTTTCATTG
 ACTATTTACA ATTCTTCAGC TTTGAGAGAT AAAATAGATG AAGTTAAAAA GAAAGCGGAA
 GACCCTAAAT GGGACGAGGG AAGTCGCGAT AAAGTTTTGA TAAGTTTAGA TGATATCAAA
 ACAGATATTG ATAATAATCC TAAGACGCAA TCAGACATTG CCAATAAAAT AACTGAAGTT
 ACTAATTTAG AAAAAATACT AGTACCTCGA ATCCCAGATG CCGATAAGAA TGATCCAGCA
 GGTAAGATC AGCAAGTCAA TGTAGGTGAG ACACCGAAGG CAGAAGATTC TATTGGTAAC
 TTACCAGATC TTCCGAAAGG TACAACAGTA GCCTTTGAAA CTCCAGTTGA TACGGCAACA
 CCGGGAGACA AACCAGCAAA AGTTGTTGTG ACTTACCAG ATGGTTCAAA AGATACTGTA
 GATGTGACTG TTAAGGTTGT CGATCCACGT ACAGATGCCG ATAAGAATGA TCCAGCAGGT
 AAAGATCAGC AAGTCAATGT AGGTGAGACA CCGAAGGCAG AAGATTCTAT TGGTAACTTA
 CCAGATCTTC CGAAAGGTAC AACAGTAGCC TTTGAACTC CAGTTGATAC GGCAACACCG
 GGAGACAAAC CAGCAAAAGT TGTGTGACT TACCCAGATG GTTCAAAAGA TACTGTAGAT
 GTGACTGTTA AGGTGTGCGA TCCGCGTACA GATGCCGATA AGAATGATCC AGCAGGTAAA
 GATCAGCAAG TCAATGTAGG TGAGACACCG AAGGCAGAAG ATTCCTATTGG TAACTTACCA
 GATCTTCCGA AAGGTACAAC AGTAGCCTTT GAACTCCAG TTGATACGGC AACACCGGGA
 GACAAACCAG CAAAAGTTGT TGTGACTTAC CCAGATGGTT CAAAAGATAC TGATAGATGTG
 ACTGTTAAGG TTGTCGATCC GCGTACAGAT GCCGATAAGA ATGATCCAGC AGGTAAAGAT
 CAGCAAGTCA ATGTAGGTGA GACACCGAAG GCAGAAGATT CTATTGGTAA CTTACCAGAT
 CTTCCGAAAG GTACAACAGT AGCCTTTGAA ACTCCAGTTG ATACGGCAAC ACCGGGAGAC
 AAACCAGCAA AAGTTGTTGT GACTTACCCA GATGGTTCAA AAGATACTGT AGATGTGACT
 GTTAAGGTTG TCGATCCGCG TACAGATGCC GATAAGAATG ATCCAGCAGG TAAAGATCAG
 CAAGTCAATG TAGGTGAGAC ACCGAAGGCA GAAGATTCTA TTGGTAACTT ACCAGATCTT
 CCGAAAGGTA CAACAGTAGC CTTTGAACT CCAGTTGATA CGGCAACACC GGGAGACAAA
 CCAGCAAAAG TTGTTGTGAC TTACCCAGAT GGTTCAAAAG ATACTGTAGA TGTGACTGTT
 AAGGTTGTCG ATCCGCGTAC AGATGCCGAT AAGAATGATC CAGCAGGTAA AGATCAGCAA
 GTCAATGTAG GTGAGACACC GAAGGCAGAA GATTCTATTG GTAACCTACC AGATCTTCCG
 AAAGGTACAA CAGTAGCCTT TGAACTCCA GTTGATACGG CAACACCGGG AGACAAACCA
 GCAAAAGTTG TTGTGACTTA CCCAGATGGT TCAAAAGATA CTGTAGATGT GACTGTTAAG
 GTTGTGATC CGCGTACAGA TGCCGATAAG AATGATCCAG CAGGTAAAGA TCAGCAAGTC
 AATGTAGGTG AGACACCGAA GGCAGAAGAT TCTATTGGTA ACTTACCAGA TCTTCCGAAA
 GGTACAACAG TAGCCTTTGA AACTCCAGTT GATACGGCAA CACCGGGAGA CAAACCAGCA

AAAGTTGTTG	TGACTTACCC	AGATGGTTCA	AAAGATACTG	TAGATGTGAC	TGTTAAGGTT
GTCGATCCGC	GTACAGATGC	CGATAAGAAT	GATCCAGCAG	GTAAAGATCA	GCAAGTCAAT
GTAGGTGAGA	CACCGAAGGC	AGAAGATTCT	ATTGGTAACT	TACCAGATCT	TCCGAAAGGT
ACAACAGTAG	CCTTTGAAAC	TCCAGTTGAT	ACGGCAACAC	CGGGAGACAA	ACCAGCAAAA
GTTGTTGTGA	CTTACCCAGA	TGGTTCAAAA	GATACTGTAG	ATGTGACTGT	TAAGGTTGTC
GATCCGCGTA	CAGATGCCGA	TAAGAATGAT	CCAGCAGGTA	AAGATCAGCA	AGTCAATGTA
GGTGAGACAC	CGAAGGCAGA	AGATTCTATT	GGTAACTTAC	CAGATCTTCC	GAAAGGTACA
ACAGTAGCCT	TTGAAACTCC	AGTTGATACG	GCAACACCGG	GAGACAAACC	AGCAAAAGTT
GTTGTGACTT	ACCCAGATGG	TTCAAAAGAT	ACTGTAGATG	TGACTGTTAA	GGTTGTCGAT
CCGCGTACAG	ATGCCGATAA	GAATGATCCA	GCAGGTAAAG	ATCAGCAAGT	CAATGTAGGT
GAGACACCGA	AGGCAGAAGA	TTCTATTGGT	AACTTACCAG	ATCTTCCGAA	AGGTACAACA
GTAGCCTTTG	AAACTCCAGT	TGATACGGCA	ACACCGGGAG	ACAAACCAGC	AAAAGTTGTT
GTGACTTACC	CAGATGGTTC	AAAAGATACT	GTAGATGTGA	CTGTTAAGGT	TGTCGATCCG
CGTACAGATG	CCGATAAGAA	TGATCCAGCA	GGTAAAGATC	AGCAAGTCAA	TGTAGGTGAG
ACACCGAAGG	CAGAAGATTC	TATTGGTAAC	TTACCAGATC	TTCCGAAAGG	TACAACAGTA
GCCTTTGAAA	CTCCAGTTGA	TACGGCAACA	CCGGGAGACA	AACCAGCAAA	AGTTGTTGTG
ACTTACCCAG	ATGGTTCAAA	AGATACTGTA	GATGTGACTG	TTAAGGTTGT	CGATCCGCGT
ACAGATGCCG	ATAAGAATGA	TCCAGCAGGT	AAAGATCAGC	AAGTCAATGT	AGGTGAGACA
CCGAAGGCAG	AAGATTCTAT	TGGTAACTTA	CCAGATCTTC	CGAAAGGTAC	AACAGTAGCC
TTTGAAACTC	CAGTTGATAC	GGCAACACCG	GGAGACAAAC	CAGCAAAAGT	TGTTGTGACT
TACCCAGATG	GTTCAAAAGA	TACTGTAGAT	GTGACTGTTA	AGGTTGTCTGA	TCCGCGTACA
GATGCCGATA	AGAATGATCC	AGCAGGTAAA	GATCAGCAAG	TCAATGGTAA	AGGAAATAAA
CTACCAGCAA	CAGGTGAGAA	TGCAACTCCA	TTCTTTAATG	TTGTAGCTTT	GACAATTATG
TCATCAGTTG	GTTTATTATC	TGTTTCTAAG	AAAAAAGAGG	ATTAATCTTT	TGACCTAAAA
TGTCACTAAA	CTTTTCACCA	TTTATTGGTG	TGAACACATT	AATAA	3825

Abb.1 Nukleotidsequenz des *rib*-Gens von *S. agalactiae* einschließlich der Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer RibAK I und RibAK II.

3.4.2.2 Amplifizierung

Zur Amplifizierung des *rib*-Gens von *S. agalactiae* kamen die unter 3.4.2.2.1 beschriebenen Primer RibAK 1 mit der Sequenz 5'-GCTGTTACGTTAAACACAA ATATGA-3' und RibAK 2 mit der Sequenz 5'-CGTTTATAATATCCACTTG TCCATC-3' und ein nach 3.3.4.1.2 hergestellter Mastermix zur Anwendung. Für die PCR-Analyse des *rib*-Gens wurden die nach 3.3.4.1.1 hergestellten DNA-Präparationen verwendet.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 25 Zyklen: Denaturierung 0,5 min bei 94 °C, Primeranlagerung 0,5 min bei 52 °C und Polymerisierung 0,5 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 5 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.4.3 Pigmentbildung

Der Nachweis der Pigmentbildung der B-Streptokokkenkulturen erfolgte in GBS-Islam-Agar (Oxoid), der zur Herstellung von anaeroben Bedingungen zuvor in Schraubröhrchen abgefüllt worden war. Entsprechend den Angaben des Herstellers enthielt der GBS-Islam-Agar noch zusätzlich 50 ml steriles Pferdeserum pro Liter Agar. Die Röhrchen mit jeweils 5 ml Agar wurden mit Hilfe einer Stichöse beimpft und für 18-24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte die Beurteilung nach den Kriterien: rote Pigmentierung (+++), orangefarbene Pigmentierung (++), gelbe Pigmentierung (+) und keine Pigmentierung (-).

3.4.4 Ermittlung der Kettenlänge

Eine Beurteilung der Kettenlänge der B-Streptokokkenkulturen erfolgte mittels Gramfärbung, die nach Standardverfahren (BLOBEL und SCHLIEßER, 1994) durchgeführt wurde.

3.4.5 Wachstumseigenschaften in Flüssigmedien

Der Nachweis der Wachstumseigenschaften der B-Streptokokkenkulturen in Flüssigmedium erfolgte nach MÜLLER (1968). Dazu wurden die Streptokokkenkulturen in 10 ml THB für 18-24 h bei 37 °C ohne jegliche Bewegung der Röhrchen angezüchtet. Danach konnte das Wachstum der Bakterien als „trüb“ (gleichmäßige Trübung der gesamten Bouillon) oder „klar“ (Sedimentbildung bei überwiegend klarem Kulturüberstand) beurteilt werden (WIBAWAN und LÄMMLER, 1991a).

3.4.6 Wachstum in Soft-Agar

Die Prüfung des Wachstums in Soft-Agar erfolgte nach den Angaben von YOSHIDA (1971). Dazu wurden 0,1 ml der nach 3.2 angezüchteten Bakterien in einer Verdünnung von 1:1000 (Verdünnungsflüssigkeit 0,14 mol/l NaCl) in 10 ml Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), die 0,15 % Agar enthielt, bei ca. 37 °C zugegeben, sorgfältig gemischt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Die Beurteilung der kompakten bzw. diffusen Koloniemorphologie erfolgte nach YOSHIDA (1971) sowie WIBAWAN und LÄMMLER (1991a).

3.4.7 Salz-Aggregationstest

Der Salz-Aggregationstest (SAT) richtete sich im wesentlichen nach den Angaben von JONSSON and WADSTRÖM (1984) bzw. nach einer Modifikation des Tests nach SOEDARMANTO et al. (1996). Hierzu wurden die Streptokokkenkulturen nach 3.2 in 10 ml THB für 18-24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angezüchtet, abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), der Überstand verworfen und das Sediment in 3 ml 0,001 mol/l Na₂HPO₄-Puffer (pH 6,8) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 x g). Dem Dekantieren des Überstandes folgte das Resuspendieren des Sedimentes in 1 ml desselben Puffers und die photometrische Einstellung der Suspension bei einer Wellenlänge von 620 nm auf eine Transmission von 10 % (Spectronic 20, Bausch & Lomb, New York, USA). Auf einem Objektträger wurden 25 µl dieser Bakteriensuspension mit 25 µl einer Ammoniumsulfatlösung aufsteigender Konzentration [(NH₄)₂SO₄: 0,05 mol/l-3,2 mol/l], beginnend mit 0,05 mol/l (NH₄)₂SO₄, vermischt. Unter ständigem Schwenken des Objektträgers erfolgte die Beurteilung bei welcher Ammoniumsulfatkonzentration die Bakterien erstmals mit den Salzen der Lösung aggregierten. Um eine Selbstaggregation der Bakterienkulturen ausschließen zu können, wurden für jede *S. agalactiae*-Kultur 25 µl der Suspension mit 25 µl des Phosphatpuffers als Kontrolle mitgeführt.

3.4.8 Adhäsion an DEAE- Sephacel

Die Ionenaustauschchromatographie mit ganzen Bakterienzellen erfolgte nach der Methode von KABIR und ALI (1983). Dazu wurden ca. 0,5 ml DEAE-Sephacel (Pharmacia-LKB) in eine Pasteurpipette (0,7 mm x 30 mm), die mit einem Wattestopfen versehen war, abgefüllt und dreimal mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer, pH 6,8, gewaschen. Für die eigentliche Ionenaustauschchromatographie wurden die zu untersuchenden Kulturen nach 3.1.1 in 40 ml THB (3.2) für 18-24 h bei 37 °C unter

aeroben Bedingungen angezüchtet, abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), gewaschen und in dem oben genannten Puffer auf eine Transmission von 10 % (A620 nm, Spectronic 20) eingestellt. Nach Auftragen von 500 µl der photometrisch eingestellten Bakteriensuspension auf die vorbereitete Gelmatrix erfolgte die Elution von der DEAE-Sephacel-Säule mit 2,5 ml Phosphatpuffer unter Zusatz von 0,2 mol/l NaCl. Das Eluat wurde aufgefangen und photometrisch bei 540 nm gemessen. Als Bezugsgröße dienten 500 µl der eingestellten Bakterien, suspendiert in 2,5 ml Puffer (A540 nm). Die Bewertung der Adhäsion der Bakterien an der Gelmatrix erfolgte nach der Gleichung:

$$\% \text{ Interaktion mit der Ionenaustausch-Matrix} = \frac{A(540) - (A540 + DEAE - Sephacel)}{A(540)} \times 100$$

3.4.9 Hämagglutination

3.4.9.1 Gewinnung der Erythrozyten

Die verwendete Erythrozytensuspension wurde nach den Angaben von WIBAWAN et al. (1993a) hergestellt. Dazu erfolgte die sterile Abnahme von etwa 9 ml Kaninchen-, Schaf-, oder Humanblut und dessen Mischung mit 1 ml Natriumcitrat (0,2 mol/l, pH 5,2) als Antikoagulans sowie die anschließende Zentrifugation (Heraeus Sepatech Biofuge 22 R) für 10 min bei 5000 x g. Das gewonnene Sediment wurde zweimal mit 0,14 mol/l NaCl gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von 2 % eingestellt.

3.4.9.2 Hämagglutinationstest

Zur Untersuchung der Hämagglutinationsreaktion wurden die zu testenden Kulturen nach 3.2 in 10 ml THB für 18-24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angezüchtet, abzentrifugiert (10000 x g, 10 min, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R), in 0,14 mol/l NaCl gewaschen und in 5 ml 0,14 mol/l NaCl resuspendiert. Nach Verbringen von 20 µl einer nach 3.4.9.1 hergestellten Erythrozytensuspension auf einen Objektträger und Zugabe von 20 µl der Bakteriensuspension wurde die Suspension vermischt. Als Kontrollstämme dienten die hämagglutinationspositive B-Streptokokkenkultur 395/2 und die hämagglutinations-negative Kultur G 28.

Die Beurteilung der Hämagglutinationsreaktion erfolgte innerhalb von 30 s:

- ++ = ausgeprägte Hämagglutination
- + = deutliche Hämagglutination
- = keine Hämagglutination.

Als Kontrolle und um eine Selbstagglutination ausschließen zu können, dienten 20 µl Bakterien- bzw. Erythrozytensuspension vermischt mit 20 µl 0,14 mol/l NaCl.

3.4.10 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Zur Überprüfung der Antibiotikaempfindlichkeiten der Kulturen kam das vom Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin) empfohlene Verfahren zur Anwendung (Stand VIII 92). Dazu wurden 4-5 gleichartige Kolonien von einer Schafblutagarplatte entnommen, in 3 ml THB überimpft und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension konnten 0,1 ml auf Müller-Hinton-Agar (Oxoid), der 5 % Schafblut enthielt, mit einem sterilen Glasspatel ausgespatelt werden. Nach Trocknen des Inokulums erfolgte das Auflegen

von antibiotikahaltigen Testblättchen (Becton Dickinson, Heidelberg bzw. Oxoid) mit Hilfe eines Dispensers.

Die Antibiotikablättchen enthielten:

Bacitracin (10) ²	10 IE
Cefoxitin ²	30 µg
Clindamycin ¹	2 µg
Erythromycin ¹	15 µg
Gentamicin ¹	10 µg
Minocyclin ²	30 µg
Oxacillin ¹	5 µg
Penicillin G ¹	10 IE
Polymyxin B ¹	300 µg
Tetracyclin ²	30 µg

¹: Becton Dickinson

²: Oxoid

Im Anschluss an eine 20-minütige Diffusionsphase bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation für 18 h bei 37 °C. Die Bewertung richtete sich nach den Angaben des BgVV (Stand XII 92) sowie nach BARRY und THORNSBERRY (1991).

3.4.11 Analyse des Enzyms Hyaluronidase bzw. des Hyaluronidase-Gens *hylB*

3.4.11.1 Dekapsulationstest

Die Überprüfung der Hyaluronidasebildung war mittels des von WINKLE (1979) beschriebenen Dekapsulationstests möglich. Dazu erfolgte die s-förmige Beimpfung einer Blutagarplatte (3.2) mit der mucoid wachsenden *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur W60 sowie senkrecht dazu mit der zu untersuchenden *S. agalactiae*-Kultur. Nach einer Inkubation für 18–24 h bei 37 °C konnte im positiven Fall eine Hemmung des mucoiden Wachstums von *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur W60 im Bereich der *S. agalactiae*-Kulturen beobachtet werden.

3.4.11.2 Nachweis des Hyaluronidase-Gens *hylB* mittels PCR

3.4.11.2.1 Präparation der bakteriellen DNA

Zur Aufbereitung der als „Template“ eingesetzten DNA wurden die zu untersuchenden Kulturen zunächst, wie unter 3.3.4.1.1 beschrieben, behandelt, anschließend aber zur Inaktivierung der Proteinase K 2x mit je 2 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Endkonzentration 1 mmol/l; Sigma) für jeweils 1 h bei 56 °C behandelt.

3.4.11.2.2 Amplifizierung des Hyaluronidase-Gens *hylB*

Zur Amplifizierung des Hyaluronidase Gens *hylB* wurden die von GRANLUND et al. (1998) beschriebenen Primer Hyl 7 mit der Sequenz 5'-CGTCAA

CAGCCACCCATA-3' und Hyl 2 mit der Sequenz 5'-CAAATGACCATT CAACAGGT-3' in die PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte mit einer rekombinanten DNA-Polymerase von *Thermus thermophilus* (r*Tth*- Polymerase). Für die XL-PCR wurde folgender Reaktionsansatz mit Lösungen aus dem XL-PCR-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) hergestellt:

Aqua bidest.	25,4 µl
Inkubationspuffer	15,0 µl (3,3 x XL-Buffer II)
Mg(Oac) ₂	2,2 µl (25 mM)
dNTP	1,0 µl (16 mM, MBI Fermentas)
Primer I	0,8 µl (20 µM)
Primer II	0,8 µl (20 µM)
r <i>Tth</i> -DNA-Polymerase	0,8 µl (2 U/ µl)

Die PCR wurde im Thermocycler Perkin Elmer Cetus PE 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprogramm umfasste folgende Schritte:

Denaturierung	15 s, 94 °C
Anlagerung und Kettenverlängerung	5 min, 60 °C
Zyklenzahl	32*
abschließende Kettenverlängerung	7 min, 72 °C

* = Während der zweiten 16 Zyklen wurde die Primeranlagerung pro Zyklus um jeweils 15 s verlängert. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.4.11.3 Insertionselement IS1548

3.4.11.3.1 Abrufen der Gensequenzen aus der Gendatenbank und Auswahl der Oligonukleotidprimer

Die Analyse des von GRANLUND et al. (1998) beschriebenen Insertionselementes IS 1548, welches sich bei B-Streptokokken innerhalb des *hylB*-Gens befinden kann, erfolgte nach Präparation der bakteriellen DNA (3.3.4.1.1) mittels PCR.

Zur Amplifizierung dieses Bereiches innerhalb des *hylB*-Gens wurden die Oligonukleotidprimer IS-I und IS-II mit Hilfe des Computerprogramms Oligo 4.0 ausgewählt. Die Primerauswahl erfolgte anhand der von GRANLUND et al. (1998) (Gendatenbank-Zugangsnummer Y142070.1 unter der Internetadresse: „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>“ beschriebenen DNA-Sequenzen. Primer IS-I hatte die Sequenz 5'-GTTGATGTGAGTGAAGGTTG-3' und Primer IS-II die Sequenz 5'-CATCAATTTTGAAAAGATTCC-3'. In der Abb. 2 sind die Anlagerungsstellen der Oligonukleotidprimer IS-I an Position 310 bis 329 und IS-II an Position 1278 bis 1298 markiert dargestellt. Das Pipettieren des Mastermixes erfolgte nach 3.3.4.1.2.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen: Denaturierung 1,0 min bei 94 °C, Primeranlagerung 1,0 min bei 55 °C und Polymerisierung 1,0 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 5 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

TCATATGGAT	TAACAAATCA	CCAATCCACA	CGCCAAACGC	ATGAAGAAAC	TTTTGTTTTTC
AGAAAACTAG	ATTCATAATG	ACAAAATCAA	TCAAAGTAGT	ACACTATAGA	TGAGGTGACT
ACGATGATTG	ATTTTATTAT	TTCTATTGAT	GATTGCGCAG	TTGAATTGGA	TAGTCGTCAA
TCTTGAAAAA	TTGCTACCC	CTTATCAACC	ATTCTATTTC	TTGTCTTCGT	TTGTCAGTTA
GCTGGCATTG	AAACCTGGAA	GGAGATGGAA	GATTTTATTG	AAATGAATGA	ACCATTGTTT
310	IS-I				
GCGACCTACG	<u>TTGATTGAG</u>	<u>TGAAGGTTG</u>	CCGTCTCATG	ATACCTTAGA	GCGTGTGATT
AGTCTTGTTA	ATTCAGACCG	TTTAAAAGAG	CTTAAAGTTC	AATTTGAGCA	ATCATTGACA
AGCTTAGATG	CCGTTCATCA	ACTGATTTC	GTGGACGGTA	AAACGATTCG	AGGCAATCGA
GGTAAAAATC	AGAAGCCTGT	TCATATTGTA	ACGGCTTATG	ATGGGGGTCA	TCATCTTAGT
TTGGGACAGG	TAGCGGTTGA	GGAGAAAAGT	AATGAAATTG	TTGCCATTCC	TCAGTTATTG
CGGACAATTG	ATATCCGTAA	AAGCATTGTA	ACGATAGACG	CAATGGGCAC	GCAGACGGCT
ATCGTTGATA	CGATTATAAA	AGGTAAAGCA	GACTATTGCT	TAGCCGTCAA	AGGAAATCAA
GAAACACTTT	ATGATGATAT	TGCTCTTTAT	TTTAGTGATG	TCAACTTATT	GGAAGAACTC
CAAGAAAATG	CGCAGTATTA	TCAGACTGTT	GAAAAATCTA	GGGGACAGAT	TGAAGTTAGA
GAATACTGGG	TGTCTTCCGA	TATCAAATGG	TTGTGTCAAA	ACCATCCCAA	ATGGCATAAG
TTACGTGGTA	TTGGGATGAC	TCGTAACACG	ATTGATAAGG	ATGGTCAGCT	GAGTCAAGAG
AATCGTTATT	TTATCTTTAG	CTTTAAGCCG	GATGTCCTCA	CATTTGCCAA	TTGTGTACGA
GGTCATTGGC	AGATAGAGAG	TATGCACTGG	TTATTGGACG	TTGTTTATCA	TGAAGATCAT
CATCAGACAT	TGGATAAAAAG	AGCCGCATTT	AACCTAAATC	TTATCCGAAA	AATGTGCTTA
TATTTTCTCA	AAGTGATGGT	ATTTCCATAA	AAAGACCTCA	GTTATCGTCG	CAAACAACGG
TATATTTCTG	TCCATTTGGA	AGATTATTTA	GTCCAATTAT	TTGGAGAAAG	AGGCTAAGCA
GATCATTGAT	TTAAAAA	<u>GGA ATCTTTTCAA</u>	<u>AATTGATG</u>	TC	CGGGCACAAA
			IS-II	1278	
GAAAGTTTTC	ATGCGTACGG	CGTGACCAAT	CCCCACTCTA	CTATTTACAA	AAATTAAGAAA
GCTATTCGTA	CTGTAAAAGA	GAGTCTGGCT	TGGCTTCATC	AAAACCTCTA	CAATGTTAAT
AAAGATATAG	AAGGCTCTGC	CAATTGGTGG	GATTTTGAAA	TCGGTGTCCC	TCGCTCAATT
ACAGCTACCC	TAGCTCTCAT	GAATAACTAC	TTCACTGACG	CTGAAATAAA	AACTTATAACC
GACCCAATTG	AACACTTTGT	TCCTGATGCA	GGATATTTCC	GTAAAACGCT	TGTCAATCCA
TTTAAAGCCC	TTGGTGGTAA	TCTAGTAGAT	ATGGGGCGCA	ATCCATATGA	CTAGTAGAT
1679					

Abb.2 Nukleotidsequenz des Insertionselementes IS 1548 von *S. agalactiae* einschließlich der Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer IS-I und IS-II.

3.5 Untersuchung von weiteren mutmaßlichen Virulenzgenen und dem Insertionselement ISSag

3.5.1 Amplifizierung des C5a-Peptidase-Gens *scpB*

Die PCR-Analyse des C5a-Peptidase-Gens *scpB* erfolgte nach den Angaben von FRANKEN et al. (2001) mit der nach 3.4.11.2.1 präparierten bakteriellen DNA. Zur Amplifizierung des *scpB*-Gens wurden die Primer C5a-1 mit der Sequenz 5'-ATT GCGCTTATGTCTACGAGC-3' und C5a-2 mit der Sequenz 5'-AGCTACTAA TCCCAAGAAGAA-3' verwendet. Die Herstellung des Mastermixes und die eigentliche PCR erfolgte nach den unter 3.4.11.2.2 beschriebenen Angaben.

3.5.2 Amplifizierung des Laminin-bindenden Protein-Gens *lmb*

Die PCR Analyse des Laminin-bindenden Protein-Gens *lmb* erfolgte nach den Angaben von FRANKEN et al. (2001) mit der nach 3.4.11.2.1 präparierten bakteriellen DNA. Zur Amplifizierung des *lmb*-Gens wurden die Primer Lmb-1 mit der Sequenz 5'-GTTGTGAGTTTAGTAATGATA-3' und Lmb-2 mit der Sequenz 5'-ATTTGTTGAAGTGTCTTGATA-3' verwendet. Die Herstellung des Mastermixes und die eigentliche PCR erfolgte nach den unter 3.4.11.2.2 beschriebenen Angaben.

3.5.3 Amplifizierung des Insertionselements ISSag

Für die PCR-Analyse des Insertionselementes ISSag wurden die nach 3.3.4.1.1 hergestellten DNA-Präparationen verwendet. Bei der Amplifizierung des Insertionselementes ISSag kamen die von FRANKEN et al. (2001) beschriebenen Primer ISSag2-1 mit der Sequenz 5'-TGAAAGGTTTCTTGATAAACA-3' und

ISSag2-2 mit der Sequenz 5'-GTACGTCGTCACCTTCACCGATG-3' zum Einsatz. Der Mastermix wurde wie unter 3.3.4.1.2 beschrieben hergestellt.

Das anschließende Temperaturprogramm umfasste einen Denaturierungszyklus von 4 min bei 94 °C, gefolgt von 29 Zyklen: Denaturierung 1,0 min bei 95 °C, Primeranlagerung 1,0 min bei 58 °C und Polymerisierung 1,0 min bei 72 °C. Zur vollständigen Renaturierung der DNA schloss sich ein weiterer Zyklus von 5 min bei 72 °C an. Bis zur Entnahme verblieben die Proben bei 4 °C im Thermocycler.

3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, durchgeführt mit freundlicher Unterstützung von Dr. K. FAILING.

Die Bewertung der statistischen Signifikanten wurde mit dem verallgemeinerten Fisher-Test und dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Zur Bewertung der statistischen Signifikanten wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,001$ wurden als statistisch hoch signifikant, mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant und mit $p > 0,05$ als statistisch nicht signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung der Kulturen

Alle 101 untersuchten Streptokokkenkulturen der vorliegenden Untersuchungen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, waren grampositive, runde bis ovale Kokken, die in kettenförmiger Anordnung vorlagen. Nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten war bei 78 Kulturen (77,2 %) eine α -Hämolyse und bei 23 Kulturen (22,7 %) eine β -Hämolyse feststellbar.

Eine α -Hämolyse war bei 40 Kulturen (83,3 %) vom Hund, jeweils zwei Kulturen von der Katze (28,5 %), von Kaninchen (100 %), Meerschweinchen (100 %) und Affen (100 %), sechs Kulturen (85,7 %) vom Pferd, vier Kulturen (57,2 %) vom Nutria, fünf Kulturen (71,4 %) vom Schwein, neun Kulturen (90 %) vom Rind und sechs Kulturen (66,6 %) vom Menschen nachweisbar.

Eine β -Hämolyse war bei acht Kulturen (16,6 %) vom Hund, fünf Kulturen (71,5 %) von der Katze, einer Kultur (14,3 %) vom Pferd, drei Kulturen (42,8 %) vom Nutria, zwei Kulturen (28,5 %) vom Schwein, einer Kultur (10 %) vom Rind und drei Kulturen (33,3 %) vom Menschen feststellbar.

Die Kulturen bildeten nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C auf Schafblutagarplatten eine deutliche CAMP-Reaktion, d.h. eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse im Bereich des unvollständigen Staphylokokken- β -Hämolysins.

Alle 101 Kulturen (100 %) zeigten einen Abbau von Glucose, Maltose und Saccharose, jedoch keinen Abbau von Arabinose, Inulin, Mannit und Sorbit. trehalosepositiv waren 38 Kulturen (79,1 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, jeweils beide Kulturen (100 %) von Kaninchen, Meerschweinchen und Affe, alle sieben Kulturen (100 %), isoliert vom Pferd, vier Kulturen (57,4 %), isoliert vom Nutria, sechs Kulturen (85,7 %), isoliert

vom Schwein, acht Kulturen (80 %), isoliert vom Rind und neun Kulturen (100 %), isoliert vom Menschen. lactosepositiv erwiesen sich sieben Hundeisolate (14,5 %), drei Katzenisolate (42 %), eine Kultur (50 %), isoliert vom Kaninchen, keines der Meerschweinchen-, Nutria- und Affenisolate, eine Kultur (14,2 %), isoliert vom Pferd, drei Kulturen (42,8 %), isoliert vom Schwein, alle 10 Rinderisolate (100 %) und zwei Kulturen (22,2 %), isoliert vom Menschen. salicinpositiv waren 45 Kulturen (93,7 %), isoliert vom Hund, sieben Kulturen (100 %), isoliert von der Katze, jeweils beide Kulturen (100 %) von Kaninchen, Meerschweinchen und Affe, alle sieben Kulturen (100 %) isoliert vom Pferd, bzw. vom Nutria, sechs Kulturen (85,7 %), isoliert vom Schwein, sieben Kulturen (70 %), isoliert vom Rind und acht Kulturen (88,8 %), isoliert vom Menschen. Der Unterschied hinsichtlich des Lactoseabbauvermögens der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, erwies sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Alle 101 Streptokokkenkulturen (100 %) waren äsculinnegativ und Na-hippuratpositiv.

Eine Zusammenfassung des Hämolysevermögens und der biochemischen Eigenschaften der 101 Streptokokkenkulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Hämolyse und biochemische Eigenschaften der 101 *S. agalactiae*-Kulturen

Herkunft der Kulturen	n	Hämolyse		Abbau von:											
				Arabinose	Glucose	Inulin	Lactose	Maltose	Mannit	Saccharose	Salicin	Sorbit	Trehalose	Äsculin	Na-Hippurat
		α	β												
Hund	48	40*	8	0	48	0	7	48	0	48	45	0	38	0	48
Katze	7	2	5	0	7	0	3	7	0	7	7	0	6	0	7
Kaninchen	2	2	0	0	2	0	1	2	0	2	2	0	2	0	2
Meersch.	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	2	0	2	0	2
Affe	2	2	0	0	2	0	0	2	0	2	2	0	2	0	2
Pferd	7	6	1	0	7	0	1	7	0	7	7	0	7	0	7
Nutria	7	4	3	0	7	0	0	7	0	7	7	0	4	0	7
Schwein	7	5	2	0	7	0	3	7	0	7	6	0	6	0	7
Rind	10	9	1	0	10	0	10	10	0	10	7	0	8	0	10
Mensch	9	6	3	0	9	0	2	9	0	9	8	0	9	0	9
Σ	101	78	23	0	101	0	27	101	0	101	93	0	84	0	101

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

* = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

Die durch Autoklavieren gewonnenen Gruppenantigenpräparationen aller 101 untersuchten Streptokokkenkulturen reagierten in der Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony mit B-Streptokokken-spezifischem Antiserum. Aufgrund der kulturellen, biochemischen und serologischen Eigenschaften konnten alle untersuchten Isolate als Streptokokken der serologischen Gruppe B bzw. als *S. agalactiae* identifiziert werden.

Zur weiteren Identifizierung der B-Streptokokkenkulturen wurde die unter 3.3.4 beschriebene PCR-vermittelte Amplifizierung des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region und des CAMP-Faktor (*cfb*)-Gens durchgeführt. Die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens nach 3.3.4.1.2 mit den Oligonukleotidprimern AR1 und Am2 ergab bei allen untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1540 Bp. Nach Amplifizierung des 16S rRNA-Gens erfolgte eine Überprüfung der Spezifität der Amplikons durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *RsaI*. Der *RsaI*-Restriktionsverdau des 16S rRNA-Gens von *S. agalactiae* JCM 5671, ausgewählt aus der Gendatenbank (Gendatenbank-Zugangsnummer AB023574), wurde zunächst simuliert (3.3.4.1.3). Die mit dem Computerprogramm Clone Manager 4.0 ermittelten Schnittstellen sind der Abb. 3 zu entnehmen.

Die durch *RsaI*-Restriktionsverdau der 16S rRNA-Genamplifikate erhaltenen Restriktionsmuster aller 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen ergaben, entsprechend dem zuvor simulierten Restriktionsverdau, ein charakteristisches Fragmentmuster. Die *S. agalactiae*-Kulturen zeigten ein identisches Muster, das aus 4 Fragmenten mit einer Größe von 620, 350, 260 und 140 Bp bestand (Abb. 4).

Eine weitere PCR-vermittelte Identifizierung der *S. agalactiae* Kulturen war durch den Nachweis von speziesspezifischen Abschnitten des 16S rRNA-Gens möglich. Das Amplifikat von *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitten des 16S rRNA-Gens unter Verwendung der Oligonukleotidprimer agal I und agal II (3.3.4.2) wies bei allen untersuchten Kulturen eine einheitliche Größe von 1250 Bp auf (Abb. 5). Die Größe des PCR-Produkts der nach 3.3.4.3 mit den

S. agalactiae-spezifischen Oligonukleotidprimern STRA-AgI und STRA-AgII amplifizierten 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region betrug bei allen 101 B-Streptokokkenkulturen 290 Bp (Abb. 6). Im weiteren war das CAMP-Faktor Gen *cfb* nach 3.3.4.4 unter Verwendung der Oligonukleotidprimer camp 13 und clon 2 bei allen 101 Kulturen nachweisbar, dies mit einer Größe von 1020 Bp. (Abb. 7, Tabelle 3).

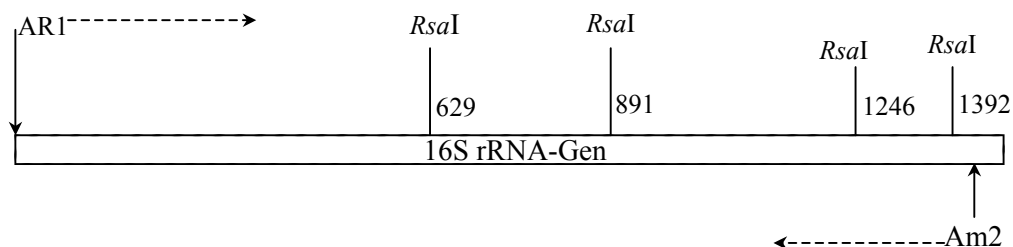


Abb. 3 Simulation des *RsaI*- Restriktionsverdau des 16S rRNA-Gens der *S. agalactiae* Kultur JCM 5671 (Gendatenbank-Zugangsnummer AB023574), ermittelt mit dem Computerprogramm Clone Manager 4.0. Die Ansatzstellen der Oligonukleotidprimer AR1 und AmII sind markiert.

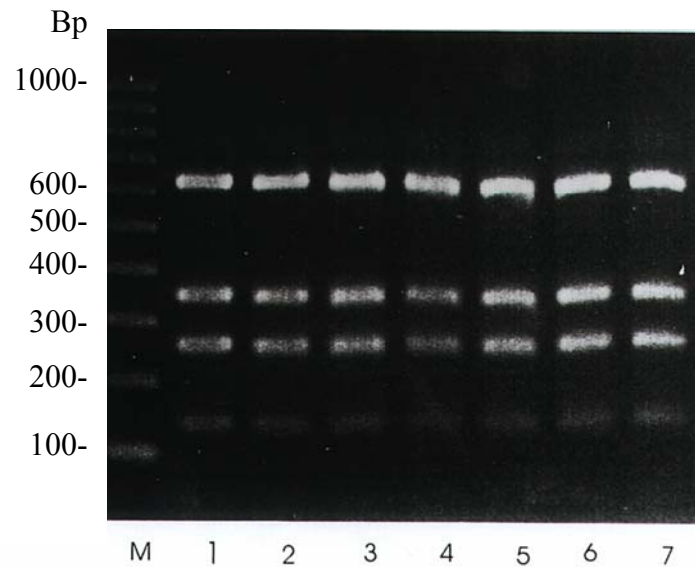


Abb. 4 Fragmentmuster des 16S rRNA-Gens von 7 *S. agalactiae*-Kulturen nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *RsaI*, M = Marker (100 Bp Molecular Ruler/EZ Load, Bio-Rad, München).

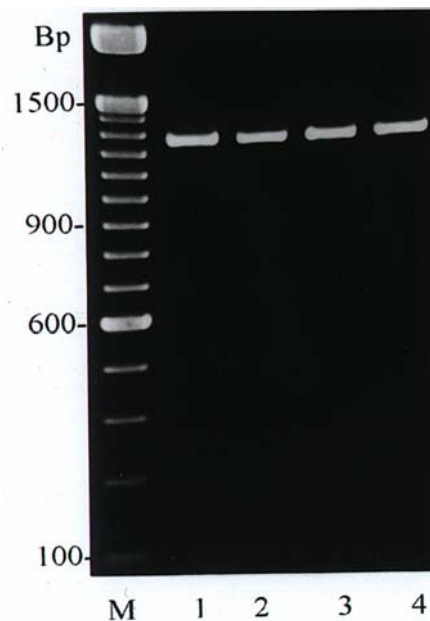


Abb. 5 Typisches Amplikon mit einer Größe von 1250 Bp eines *S. agalactiae*-spezifischen Abschnitts des 16S rRNA-Gens (1-4) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer *agal I* und *agal II*, M = Marker (100 Bp DNA Ladder, Gibco BRL, Eggenstein).

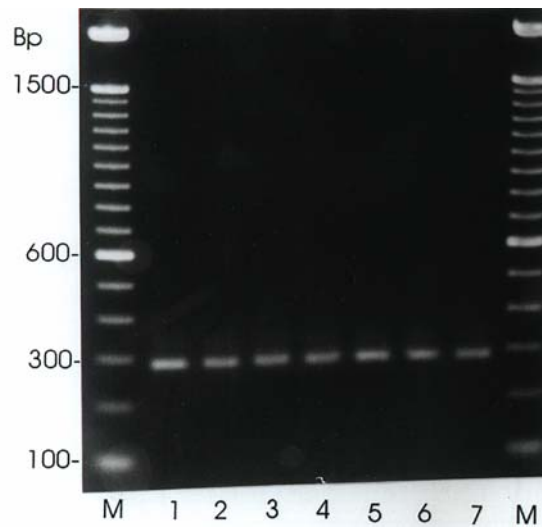


Abb. 6 Amplikons der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region von *S. agalactiae* (1-7) mit einer Größe von 290 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer STRA-AgI und STRA-AgII, M = siehe Abb. 5.

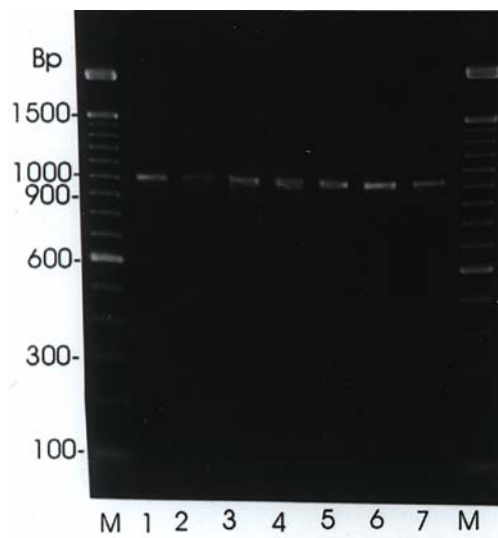


Abb. 7 Typisches Amplikon des CAMP-Faktor Gens *cfb* von *S. agalactiae* (1-7) mit einer Größe von 1020 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer camp 13 und clon 2, M = siehe Abb. 5.

Tabelle 3. PCR-Amplifizierung speziesspezifischer Genabschnitte der 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen

Herkunft der Kulturen	n	PCR-Zielgene		
		16S rDNA (1250 Bp)*	16S-23S rDNA „intergenic spacer“ (290 Bp)	CAMP Faktor <i>cfb</i> - Gen (1020 Bp)
Hund	48	48**	48	48
Katze	7	7	7	7
Kaninchen	2	2	2	2
Meersch.	2	2	2	2
Affe	2	2	2	2
Pferd	7	7	7	7
Nutria	7	7	7	7
Schwein	7	7	7	7
Rind	10	10	10	10
Mensch	9	9	9	9

n = Anzahl der Kulturen

* = Jeweilige Größe des Amplikons

** = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

4.2 Phäno- und genotypische Eigenschaften

4.2.1 Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung

Innerhalb der 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen konnten mit Hilfe der nach 3.4.1.2 absorbierten typenspezifischen Antiseren 97 Stämme (96 %) serotypisiert werden. Typische Präzipitationsreaktionen sind in Abb. 8 und 9 dargestellt.

Zur Bestätigung einiger der Ergebnisse der Serotypisierung wurden alle 101 *S. agalactiae*-Kulturen mittels PCR-Analysen untersucht. Dies erfolgte durch Nachweis der Gene *bag* und *rib*, welche die Proteinantigene c β bzw. Rib kodieren.

Die Spezifität des nach 3.4.2.2.1 entwickelten *rib*-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimers RibAK I konnte mit Hilfe der Internet-Sequenzdatenbank „GenBank“ geprüft werden (Tabelle 4). Eine positive *bag*-Gen-PCR konnte zunächst bei den Typenantigenreferenzkulturen 090 (Ia), H36B (Ib) und 70339 (c β) nachgewiesen werden. Die Referenzkultur 335 mit dem Proteinantigen c α sowie alle weiteren Referenzkulturen erwiesen sich als *bag*-Gen-negativ. Eine positive *rib*-Gen-PCR konnte bei den Typenantigenreferenzkulturen 18 RS 21 (II), 70339 (c β) und BS 30 (Rib) festgestellt werden. Die Referenzkultur Compton 25/60 mit Proteinantigen R sowie alle weiteren Referenzkulturen erwiesen sich als *rib*-Gen-negativ (Tabelle 5). Das Amplifikat des *bag*-Gens hatte eine einheitliche Größe von 650 Bp (Abb. 10), das Amplifikat des *rib*-Gens eine einheitliche Größe von 290 Bp. (Abb. 11).

Tabelle 4. Spezifität des Oligonukleotidprimers RibAK 1 zur Amplifizierung des *rib*-Gens von *S. agalactiae* im Vergleich mit einigen Sequenzen der Gendatenbank

Zugangsnummer	Zielgen	Sequenz des Primers (P) bzw. des Genoms (G)	
SAU 58333	<i>S. agalactiae rib-Gen</i> Größe = 3825 Bp	P: 1 gctgttacgttaaacaacaaatatga 25 G:256 gctgttacgttaaacaacaaatatga 280	25/25 ¹ (100 %)
AC 006610.1	<i>C. elegans Cosmid C30F12</i> Größe = 45867 Bp	P: 7 acgttaaacaacaaatat 23 G: 5748 acgttaaacaacaaatat 5732	17/17 (100 %)
L 23650.1	<i>C. elegans Cosmid C27D11</i> Größe = 9973 Bp	P: 7 acgttaaacaacaaatat 23 G: 3094 acgttaaacaacaaatat 3110	17/17 (100 %)
AL 3551734	Humane DNA Sequenz RP11-335P18 Größe = 165699 Bp	P: 2 tacgttaaacaacaaata 22 G:111920 tacgttaaacaacaaata 111904	17/17 (100 %)

¹ = Übereinstimmung (%)

Tabelle 5. PCR-vermittelte Amplifizierung der Gene *bag* (Proteinantigen cβ) und *rib* (Proteinantigen Rib) innerhalb der B-Streptokokkenreferenzkulturen

Zielgene	Referenzkulturen													
	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	R	Rib	X	cα	cβ
<i>bag</i>	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>rib</i>	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+

+ = Amplikon definierte Größe

– = Negative PCR



Abb. 8 Typische Präzipitationsreaktionen von Typenantigenpräparationen einer *S. agalactiae*-Kultur mit dem Serotypmuster III/Rib (a), isoliert vom Menschen und einer *S. agalactiae*-Kultur mit dem Serotyp V/R (b), isoliert vom Hund, mit absorbierten Antiseren gegen die Polysaccharidantigene III (1) und V (2) und absorbierten Antiseren gegen die Proteinantigene c β (3), X (4), R (5) und Rib (6).



Abb. 9 Typische Präzipitationsreaktionen von Typenantigenpräparationen einer *S. agalactiae*-Kultur Serotyp V/c β (c), isoliert vom Rind und einer *S. agalactiae*-Kultur mit Serotyp NT/X (d), isoliert vom Hund, mit absorbierten Antiseren gegen die Protein- und Polysaccharidantigene (siehe Abb. 8); NT = Nicht Typisierbar d. h. ein Polysaccharidantigen ist nicht nachweisbar.

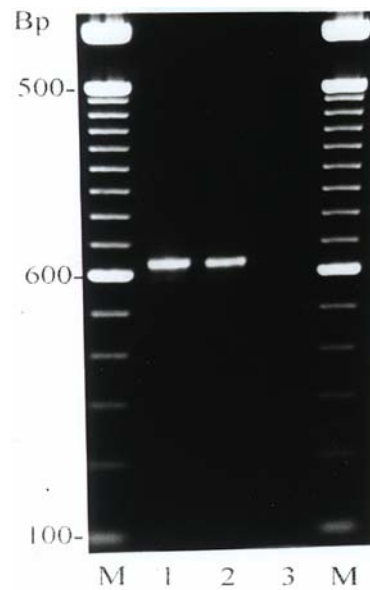


Abb. 10 Amplikons des *bag*-Gens (1, 2) mit einer Größe von 650 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer CBETA I und CBETA II; fehlende Reaktion eines Kontrollstammes (3), M = siehe Abb. 5.

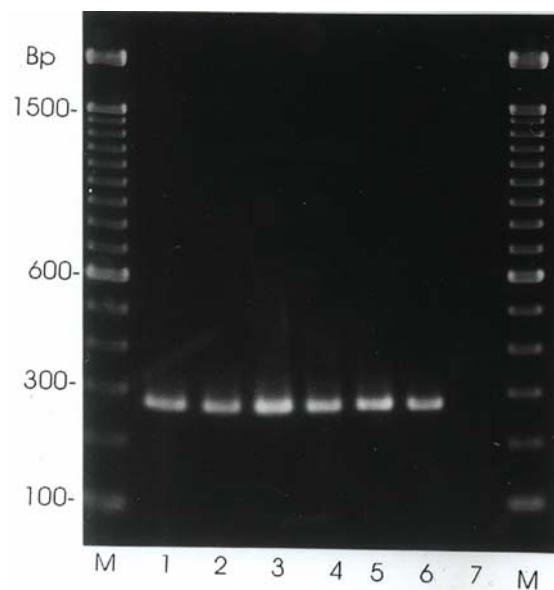


Abb. 11 Amplikons des *rib*-Gens (1-6) mit einer Größe von 290 Bp unter Verwendung der Oligonukleotidprimer RibAK 1 und RibAK 2; fehlende Reaktion eines Kontrollstammes (7), M = siehe Abb. 5.

Durch Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung war innerhalb der 48 B-Streptokokkenkulturen vom Hund das Typenantigenmuster III/Rib bei sechs Kulturen (12,5 %), das Polysaccharidantigen V ebenso bei sechs Kulturen (12,5 %), das Typenantigenmuster Ia/c α bei vier Kulturen (8,3 %), das Typenantigenmuster II/Rib bei drei Kulturen (6,2 %), das Polysaccharidantigen Ia bei drei Kulturen (6,2 %), das Proteinantigen Rib ohne gleichzeitiges Polysaccharidantigen NT/Rib bei drei Kulturen (6,2 %), das Typenantigenmuster Ia, Ib/c β ; Ia, Ib/c α , c β , und V/c β bei jeweils zwei Kulturen (je 4,1 %), die Polysaccharidantigene II, III und IV ebenfalls bei jeweils zwei Kulturen (je 4,1 %), das Antigenmuster NT/Rib, c β bei zwei Kulturen (4,1 %), das Typenantigenmuster Ia/c β ; Ib/c α ,c β ; II/c β ; II/R und III/ c β bei jeweils einer Kultur (je 2 %) und das Proteinantigen R ohne gleichzeitiges Polysaccharidantigen d. h. NT/R bei einer Kultur (2 %) feststellbar. Zwei Kulturen (4,1 %) waren nicht typisierbar.

Innerhalb der sieben B-Streptokokkenkulturen von der Katze war das Polysaccharidantigen Ia bei drei Kulturen (42,5 %), das Polysaccharidantigen III bei einer Kultur (14,2 %) und Typenantigenmuster Ia/c α ; II/R und III/Rib bei jeweils einer Kultur (14,2 %) feststellbar.

Die beiden B-Streptokokkenkulturen vom Kaninchen hatten die Typenantigenmuster Ib/c α ,c β und III/Rib, die beiden B-Streptokokkenkulturen vom Meerschweinchen die Polysaccharidantigene Ia und II bei jeweils einer Kultur (50 %) und die beiden B-Streptokokkenkulturen vom Affen das Typenantigenmuster Ia/Rib und das Polysaccharidantigen Ia bei jeweils einer Kultur (50 %).

Innerhalb der sieben B-Streptokokkenkulturen vom Pferd war das Typenantigenmuster III/Rib bei sechs Kulturen (85,7 %) und Ia/c β bei einer Kultur (14,2 %), innerhalb der sieben B-Streptokokkenkulturen vom Nutria das Typenantigenmuster Ia/c β bei drei Kulturen (42,8 %), das Polysaccharidantigen III bei zwei Kulturen (28,5 %) und das Typenantigenmuster II/c β und II/Rib bei

jeweils einer Kultur (je 14,2 %), innerhalb der sieben B-Streptokokkenkulturen vom Schwein das Typenantigenmuster III/Rib bei zwei Kulturen (28,5 %) und Ia/c α ,c β und II/c β bei einer Kultur (14,2 %) und das Polysaccharidantigen Ia und III bei jeweils einer Kultur (je 14,2 %) feststellbar. Eine Kultur (14,2 %) war nicht typisierbar.

Innerhalb der 10 B-Streptokokkenkulturen vom Rind war das Proteinantigen X ohne gleichzeitiges Polysaccharidantigen d. h. NT/X bei vier Kulturen (40 %), das Polysaccharidantigen IV bei drei Kulturen (30 %) und das Typenantigenmuster Ia/X bei zwei Kulturen (20 %) feststellbar. Eine Kultur (10 %) war nicht typisierbar.

Innerhalb der neun B-Streptokokkenkulturen vom Menschen war das Typenantigenmuster II/Rib bei zwei Kulturen (22,2 %) und Ia, Ib/c α , c β ; Ia/c α , c β ; II/c α , c β ; III/Rib; IV/c α und V/c α bei jeweils einer Kultur (je 11,1 %) und das Polysaccharidantigen III bei einer Kultur (11,1 %) feststellbar.

Bei sechs Kulturen die in der Immundiffusion keine Reaktion mit Proteinantigen c β -spezifischem Antiserum aufwiesen, war eine positive *bag*-Gen PCR nachweisbar. Im weiteren war bei fünf Kulturen, die keine Reaktion mit Proteinantigen Rib-spezifischem Antiserum aufwiesen, eine positive *rib*-Gen PCR feststellbar. Bei keiner der untersuchten 101 Kulturen konnten die Polysaccharidantigene VI, VII bzw. VIII festgestellt werden. In Tabelle 6 a, b, c und d sind die Ergebnisse der Serotypisierung und die Typisierungsergebnisse mittels PCR zusammengefasst.

Tabelle 6 a. Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterialien von Hund und Katze

Proteinantigene	Polysaccharidantigene								Σ
	Ia	Ib	II	III	IV	V	Ia, Ib	–	
–	6*		2	2	2	6		2	20
c α	5								5
c β	1		1	1 ⁽¹⁾		2	2		7
c α , c β		1 ⁽¹⁾					2		3
Rib			3 ^[3]	7				3	13
R			2			2		1	5
c β , Rib								2	2
Σ	12	1	8	10	2	10	4	8	55

* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Typenantigen bzw. der Typenantigenkombination

⁽¹⁾ = Bei einer Kultur Immundiffusion negativ, *bag*-Gen-PCR positiv

^[3] = Bei drei Kulturen Immundiffusion negativ, *rib*-Gen-PCR positiv

Tabelle 6 b. Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterialien von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein

Proteinantigene	Polysaccharidantigene					Σ
	Ia	Ib	II	III	–	
–	3*		1	3	1	8
c β	4		2 ⁽²⁾			6
Rib	1		1 ^[1]	9		11
c α , c β	1 ⁽¹⁾	1 ⁽¹⁾				2
Σ	9	1	4	12	1	27

* = siehe Tab 6 a

^{(1), (2)} = Bei einer bzw. zwei Kulturen Immundiffusion negativ, *bag*-Gen-PCR positiv

^[1] = Bei einer Kultur Immundiffusion negativ, *rib*-Gen-PCR positiv

Tabelle 6 c. Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterialien vom Rind

Proteinantigene	Polysaccharidantigene			Σ
	Ia	IV	–	
–	-	3	1	4
X	2*	-	4	6
Σ	2	3	5	10

* = siehe Tab 6 a

Tabelle 6 d. Serotypisierung und PCR-vermittelte Typisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterialien vom Menschen

Proteinantigene	Polysaccharidantigene					Σ
	Ia, Ib	II	III	IV	V	
–	-	-	1	-	-	1
c α	-	-	-	1	1	2
c α ,c β	2*	1	-	-	-	3
Rib	-	2 ^[1]	1	-	-	3
Σ	2	3	2	1	1	9

* = siehe Tab 6 a

^[1] = Bei einer Kultur Immundiffusion negativ, *rib*-Gen-PCR positiv

4.2.2 Pigmentbildung

Nach Anzüchtung der B-Streptokokkenkulturen (siehe 3.4.6) in GBS-Islam-Agar zeigten 10 Kulturen (20,8 %) vom Hund, drei Kulturen (42,8 %) von der Katze, eine Kultur (50 %) vom Kaninchen, zwei Kulturen (100 %) vom Meerschweinchen, eine Kultur (50 %) vom Affen, zwei Kulturen (28,5 %) vom Nutria, eine Kultur (14,2 %) vom Schwein, eine Kultur (10 %) vom Rind und vier Kulturen (44,4 %) vom Menschen rote Pigmentierungen und 24 Kulturen (50 %) vom Hund, drei Kulturen (42,8 %) von der Katze, eine Kultur (50 %) vom Kaninchen, sechs Kulturen (85,7 %) vom Pferd, fünf Kulturen (71,4 %) vom Nutria, vier Kulturen (57,1 %) vom Schwein, eine Kultur (10 %) vom Rind und fünf Kulturen (55,5 %) vom Menschen eine orangefarbene Pigmentierung. Ferner zeigten sechs Kulturen (12,5 %) vom Hund, jeweils eine Kultur (14,2 %) von der Katze und vom Pferd, jeweils zwei Kulturen von Schwein (28,5 %) und Rind (20 %) gelbe Pigmentierungen. Acht Kulturen (16,6 %) vom Hund, eine Kultur (50 %) vom Affen, eine Kultur (14,2 %) vom Nutria und sechs Kulturen (60 %) vom Rind waren unpigmentiert. Die Beziehung zwischen der Pigmentbildung und der Herkunft der Kulturen erwies sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$) (Tabelle 7).

Tabelle 7. Pigmentbildung der B-Streptokokkenkulturen unterschiedlicher Herkunft in GBS Islam Agar

Herkunft der Kulturen	n	Pigmentierung			
		+++	++	+	–
Hund	48	10*	24	6	8
Katze	7	3	3	1	0
Kaninchen	2	1	1	0	0
Meerschw.	2	2	0	0	0
Affe	2	1	0	0	1
Pferd	7	0	6	1	0
Nutria	7	2	4	0	1
Schwein	7	1	4	2	0
Rind	10	1	1	2	6
Mensch	9	4	5	0	0
Σ	101	25	48	12	16

$p \leq 0,001$

n = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen

* = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

+++ = rote Pigmentierung

++ = orangefarbene Pigmentierung

+ = gelbe Pigmentierung

– = keine Pigmentierung

4.2.3 Ermittlung der Kettenlänge und Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium und Soft-Agar

Alle nach 3.4.4 gramgefärbten 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen lagen überwiegend in kettenförmiger Anordnung vor. Die vom Rind isolierten Kulturen wiesen dabei überwiegend lange Ketten (≥ 20 Kokken) auf. Die Kulturen, die von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch isoliert worden waren, wiesen dagegen überwiegend kurze Ketten (< 20 Kokken) auf.

In Flüssigmedium (3.4.4) zeigten 11 Kulturen (22,9 %) vom Hund, jeweils eine Kultur (50 %) von Kaninchen und Meerschweinchen, zwei Kulturen (28,5 %) vom Nutria, eine Kultur (14,2 %) vom Schwein, acht Kulturen (80 %) vom Rind und drei Kulturen (33,3 %) vom Menschen ein Wachstum mit wattigem bis körnigem Bodensatz und klarem Überstand. Im Gegensatz dazu wuchsen 37 Kulturen (77 %) vom Hund, sieben Kulturen (100 %) von der Katze, jeweils eine Kultur (50 %) vom Kaninchen und Meerschweinchen, zwei Kulturen (100 %) vom Affen, sieben Kulturen (100 %) vom Pferd, fünf Kulturen (71,4 %) vom Nutria, sechs Kulturen (85,7 %) vom Schwein, zwei Kulturen (20 %) vom Rind und sechs Kulturen (66,6 %) vom Menschen unter gleichmäßiger Trübung des Flüssigmediums. Nach Anzüchtung der B-Streptokokkenkulturen in Soft-Agar (siehe 3.4.5) wiesen 11 Kulturen (22,9 %) vom Hund, jeweils eine Kultur (50 %) vom Kaninchen und Meerschweinchen, zwei Kulturen (28,5 %) vom Nutria, eine Kultur (14,2 %) vom Schwein, acht Kulturen (80 %) vom Rind und drei Kulturen (33,3 %) vom Menschen eine kompakte Koloniemorphologie auf; 37 Kulturen (77 %) vom Hund, sieben Kulturen (100 %) von der Katze, jeweils eine Kultur (50 %) von Kaninchen und Meerschweinchen, zwei Kulturen (100 %) vom Affen, sieben Kulturen (100 %) vom Pferd, fünf Kulturen (71,4 %) vom Nutria, sechs Kulturen (85,7 %) vom Schwein, zwei Kulturen (20 %) vom Rind und sechs Kulturen (66,6 %) vom Menschen bildeten dagegen diffuse Kolonien (Abb. 12). Die Unterschiede zwischen der Kettenlänge, den Wachstumsformen

in Flüssigmedium sowie Soft-Agar und der Herkunft der Kulturen erwiesen sich als hoch signifikant. Die Beziehungen zwischen der Kettenlänge, den Wachstumsformen der B-Streptokokkenkulturen in Flüssigmedium sowie Soft-Agar ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. Kettenlänge und Wachstumseigenschaften der untersuchten B-Streptokokkenkulturen in Flüssigmedium und Soft-Agar

Herkunft der Kulturen	n	Kettenlänge		Wachstums- eigenschaften in Flüssigmedium		Wachstums- eigenschaften in Soft-Agar	
		≥20*	<20*	klar	trüb	kompakt	diffus
Hund	48	12**	36	11	37	11	37
Katze	7	0	7	0	7	0	7
Kaninchen	2	1	1	1	1	1	1
Meersch.	2	0	2	1	1	1	1
Affe	2	0	2	0	2	0	2
Pferd	7	0	2	0	7	0	7
Nutria	7	1	6	2	5	2	5
Schwein	7	2	5	1	6	1	6
Rind	10	8	2	8	2	8	2
Mensch	9	3	6	3	6	3	6

$p \leq 0,001$

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

* = Anzahl an Kokken pro Kette; arithmetisches Mittel aus fünf Blickfeldern

** = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

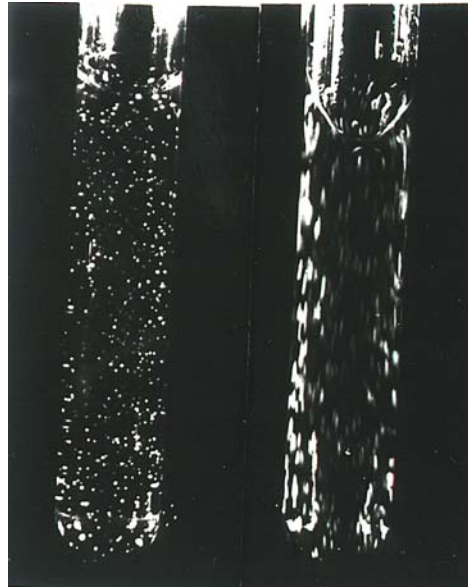


Abb. 12 Charakteristisches Wachstum von *S. agalactiae* in Soft-Agar nach 18 h Bebrütung bei 37 ° C mit kompakten (links) und diffusen (rechts) Kolonien.

4.2.4 Salz-Aggregationstest und Adhäsion an DEAE- Sephacel

Bei der Untersuchung der 101 B-Streptokokkenkulturen im Salz-Aggregationstest (siehe 3.4.7) aggregierten fünf Kulturen (10,4 %) vom Hund, jeweils eine Kultur (14,2 %) von Nutria und Schwein und sieben Kulturen (70 %) vom Rind bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1,5 mol/l und 11 Kulturen (22,9 %) vom Hund, eine Kultur (14,2 %) von der Katze, sechs Kulturen (85,7 %) vom Pferd, jeweils vier Kulturen (57,1 %) von Nutria und Schwein und jeweils eine Kultur von Rind (10 %) und Mensch (11,1 %) bei einer Ammonium-sulfatkonzentration von 2,0 mol/l. Im weiteren aggregierten 32 Kulturen (66,6 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, jeweils zwei Kulturen (100 %) von Kaninchen, Meerschweinchen und Affen, eine Kultur (14,2 %) vom Pferd, jeweils zwei Kulturen von Nutria, Schwein (28,5 %) und

Rind (20 %) und acht Kulturen (88,8 %) vom Menschen bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 2,5 mol/l.

Die 101 B-Streptokokkenkulturen wurden ferner hinsichtlich ihrer Adhäsion an die Ionenaustauschmatrix DEAE-Sephacel (3.4.8) untersucht. Dabei zeigten 30 Kulturen (62,5 %) vom Hund, jeweils alle Kulturen von der Katze, von Kaninchen und Meerschweinchen, eine Kultur (50 %) vom Affen, alle Kulturen vom Pferd, zwei Kulturen (28,5 %) vom Nutria, vier Kulturen (57,1 %) vom Schwein, eine Kultur (10 %) vom Rind und sechs Kulturen (66,6 %) vom Menschen eine geringere Adhärenz (<70 %) an DEAE-Sephacel. Bei allen übrigen Kulturen von Hund, Affe, Nutria, Schwein, Rind und Mensch war eine vermehrte Adhäsion (≥ 70 %) an DEAE-Sephacel feststellbar.

Die Beziehungen zwischen den Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium, der Kettenlänge, den Wachstumseigenschaften in Soft-Agar, dem Verhalten im Salz-Aggregationstest und der Adhäsion an DEAE-Sephacel sind in Tabelle 9 dargestellt. Als Kontrollstämme dienten die beiden B-Streptokokkenkulturen COH 1 und COH 1-11 (Tabelle 10).

Tabelle 9. Beziehungen zwischen den Wachstumseigenschaften der 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen in Flüssigmedium (THB), der Kettenlänge, den Wachstumseigenschaften der Kulturen in Soft-Agar, dem Verhalten im Salz-Aggregationstest und der Adhäsion an DEAE-Sephacel

Herkunft der Kulturen	Wachstum in THB	n	Kettenlänge		Wachstum in Soft-Agar		Salz-Aggregations-test**			DEAE-Sephacel Ionenaustauschr.	
			≥20	<20	kompakt	diffus	1,5	2	2,5	≥70 %	<70 %
Hund	klar	11	11*	0	10	1	3	3	5	5	6
	trüb	37	1	36	1	36	2	8	27	13	24
Katze	klar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	trüb	7	0	7	0	7	0	1	6	0	7
Kaninchen	klar	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
	trüb	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Meersch.	klar	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	trüb	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Affe	klar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	trüb	2	0	2	0	2	0	0	2	1	1
Pferd	klar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	trüb	7	0	7	0	7	0	6	1	0	7
Nutria	klar	2	1	1	2	0	1	1	0	2	0
	trüb	5	0	5	0	5	0	3	2	3	2
Schwein	klar	1	0	1	2	0	0	1	0	1	0
	trüb	6	1	5	0	5	1	3	2	2	4
Rind	klar	8	8	0	8	0	6	1	1	7	1
	trüb	2	0	2	0	2	1	0	1	2	0
Mensch	klar	3	2	1	3	0	0	0	3	2	1
	trüb	6	0	6	0	6	0	1	5	1	5

$p \leq 0,001$

n = Anzahl der *S. agalactiae*-Kulturen

* = Anzahl der Kulturen mit den jeweiligen Eigenschaften

** = Aggregationsreaktion in Ammoniumsulfat (mol/l)

Tabelle 10. Eigenschaften der B-Streptokokken-Kontrollstämme COH 1-11 und COH 1 hinsichtlich ihrer Kettenlänge, ihrer Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium (THB) und Soft-Agar, dem Verhalten im Salz-Aggregationstest und der Adhäsion an DEAE- Sephacel

Kontroll- stämme	Kettenlänge	Wachstum		Salz- Aggregationstest**	Adhäsion an DEAE-Sephacel
		in THB	in Soft-Agar		
COH 1-11	>20	klar	kompakt	1.5 mol/l	>70 %
COH 1	<20	trüb	diffus	2.5 mol/l	<70 %

** = siehe Tabelle 9

4.2.5 Nachweis von hämagglutinierenden Eigenschaften

Innerhalb der 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen zeigten sieben der 10 Kulturen, isoliert vom Rind, eine Hämagglutinationsreaktion. Dabei wiesen drei Isolate eine ausgeprägte (++) und vier Isolate eine deutliche nachweisbare (+) Hämagglutinationsreaktion mit Erythrozytensuspensionen von Kaninchen und Schaf auf. Fünf Isolate (50 %) vom Rind wiesen ferner eine deutliche Hämagglutinationsreaktion (+) mit Erythrozytensuspensionen vom Menschen auf. Bei allen übrigen Kulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch waren mit Erythrozyten von Kaninchen, Schaf und Mensch keine Hämagglutinationsreaktionen feststellbar. Die Beziehungen zwischen dem

Hämagglutinationsreaktionen und der Herkunft der Kulturen erwies sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Als Kontrollstämme dienten die hämagglutinationspositive B-Streptokokkenkultur 395/2 und die hämagglutinationsnegative Kultur G 28.

4.2.6 Nachweis von Antibiotikaempfindlichkeiten

Die Antibiotikaempfindlichkeiten der untersuchten B-Streptokokkenkulturen ist in Tabelle 11a und 11b dargestellt. Alle 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch erwiesen sich als empfindlich gegenüber Oxacillin.

Eine Resistenz gegenüber Cefoxitin war bei vier Kulturen (4,8 %), gegenüber Clindamycin bei 12 Kulturen (14,6 %), gegenüber Erythromycin bei 13 Kulturen (15,8 %), gegenüber Gentamicin bei 82 Kulturen (81,1 %), gegenüber Minocyclin bei 54 Kulturen (53,4 %), gegenüber Polymyxin B bei 90 Kulturen (89,1 %) und gegenüber Tetracyclin bei 66 Kulturen (65,3 %) feststellbar.

Die verbliebenen Kulturen erwiesen sich als intermediär bzw. empfindlich gegenüber den jeweiligen Antibiotika.

Die Beziehung zwischen der Minocyclin- und Tetracyclinempfindlichkeit und der Herkunft der Kulturen erwies sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Tabelle 11 a. Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von B-Streptokokken, isoliert von Hund und Katze (n= 55), sowie von den weiteren Tierarten: Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein (n =27)

Antibiotika	B-Streptokokken, isoliert von Hund und Katze (n = 55)		
	resistent	intermediär	empfindlich
Bacitracin	0*	14	41
Cefoxitin	4	9	42
Clindamycin	6	2	47
Erythromycin	7	7	41
Gentamicin	47	8	0
Minocyclin	37	14	4
Oxacillin	0	0	55
Penicillin G	0	5	50
Polymyxin B	50	5	0
Tetracyclin	44	11	0
Antibiotika	B-Streptokokken, isoliert von weiteren Tierarten (n = 27)		
	resistent	intermediär	empfindlich
Bacitracin	0	2	25
Cefoxitin	0	2	25
Clindamycin	6	1	20
Erythromycin	6	3	18
Gentamicin	17	10	0
Minocyclin	12	6	9
Oxacillin	0	0	27
Penicillin G	0	3	24
Polymyxin B	21	6	0
Tetracyclin	15	11	1

n = Anzahl der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

Tabelle 11 b. Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von B-Streptokokken, isoliert von Rind (n = 10) und Mensch (n = 9)

Antibiotika	B-Streptokokken, isoliert vom Rind (n = 10)		
	resistent	intermediär	empfindlich
Bacitracin	0	0	10
Cefoxitin	0	0	10
Clindamycin	0	0	10
Erythromycin	0	2	8
Gentamicin	9	1	0
Minocyclin	0	0	10
Oxacillin	0	0	10
Penicillin G	0	1	9
Polymyxin B	10	0	0
Tetracyclin	0	2	8
Antibiotika	B-Streptokokken, isoliert vom Mensch (n = 9)		
	resistent	intermediär	empfindlich
Bacitracin	0*	0	9
Cefoxitin	0	2	7
Clindamycin	1	0	8
Erythromycin	0	3	6
Gentamicin	9	0	0
Minocyclin	5	2	2
Oxacillin	0	0	9
Penicillin G	0	0	9
Polymyxin B	9	0	0
Tetracyclin	7	2	0

n, * = Siehe Tabelle 11 a.

4.2.7 Nachweis des Enzyms Hyaluronidase bzw. des Hyaluronidase-Gens *hylB* und des Insertionselements IS 1548

Mit Hilfe des nach 3.4.11.1 durchgeführten Dekapsulationstests konnte das Enzym Hyaluronidase bei 40 Kulturen (83,3 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, jeweils zwei Kulturen (100 %) von Meerschweinchen und Affe, einer Kultur (14,2 %) vom Pferd, jeweils sieben Kulturen (100 %) von Nutria und Schwein, 10 Kulturen (100 %) vom Rind und sieben Kulturen (77,7 %) vom Menschen nachgewiesen werden. Bei allen übrigen Kulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch war das Enzym Hyaluronidase nicht feststellbar, d. h. es war keine Hemmung des mukoiden Wachstums, der *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur nachzuweisen.

Im weiteren erfolgte der PCR-vermittelte Nachweis des Hyaluronidase-Gens *hylB* und des Insertionselement IS1548. Die Spezifität des nach 3.4.11.3.1 entwickelten Insertionselement IS 1548-spezifischen Oligonukleotidprimers IS-I konnte mit Hilfe der Internet-Sequenzdatenbank „GenBank“ geprüft werden (Tabelle 12).

Tabelle 12. Spezifität des Oligonukleotidprimers IS-I von *S. agalactiae* im Vergleich mit einigen Sequenzen der Gendatenbank.

Zugangsnummer	Zielsequenz	Sequenz des Primers (P) bzw. des Genoms (G)	
Y 14270.1	<i>S. agalactiae</i> - Insertionselement Größe = 1679 Bp	P: 1 gttgatttgagtgaagggtg 20 G: 310 gttgatttgagtgaagggtg 329	20/20 ¹ (100 %)
AC 007161.1	Homo sapiens BAC Klon GS1- 165B14 Größe = 109343 Bp	P: 1 gttgatttgagtgaag 16 G: 95501 gttgatttgagtgaag 95516	16/16 (100 %)
AC 004554.1	Homo sapiens BAC Klon CTA- 348C20 Größe = 92611 Bp	P: 4 gatttgagtgaagggtt 19 G: 37249 gatttgagtgaagggtt 37234	16/16 (100 %)
U 80061.1	Homo sapiens Xp22 BAC GSHB- 590J6 Größe = 195142 Bp	P: 1 gttgatttgagtgaag 16 G: 192506 gttgatttgagtgaag 192491	16/16 (100 %)

¹ = Übereinstimmung (%)

Innerhalb der 40 phänotypisch hyaluronidasepositiven Kulturen vom Hund konnten bei 39 Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb und bei der verbleibenden Kultur ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb nachgewiesen werden. Innerhalb der acht phänotypisch hyaluronidasenegativen Kulturen konnte bei allen acht Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb nachgewiesen werden (Abb. 13). Bei den neun Kulturen mit einem *hylB*-Amplikon von 4,6 Kb konnte im weiteren das Insertionselement IS 1548 mit einer Größe von 980 Bp amplifiziert werden (Abb. 14).

Innerhalb der sechs phänotypisch hyaluronidasepositiven Kulturen von der Katze konnten bei allen sechs Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb, bei der phänotypisch hyaluronidasenegativen Kultur, isoliert von der Katze, ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb nachgewiesen werden.

Bei der einen Kultur mit einem *hylB*-Amplikon von 4,6 Kb konnte im weiteren das Insertionselement IS 1548 mit einer Größe von 980 Bp amplifiziert werden.

Innerhalb der zwei phänotypisch hyaluronidasenegativen Kulturen vom Kaninchen konnten bei einer Kultur ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb und bei der anderen Kultur ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb nachgewiesen werden. Bei der einen Kultur mit einem *hylB*-Amplikon von 4,6 Kb konnte außerdem das Insertionselement IS 1548 mit einer Größe von 980 Bp amplifiziert werden.

Innerhalb der jeweils zwei phänotypisch hyaluronidasepositiven Kulturen vom Meerschweinchen und Affen konnte bei jeweils beiden Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb nachgewiesen werden.

Die phänotypisch hyaluronidasepositive Kultur vom Pferd wies ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb auf, die sechs phänotypisch hyaluronidasenegativen Kulturen, isoliert vom Pferd, ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb. Bei den sechs Kulturen mit einem *hylB*-Amplikon von 4,6 Kb konnte ferner das Insertionselement IS 1548 mit einer Größe von 980 Bp amplifiziert werden.

Innerhalb der jeweils sieben phänotypisch Hyaluronidase-positiven Kulturen von Nutria und Schwein konnten bei jeweils sieben Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb nachgewiesen werden.

Innerhalb der 10 phänotypisch hyaluronidasepositiven Kulturen vom Rind wurde bei allen 10 Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb nachgewiesen.

Innerhalb der sieben phänotypisch hyaluronidasepositiven Kulturen vom Menschen konnte bei sieben Kulturen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb, innerhalb der zwei phänotypisch hyaluronidasenegativen Kulturen, isoliert vom Menschen, wies eine Kultur ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb und eine Kultur ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb auf. Bei der einen Kultur mit einem *hylB*-Amplikon von 4,6 Kb wurde im weiteren das Insertionselement IS 1548 mit einer Größe von 980 Bp amplifiziert.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse des Dekapsulationstests, der Nachweis des Hyaluronidase-Gens *hylB* und des Insertionselementes IS 1548 zusammenfassend dargestellt.

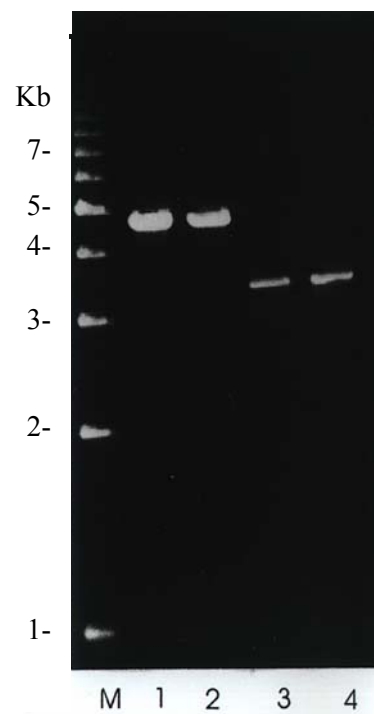


Abb. 13 Typisches Amplikon des Hyaluronidase-Gens *hylB* von *S. agalactiae* mit einer Größe von 4,6 Kb (1, 2) und einer Größe von 3,3 Kb (3, 4) unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Hyl 7 und Hyl 2, M = Marker (1 Kb Molecular Ruler/EZ Load, Bio-Rad).

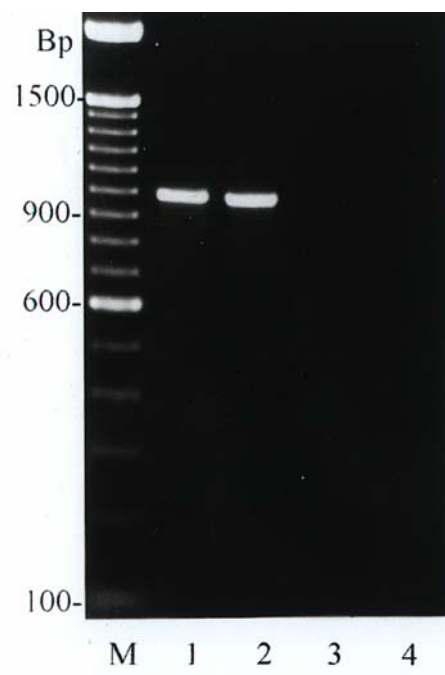


Abb. 14 Amplikon des Insertionselementes *I548* von *S. agalactiae* mit einer Größe von 980 Bp unter Verwendung der insertionselementspezifischen Primer IS-I und IS-II (1, 2); fehlende Reaktion von Kontrollstämmen (3, 4), M = siehe Abb. 5.

Tabelle 13. Beziehungen zwischen dem Nachweis des Enzyms Hyaluronidase und den PCR-Analysen des *hylB*-Gens sowie des Insertionselementes *I548* innerhalb der 101 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

Herkunft der Kulturen	Nachweis des Enzyms Hyaluronidase	<i>hylB</i> -Gen		Insertionselement <i>I548</i> (0,98 Kb)
		3,3 Kb**	4,6 Kb	
Hund	+ (40*)	39	–	–
		–	1	1
	– (8)	–	8	8
Katze	+ (6)	6	–	–
	– (1)	–	1	1
Kaninchen	+ (0)	–	–	–
	– (2)	–	1	–
		–	1	1
Meerschw.	+ (2)	2	–	–
	– (0)	–	–	–
Affe	+ (2)	2	–	–
	– (0)	–	–	–
Pferd	+ (1)	1	–	–
	– (6)	–	6	6
Nutria	+ (7)	7	–	–
	– (0)	–	–	–
Schwein	+ (7)	7	–	–
	– (0)	–	–	–
Rind	+ (10)	10	–	–
	– (0)	–	–	–
Mensch	+ (7)	7	–	–
	– (2)	1	–	–
		–	1	1

* = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

** = Jeweilige Größe des Amplikons

4.2.8 Nachweis von weiteren mutmaßlichen Virulenzgenen und dem Insertionselement ISSag

Mit den unter 3.5.1 beschriebenen Oligonukleotidprimern C5a-1 und C5a-2 konnte bei 41 Kulturen (85,4 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, beiden Kulturen (100 %) vom Kaninchen, einer Kultur (50 %) vom Meerschweinchen, sieben Kulturen (100 %) vom Pferd, jeweils zwei Kulturen von Schwein (28,5 %) und Rind (20 %) und bei neun Kulturen (100 %) vom Menschen das *scpB*-Gen mit einer Größe von 3,3 Kb nachgewiesen werden (Abb. 15).

Mit den unter 3.5.2 beschriebenen Oligonukleotidprimern Lmb-1 und Lmb-2 wurde bei 44 Kulturen (91,6 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, jeweils zwei Kulturen (100 %) vom Kaninchen und vom Meerschweinchen, bei einer Kultur (50 %) vom Affen, sieben Kulturen (100 %) vom Pferd, jeweils zwei Kulturen von Schwein (28,5 %) und Rind (20 %) und neun Kulturen (100 %) vom Menschen das *lmb* -Gen mit einer Größe von 3,3 Kb nachgewiesen (Abb. 15).

Die Analyse des Insertionselements ISSag (3.5.3) führte bei Verwendung der Oligonukleotidprimer ISSag2-1 und ISSag2-2 bei 46 Kulturen (95,8 %) vom Hund, sechs Kulturen (85,7 %) von der Katze, jeweils zwei Kulturen (100 %) von Kaninchen und Meerschweinchen, einer Kultur (50 %) vom Affen, sieben Kulturen (100 %) vom Pferd, jeweils zwei Kulturen (28,5 %) von Nutria und Schwein und jeweils acht Kulturen von Rind (80 %) und Mensch (88,8 %) zum Nachweis eines 980 Bp großen Amplikons (Abb. 16). Die Beziehung zwischen dem Auftreten des C5a-Peptidase-Gens *scpB*, des Laminin-bindenden Protein-Gens *lmb* und des Insertionselements ISSag sowie der Herkunft der Kulturen erwies sich als hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

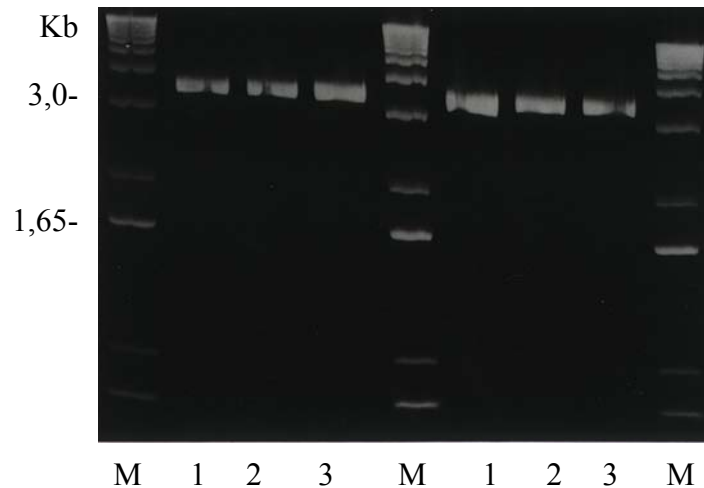


Abb. 15 Amplikon des *scpB*-Gens von *S. agalactiae* mit einer Größe von 3,3 Kb unter Verwendung der Oligonukleotidprimer C5a-1 und C5a-2 (links 1, 2, 3) und des *lmb*-Gens, ebenso mit einer Größe von 3,3 Kb, unter Verwendung der Oligonukleotidprimer Lmb-1 und Lmb-2 (rechts 1, 2, 3), M= Marker (1 Kb, Gibco)

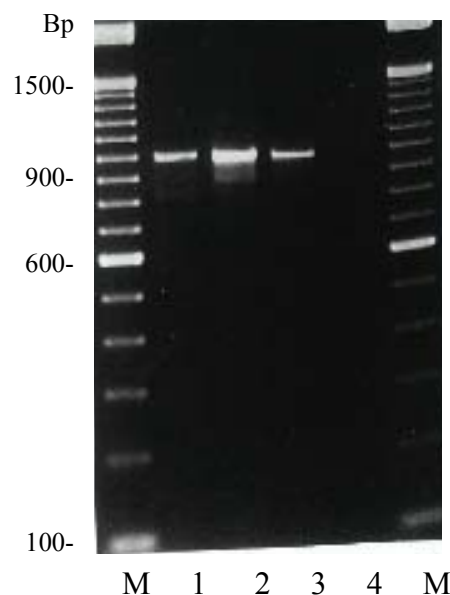


Abb. 16 Typisches Amplikon des Insertionselementes ISSag mit einer Größe von 0,98 Kb unter Verwendung der Oligonukleotidprimer ISSag2-1 und ISSag2-2; fehlende Reaktion von Kontrollstämmen (4), M = siehe Abb. 5.

Tabelle 14. Nachweis der Gene *scpB* und *lmb* und des Insertionselements ISSag innerhalb der 101 untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen

Herkunft der Kulturen	n	<i>scpB</i> -Gen (3,3 Kb)*	<i>lmb</i> -Gen (3,3 Kb)	Insertionselement ISSag (0,98 Kb)
Hund	48	41**	44	46
Katze	7	6	6	6
Kaninchen	2	2	2	2
Meerschw.	2	1	2	2
Affe	2	0	1	1
Pferd	7	7	7	7
Nutria	7	0	0	2
Schwein	7	2	2	2
Rind	10	2	2	8
Mensch	9	9	9	8

$p \leq 0,001$

n = Anzahl der Kulturen

* = Jeweilige Größe des Amplikons

** = Anzahl der Kulturen mit dem jeweiligen Merkmal

Eine zusammenfassende Darstellung einiger phäno- und genotypischer Eigenschaften, die bei der überwiegenden Zahl der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch nachweisbar waren, ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Einige phäno- und genotypische Eigenschaften, die bei der überwiegenden Zahl der B-Streptokokkenkulturen unterschiedlicher Herkunft nachzuweisen waren.

Herkunft der Kulturen	Phänotypische Eigenschaften											Genotypische Eigenschaften	
	Lactose- abbau	Häufigste Typenantigenmuster	Ketten- länge	Pigment- bildung	Wachstum		Salz- Aggregation (mol/l)	Adhäsion an DEAE- Sephacel	Hämagglu- tinations- reaktion	Antibiotika- empfindlichkeit			
					in THB	in Soft-Agar				Mino- cyclin	Tetra- cyclin	<i>scpB</i> - Gen	<i>lmb</i> - Gen
Hund	–	III/Rib, Ia/cα	<20	++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	R	R	+	+
Katze	–	III/Rib, Ia/cα	<20	++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	R	R	+	+
Kanin- chen	–	III/Rib, Ib/cα	<20	++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	I	R	+	+
Meersch.	–	Ia, II	<20	+++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	R	R	+	+
Affe	–	Ia/Rib, Ia	<20	+++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	I	I	–	+
Pferd	–	III/Rib, Ia/cβ	<20	++	trüb	diffus	2,0	<70%	–	R	I	+	+
Nutria	–	Ia/cβ	<20	++	trüb	diffus	2,0	≥70%	–	E	I	–	–
Schwein	–	III/Rib, Ia/cα	<20	++	trüb	diffus	2,0	<70%	–	R	R	–	–
Rind	+	Ia/X, NT/X	>20	–	klar	kompakt	1,5	≥70%	+	E	E	–	–
Mensch	–	III/ Rib Ia/ cα,	<20	++	trüb	diffus	2,5	<70%	–	R	R	+	+

E = Empfindlich,

R = Resistent

I = Intermediär

5. Diskussion

Aufgrund kultureller, biochemischer und serologischer Untersuchungen konnten alle 101 Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, als *Streptococcus agalactiae* und der serologischen Lancefield Gruppe B zugeordnet werden. Nach Anzüchtung auf Schafblutagarplatten wuchs die überwiegende Zahl der Kulturen (77,2 %) unter Ausbildung einer α -Hämolyse, einige Kulturen (22,7 %) unter Ausbildung einer β -Hämolyse. *S. agalactiae* wächst auf Schafblutagarplatten unter Ausbildung einer α -, β - oder γ -Hämolyse (SELBITZ 1992, LÄMMLER und HAHN 1994, NIZET et al. 1996). LÜTTICKEN et al. (1988) und CONDRAD et al. (1991) gelang die Klonierung und Sequenzierung der genetischen Determinanten, die die Hämolysinbildung kodieren. Nach ROSS et al. (1984) wurde eine β -Hämolyse vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen, eine α - und γ -Hämolyse vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, nachgewiesen. Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte bei den Kulturen der vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu der β -Hämolyse anderer Streptokokkenarten handelt es sich bei B-Streptokokken meist um eine schwach ausgeprägte, vollständige bzw. β -Hämolyse (MARCHLEWICZ und DUNCAN 1980, ROTTA 1986).

Als charakteristische Eigenschaft der B-Streptokokken erwies sich im weiteren die positive CAMP-Reaktion, die nach den Anfangsbuchstaben der Erstbeschreiber CHRISTIE, ATKINS, MUNCH-PETERSEN (1944) bezeichnet wird. Bei dieser Reaktion bildet der CAMP-Faktor von Streptokokken der serologischen Gruppe B im Bereich der unvollständigen Staphylokokken- β -Hämolyse eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse. Die CAMP-Reaktion wird auf die synergistische Wirkung des Staphylokokken- β -Toxins, einer Sphingomyelinase C, und dem B-Streptokokken CAMP-Faktor zurückgeführt. Der CAMP-Faktor wurde als thermostabiles Protein mit einem Molekulargewicht von 23500 und einem isoelektrischen Punkt bei pH 8,3 beschrieben (BERNHEIMER et al. 1979). JÜRGENS et al. (1985) stellten ein Molekulargewicht von 25000 und einen isoelektrischen Punkt bei pH 8,9 fest. Eine

positive CAMP-Reaktion wird im allgemeinen als typische Eigenschaft zur vorläufigen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B eingesetzt.

Alle 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen der vorliegenden Untersuchung wiesen auf Schafblutagarplatten eine solche positive CAMP-Reaktion auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten von zahlreichen anderen Autoren festgestellt werden (MERITT und JACOBS 1976, SKALKA und SMOLA 1981, FINCH und MARTIN 1984, LÄMMLER und BLOBEL 1987a, b, DEVRIESE 1991, WIBAWAN 1993b, LÄMMLER und HAHN 1994). In Untersuchungen einiger Autoren waren bei wenigen B-Streptokokkenkulturen keine vergleichbaren synergistisch-hämolytischen Reaktionen nachweisbar (MÜLLER 1967, HOFFMANN 1972, PODBIELSKI et al. 1994 und HASSAN et al. 2000). Trotz dieser teilweise negativen Reaktionen hat sich nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen die CAMP-Reaktion als zuverlässige Methode zur vorläufigen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, auch unterschiedlicher Herkunft, bewährt.

Die biochemischen Eigenschaften der untersuchten *S. agalactiae*-Kulturen entsprachen im wesentlichen den Angaben von HAHN (1981), BRIDGE und SNEATH (1983), ROTTA (1986), WIBAWAN (1993b), LÄMMLER et al. (1993a, b) und LÄMMLER und HAHN (1994). Alle 101 untersuchten Kulturen zeigten einen Abbau von Glucose, Maltose und Saccharose, jedoch keinen Abbau von Arabinose, Inulin, Mannit und Sorbit. In den vorliegenden Untersuchungen spaltete die Mehrzahl der B-Streptokokkenisolate von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch Trehalose. Dies stimmte weitgehend mit den Ergebnissen bei der Untersuchung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Nutria und Schwein, (WIBAWAN et al. 1993) und den Ergebnissen bei der Untersuchung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Rind und Mensch (HAHN 1981, ROTTA 1986, WIBAWAN 1993b, BOPP 1994, LÄMMLER und HAHN 1994), überein. Erste Unterschiede zwischen B-Streptokokkenkulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch ergaben sich im Abbau von Lactose. Kulturen vom Rind waren lactosepositiv, Kulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch dagegen überwiegend lactosenegativ. Auf Unterschiede im Lactoseabbau von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Mensch und Rind (FINCH

und MARTIN 1984, ROTTA 1986, LÄMMLER und BLOBEL 1987a, DEVRIESE 1991, WIBAWAN et al. 1991, WIBAWAN 1993b, MOSABI et al. 1997), den überwiegend fehlenden Lactoseabbau von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Nutria und Schwein (WIBAWAN et al. 1993) und den überwiegend fehlenden Lactoseabbau einiger B-Streptokokkenkulturen von Hund, Katze und Affe (LÄMMLER et al. 1998) wurde bereits hingewiesen. Der Abbau von Lactose, hauptsächlich durch B-Streptokokken vom Rind, könnte auf eine besondere Anpassung dieser Kulturen an das Rindereuter hinweisen. Der überwiegend fehlende Lactoseabbau bei B-Streptokokkenkulturen von Hund und Katze aber auch von anderen Tierarten wies bereits auf phänotypische Ähnlichkeiten dieser B-Streptokokken mit B-Streptokokkenkulturen vom Menschen hin. Im Salicinabbau zeigten B-Streptokokkenkulturen vom Rind sowohl positive als auch negative Reaktionen. B-Streptokokken, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch, dagegen bauten überwiegend Salicin ab. Vergleichbares wurde bereits von FINCH und MARTIN (1984), DEVRIESE (1991), WIBAWAN (1993b) und MOSABI et al. (1997) für B-Streptokokkenkulturen von Rind und Mensch beschrieben.

Alle 101 untersuchten Kulturen zeichneten sich, entsprechend den Angaben zahlreicher Autoren (FINCH und MARTIN 1984, ROTTA 1986, WIBAWAN 1993b, LÄMMLER und HAHN 1994), durch die Hydrolyse von Natrium-Hippurat und die fehlende Spaltung von Äsculin aus.

Zur serologischen Identifizierung der B-Streptokokken eignete sich das durch Autoklavieren extrahierbare Gruppenpolysaccharidantigen. Streptokokken der serologischen Gruppe B besitzen ein gemeinsames Gruppenpolysaccharidantigen, bestehend aus Rhamnose (50,5 %), Galactose (15 %) und N-Acetylglucosamin (12 %) (CURTIS und KRAUSE 1964). Nach PRITCHARD et al. (1984) ist Glucitolphosphat ein weiterer Bestandteil des B-Polysaccharidantigens. Der Nachweis des Gruppenpolysaccharidantigens erfolgte mit spezifischem Antiserum in der Immundiffusion. Dieses Gruppenpolysaccharidantigen B war bei allen 101 untersuchten B-Streptokokken der vorliegenden Untersuchungen nachweisbar.

Für die Identifizierung von B-Streptokokken mit konventionellen Verfahren benötigt man ca. 36 bis 48 Stunden. Eine deutlich schnellere und präzisere

Identifizierung ist mit molekularen Untersuchungsverfahren möglich. Für diese Untersuchungen erwiesen sich besonders Analysen der 16S ribosomalen DNA, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region und des CAMP-Faktor-Gens *cfb* als geeignet.

Die 16S und 23S rRNA stellen einen wesentlichen Teil des bakteriellen Ribosoms dar. Das Gen der 16S rRNA enthält konstante und variable Genabschnitte. Bestimmte konstante Abschnitte lassen sich bei allen Bakterien nachweisen, manche Bereiche unterliegen Mutationen. Einige Bezirke der 16S rDNA-Sequenz stellen individuelle Kennzeichen für jedes Bakterium dar und bieten Informationen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Bakterien. Andererseits können bestimmte konservierte Regionen in der Sequenz aller bekannten Bakterien gefunden werden. So werden sozusagen „Breitspektrum“-PCR-Primer hergestellt und benutzt, um diese konservierten 16S rRNA-Gensequenzen zu erkennen und dazwischenliegende variable Regionen zu amplifizieren. Ein variabler Genabschnitt des 16S rRNA-Gens kodiert die sogenannte V2-Region, die sich bei 31 Streptokokkenspezies als spezifisch erwies und eine Grundlage zur Differenzierung unterschiedlicher Streptokokkenarten darstellt (BENTLEY und LEIGH 1995).

Bei der Nutzung des 16S rRNA-Gens zur Identifizierung von Bakterienspezies kamen in den vorliegenden Untersuchungen zwei Strategien zum Einsatz. Eine Möglichkeit bestand in der Amplifizierung des 16S rRNA-Gens mit solchen universellen PCR-Primern durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und den anschließenden Restriktionsverdau des Amplikons mit einem spezifischen Enzym. Das Restriktionsenzym *RsaI* wurde, entsprechend den Angaben von JAYARAO et al. (1992), aufgrund der bekannten Sequenz des 16S rRNA-Gens von *S. agalactiae* ausgewählt und der Restriktionsverdau zunächst mit dem Computerprogramm Clone Manager 4.0 simuliert. In den vorliegenden Untersuchungen war bei allen 101 B-Streptokokkenkulturen mit solchen universellen PCR-Primern ein Amplikon mit einer Größe von 1540 Bp nachweisbar. Oligonukleotidprimer mit identischer Basensequenz waren bereits für „Restriction fragment length polymorphism“ (RFLP)-Analysen von JAYARAO et al. (1992) sowie ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) verwendet worden. Mit dem Enzym *RsaI* konnte anschließend bei allen 101 B-Streptokokkenkulturen, entsprechend den nach dem Computerprogramm Clone

Manager 4.0 erwarteten Schnittstellen, ein einheitliches Restriktionsmuster mit vier Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Größe festgestellt werden. Bei dem 16S rRNA-Gen waren somit, zumindest im Bereich der *RsaI*-Schnittstellen, auch bei B-Streptokokkenkulturen unterschiedlicher Herkunft, keine signifikanten Sequenzenunterschiede feststellen. JAYARAO et al. (1992) differenzierten bereits mittels einer vergleichbaren RFLP-Analyse des 16S rRNA-Gens zwölf verschiedene Bakterienarten der Gattungen *Streptococcus* bzw. *Enterococcus*. Diese Untersuchungen beinhalteten auch *S. agalactiae*-Kulturen. In den Untersuchungen von ABDULMAWJOOD et al. (1998), LÄMMLER et al. (1998) sowie ABDULMAWJOOD und LÄMMLER (1999) wurden ebenso Streptokokken der serologischen Gruppe B sowie *S. uberis*, *S. parauberis* und *S. porcinus* durch RFLP-Analysen des 16S rRNA-Gens unterschieden bzw. aufgrund des Restriktionsmusters identifiziert.

Eine zweite Strategie stellte die Konstruktion speziesspezifischer Oligonukleotidprimer dar. Eine positive PCR-Reaktion, d.h. die Amplifizierung eines Genabschnitts definierter Größe, ermöglichte eine Identifizierung der jeweiligen Bakterienspezies. *S. agalactiae*-16S rDNA-spezifische Oligonukleotidprimer, wobei ein Oligonukleotidprimer im Bereich der *S. agalactiae*-spezifischen V2-Region gewählt wurde, konnten bereits von LÄMMLER et al. (1998) vorgestellt und zur Identifizierung von B-Streptokokken eingesetzt werden (ABDULMAWJOOD und LÄMMLER 1999, HASSAN et al. 2000, ESTUNINGSIH et al. 2001). In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich unter Verwendung dieser *S. agalactiae*-spezifischen Oligonukleotidprimer bei allen 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen ein Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 1250 Bp. Dies wies erneut auf einheitliche Basensequenzen in diesem Bereich, auch bei B-Streptokokkenkulturen unterschiedlicher Herkunft, hin. Eine vergleichbare Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B durch Amplifizierung eines spezifischen Abschnitts der 16S rDNA- bzw. 16S rRNA erfolgte durch AHMET et al. (1999), WANG et al. (1999) und RIFFON et al. (2001).

Ein weiterer Bereich der ribosomalen RNA, der sich zur molekularen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B eignete, war der Genabschnitt, der die sogenannte „intergenic spacer“-Region, d.h. die Region

zwischen den 16S- und den 23S rRNA-Genen, kodiert. Bei der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region handelt es sich um eine Region innerhalb des Bakteriengenoms, die nützliche taxonomische Informationen enthält. Die DNA der „intergenic spacer“-Region ist viel variabler als die des angrenzenden 16S rRNA-Gens und des 23S rRNA-Gens. Die Variationen zeigen sich sowohl in der Länge als auch in der Sequenz der Region. Aufgrund dieser Variationen der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region war eine Differenzierung von Bakterien innerhalb der Gattung, Art oder auch auf Stammniveau möglich (WHILEY et al. 1995). FORSMAN et al. (1997) identifizierten durch PCR-Analysen der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region neun Mastitis-verursachende Erreger, darunter auch *S. agalactiae*. Sie stellten innerhalb dieser Erreger Unterschiede bezüglich der Gengröße sowie der Gensequenz fest. Eine Anwendung der von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer zur molekularen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B unterschiedlicher Herkunft erfolgte bereits durch FINK et al. (2000), HASSAN et al. (2000), TILSALA-TIMISJÄRVI (2000), ESTUNINGSIH et al. (2001) und PHUEKTES et al. (2001). Die von FORSMAN et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotidprimer wurden in den vorliegenden Untersuchungen bei allen B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, eingesetzt und führten zu einem Amplikon mit einer einheitlichen Größe von 290 Bp. Auch in diesem Genabschnitt schienen keine Sequenzunterschiede bei B-Streptokokken unterschiedlicher Herkunft zu bestehen. BERRIDGE et al. (2001) setzten ebenso speziesspezifische Primer aus diesem Bereich zur Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B ein.

Als weitere Möglichkeit zur molekularen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B erwies sich die Amplifizierung des CAMP-Faktor-Gens *cfb*. Die Sequenzierung des CAMP-Faktor Gens *cfb* erfolgte durch SCHNEEWIND et al. (1988) sowie PODBIELSKI et al. (1994). Dies ermöglichte die Erstellung von speziesspezifischen bzw. *cfb*-Gen-spezifischen Oligonukleotidprimern (PODBIELSKI et al. 1994, HASSAN et al. 2000). Unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer war in den vorliegenden Untersuchungen ein einheitliches Amplikon mit einer Größe von 1020 Bp bei allen 101 B-Streptokokkenkulturen nachweisbar. Eine vergleichbare

PCR-vermittelte Amplifizierung des *cfb*-Gens von Streptokokken der serologischen Gruppe B wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung dieser Spezies eingesetzt (FINK et al. 2000, HASSAN et al. 2000, KE et al. 2000, ESTUNINGSIH et al. 2001). Auch hier schienen nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen bei B-Streptokokken unterschiedlicher Herkunft keine Sequenzunterschiede vorzuliegen.

Die Identifizierung aller 101 *S. agalactiae*-Kulturen unterschiedlicher Herkunft mit drei verschiedenen speziesspezifischen Primerpaaren bewährte sich als zuverlässige und schnell durchzuführende Methode.

Bei der Serotypisierung der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, ergaben sich Unterschiede im Vorkommen der Serotypen bzw. der Typenantigenmuster. Um die Ergebnisse der Serotypisierung zu bestätigen, wurden zusätzlich einige PCR-Analysen durchgeführt. Die hierbei nachgewiesenen Gene *bag* und *rib* kodierten die Proteinantigene c β bzw. Rib. Vergleichbare PCR-Analysen wurden bereits von WÄSTFELT et al. (1996) und MAELAND et al. (1997) sowie für die Gene, die die Polysaccharidantigene Ia, Ib, III, IV, V, VI, VII kodieren, von KONG et al. (2002) durchgeführt.

Innerhalb der 55 B-Streptokokkenkulturen von Hund und Katze waren besonders die Typenantigenmuster III/Rib, Ia/c α und II/Rib, die Polysaccharidantigene Ia, II, III und IV ohne gleichzeitiges Proteinantigen und die Proteinantigene Rib und R ohne weiteres Polysaccharidantigen nachweisbar. Das B-Streptokokken-Polysaccharidantigen II war bislang insbesondere bei Kulturen perinataler Infektionen der Neugeborenen nachweisbar (WILKINSON 1978, GRAY et al. 1985), das Polysaccharidantigen III hauptsächlich bei Neugeborenenmeningitiden (WILKINSON et al. 1973, BAKER und BARETT 1974, BAKER et al. 1976).

Bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein, der vorliegenden Untersuchungen waren insbesondere die Typenantigenmuster III/Rib und Ia/c β und die Polysaccharidantigene Ia und III ohne gleichzeitiges Proteinantigen nachweisbar.

Innerhalb der B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, waren alle Kulturen typisierbar. Bei diesen Kulturen war besonders das Proteinantigen X ohne gleichzeitiges Polysaccharidantigen oder in Verbindung mit dem Polysaccharidantigen

Ia nachweisbar. Das Polysaccharidantigen IV war ebenso zu beobachten. Das vermehrte Auftreten des Proteinantigen X bei „bovinen“ B-Streptokokkenkulturen wurde ebenfalls von zahlreichen Autoren beschrieben (MORRISON und WRIGHT 1984, FINCH und MARTIN 1984, PASARIBU et al. 1985, WIBAWAN und LÄMMLER 1990a, DEVRIESE 1991, WIBAWAN 1993b). Das häufige Vorkommen des Proteinantigen X bei rinderpathogenen Streptokokken der serologischen Gruppe B und auch bei rinderpathogenen Streptokokken der serologischen Gruppen G und L (BERGNER-RABINOWITZ et al. 1981 und LÄMMLER et al. 1987) wies auf eine spezifische Anpassung der Proteinantigen X-positiven Streptokokken an den Wirtsorganismus Rind hin. Das Proteinantigen X erwies sich als pepsinempfindlich und zeigte auch eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Trypsin (LAUTROU et al. 1991, RAINARD et al. 1991a, b). Nach Untersuchungen von RAINARD et al. (1991a, b) besaßen Antikörper gegen das gereinigte Proteinantigen X im Tierversuch eine Schutzwirkung.

Die übrigen hier untersuchten B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch wiesen das Proteinantigen X nicht auf.

Innerhalb der B-Streptokokkenkulturen vom Mensch der vorliegenden Untersuchungen waren insbesondere die Typenantigenmuster III/Rib und Ia, Ib/c α ,c β bzw. die Proteinantigene c α , c β und Rib ohne gleichzeitiges Polysaccharidantigen nachweisbar. Über das Vorkommen der Polysaccharidantigene II und III und der Proteinantigene c α , c β und R bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen, berichteten bereits JELINKOVA (1977), WILKINSON (1978), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), WIBAWAN (1993b) und LÄMMLER und HAHN (1994). Das Proteinantigen R war nahezu ausschließlich bei B-Streptokokken vom Menschen nachweisbar, häufig in Kombination mit den Polysaccharidantigenen II oder III (JELINKOVA 1977, LINDEN et al. 1983a, b, FLORES und FERRIERI 1993). Eine mutmaßliche pathogene Bedeutung des Proteinantigen R bei Streptokokken der serologischen Gruppe B wurde von LINDEN (1983a, b) beschrieben. Nach WIBAWAN und LÄMMLER (1990c) zeigten B-Streptokokken, isoliert vom Menschen häufig das Typenantigenmuster Ia/c. Das c-Proteinantigen lag dabei zumeist

als α -Komponente allein, dagegen weniger häufig als $c\beta$ -Komponente allein vor (WIBAWAN und LÄMMLER 1990c).

In den vorliegenden Untersuchungen war erkennbar, dass Isolate von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein und Isolate vom Menschen ähnliche bis identische Typenantigenmuster aufwiesen. Die Typenantigenmuster der Isolate vom Rind unterschieden sich deutlich.

Bei keiner der untersuchten 101 Kulturen konnten die Polysaccharidantigene VI, VII bzw. VIII festgestellt werden. Diese Polysaccharidantigene waren bisher bei Isolaten vom Menschen nachweisbar (LACHENAUER et al. 1999, von HUNOLSTEIN et al. 1999, PAOLETTI et al. 1999).

Die Ergebnisse zu den Proteinantigenen $c\beta$ und Rib konnten durch PCR-vermittelte Analyse der jeweiligen Gene bestätigt werden. Bei sechs Kulturen die in der Immundiffusion keine Reaktion mit Proteinantigen $c\beta$ -spezifischem Antiserum aufwiesen, war jedoch eine positive *bag*-Gen PCR nachweisbar. Im weiteren war bei fünf Kulturen die keine Reaktion mit Proteinantigen Rib-spezifischem Antiserum aufwiesen, eine positive *rib*-Gen PCR feststellbar. Vergleichbare positive PCR-Reaktion und das Fehlen des immunologischen Nachweises wurden für die Proteinantigene α und $c\beta$ beschrieben (MAELAND et al. 1997, 1999). Dies ist möglicherweise auf eine fehlende oder verminderte Expression der Proteinantigene oder auf eine fehlende Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens zurückzuführen.

Unterschiedlich in Abhängigkeit von der Herkunft der B-Streptokokkenkulturen der hier durchgeführten Untersuchungen erwies sich auch die Pigmentierung. Während nahezu alle Streptokokken der serologischen Gruppen B, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch, deutliche Pigmentierungen aufwiesen, war dies nur vereinzelt und auch vermindert bei B-Streptokokkenkulturen vom Rind feststellbar. Auf eine überwiegend fehlende Pigmentierung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, und eine vermehrte Pigmentierung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen wurde bereits von zahlreichen Autoren hingewiesen (BRGLEZ 1983, FINCH und MARTIN 1984, LÄMMLER und BLOBEL 1987a, DEVRISSE 1991, LÄMMLER et al. 1993a, WIBAWAN 1993b, LÄMMLER und HAHN 1994, MOSABI et al. 1997). Eine

vermehrte Pigmentierung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund und Katze, sowie von anderen Tierarten, wies erneut auf Ähnlichkeiten der B-Streptokokkenkulturen dieser Herkunft mit B-Streptokokken-Isolaten vom Menschen hin. Das Pigment zeigte Eigenschaften eines β -Karotinoids (MERRITT und JACOBS 1978).

Weitere Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen B-Streptokokken von Rind und Mensch wiesen MÜLLER 1967, LÄMMLER und BLOBEL 1987a, WIBAWAN und LÄMMLER 1990a sowie LÄMMLER et al. 1993a nach. Dem Wachstum in Flüssigmedium als Sediment mit klarem Überstand und der Ausbildung von überwiegend langen, streptokokkentypischen Ketten von „bovinen“ B-Streptokokken stand das Wachstum unter gleichmäßiger Trübung des Anzüchtungsmediums mit überwiegend kurzen Ketten der „humanen“ B-Streptokokken gegenüber. Diese Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium hatten ebenso eine Beziehung zu den Wachstumseigenschaften der B-Streptokokkenkulturen in Soft-Agar und zu dem jeweiligen Serotyp. Die Kulturen, die in Flüssigmedium als Sediment mit klarem Überstand wuchsen, bildeten in Soft-Agar überwiegend kompakte Kolonien. Demgegenüber wiesen Kulturen mit trübem Wachstum in Flüssigmedium überwiegend ein diffuses Wachstum der Kolonien in Soft-Agar auf (WIBAWAN 1993b, SALASIA et al. 1994). Diese Wachstumsunterschiede waren nach Untersuchungen von WIBAWAN et al. (1993) und WIBAWAN (1993b) mit dem Vorkommen von Polysaccharidantigenen bzw. Proteinantigenen und den sich daraus ergebenden Oberflächenhydrophobizitäten der Kulturen korreliert. In Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1991a) konnten anhand einer neuraminsäurefreien-Mutante der Einfluss des Neuraminsäureanteils der Polysaccharidmikrokapsel der B-Streptokokken auf das Wachstumsverhalten und die Oberflächenladung nachgewiesen werden. Hierbei zeigte der neuraminsäurehaltige Ausgangsstamm mit Typenantigen III ein trübes Wachstum in Flüssigmedium, diffuse Kolonien in Soft-Agar, eine kurze Kettenformation und eher hydrophile Oberflächeneigenschaften. Die neuraminsäure- und Typenantigen III-freie Mutante wies dagegen ein klares Wachstum in Flüssigmedium, kompakte Kolonien in Soft-Agar, längere Kettenformationen und eher hydrophobe Oberflächeneigenschaften auf.

Vergleichbar zu den Ergebnissen von MÜLLER (1967), LÄMMLER und BLOBEL (1987a), WIBAWAN und LÄMMLER 1990b und WIBAWAN 1993b zeigten die hier untersuchten 101 B-Streptokokkenkulturen ebenso herkunft- bzw. serotypspezifische Wachstumsunterschiede. B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch wuchsen überwiegend unter einer gleichmäßigen Trübung des Flüssigmediums mit relativ kurzer Kettenformation und zeigten ein diffuses Wachstum in Soft-Agar. Dagegen wuchsen Kulturen, isoliert vom Rind, in Flüssigmedium überwiegend als Sediment mit langer Kettenformation und kompakten Kolonien in Soft-Agar. Die Kettenlänge und das Wachstumsverhalten der B-Streptokokken in Flüssigmedium und Soft-Agar, insbesondere der Kulturen, isoliert von Hund und Katze, aber auch der anderen Tierarten, wies somit ebenso auf eine Beziehung der B-Streptokokken zu „humanen“ nicht aber zu „bovinen“ B-Streptokokken hin.

Ein weiteres bedeutsames Merkmal von Bakterien ist deren Adhärenzverhalten. Voraussetzung für die bakterielle Adhärenz waren nach BEACHEY (1982) spezifische „Schlüssel-Schloß“-Wechselwirkungen zwischen sogenannten Adhäsinen auf der Bakterienoberfläche und spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche des betroffenen Gewebes. Nach Untersuchungen von WIBAWAN und LÄMMLER (1994) schien die Adhäsion von Streptokokken der serologischen Gruppe B an Zellstrukturen mit der Oberflächenhydrophobizität der Kulturen im Zusammenhang zu stehen. Eine vermehrte Oberflächenhydrophobizität, insbesondere bei Kulturen mit Proteinantigenen an der bakteriellen Oberfläche, stand in Beziehung zu einer deutlichen Adhärenz, aber auch zu einer vermehrten Phagozytose der Kulturen. Kulturen mit Polysaccharidantigenen zeigten, bei geringerer Oberflächenhydrophobizität, eine geringere Adhärenz an Zellstrukturen waren aber geschützt vor Phagozytose. Eine besondere Oberflächenhydrophobizität war nach WIBAWAN und LÄMMLER (1994) insbesondere bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, hier vornehmlich solchen mit Proteinantigen X, eine verminderte Oberflächenhydrophobizität, vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen, hierbei besonders bei Kulturen mit den Polysaccharidantigenen Ia und III nachweisbar.

Zur Bestimmung der Oberflächenladung der 101 B-Streptokokkenkulturen der vorliegenden Untersuchungen kamen sowohl der Salz-Aggregationstest als auch das Adhärenzverhalten der Kulturen an DEAE-Sephacel zur Anwendung. Der Salz-Aggregationstest wurde bereits zum Nachweis der Oberflächenhydrophobizität von Streptokokken der serologischen Gruppe B (WIBAWAN und LÄMMLER 1994) und auch von anderen Bakterienarten verwendet. Oberflächenproteine, wie der Clumping-Faktor, das fibronektinbindende Protein und auch das Protein A schienen für die Oberflächenhydrophobizität von *Staphylococcus aureus* von Bedeutung zu sein (KUUSELA 1978, LINDAHL et al. 1981, JONSSON und WADSTRÖM 1984). Mit dem Salz-Aggregationstest werden die Bakterien bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen aggregiert. Die B-Streptokokkenkulturen der vorliegenden Untersuchungen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch, zeigten überwiegend eine Aggregation in einer 2,5 mol/l Ammoniumsulfatlösung. Die Mehrzahl der Isolate vom Rind aggregierten dagegen deutlich bereits in einer 1,5 mol/l Ammoniumsulfatlösung. Vergleichbare Unterschiede waren im Adhäsionsverhalten der Kulturen an die Ionenaustauschmatrix DEAE-Sephacel feststellbar. In den vorliegenden Untersuchungen war eine vermehrte Adhäsion (≥ 70 %) von einer geringeren Adhäsion (< 70 %) an DEAE-Sephacel zu unterscheiden. Hierbei war eine Tendenz in der Form zu erkennen, dass die Mehrzahl der untersuchten Isolate von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Schwein und Mensch eine geringere Adhäsion an DEAE-Sephacel und die Mehrzahl der untersuchten Isolate von Nutria und Rind eine vermehrte Adhäsion an DEAE-Sephacel zeigten. Dies wies daraufhin, dass B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Schwein und Mensch, weniger ausgeprägt bei Isolaten vom Nutria, eher eine hydrophile, B-Streptokokken vom Rind dagegen eher eine hydrophobe Oberflächenladung aufwiesen.

Ferner wurden die Ergebnisse hinsichtlich des Serotyps, der Kettenlänge, den Wachstumseigenschaften der Kulturen in Flüssigmedium und in Soft-Agar, dem Verhalten im Salz-Aggregationstest und dem Adhäsionsverhalten an DEAE-Sephacel vergleichend betrachtet. Hierbei zeigten die B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und

Mensch, überwiegend ein trübes Wachstum in flüssigem Medium, eine kurze Kettenformation, diffuse Kolonien in Soft-Agar, waren überwiegend mit Polysaccharidantigenen ausgestattet und zeigten eine hydrophile Oberflächenladung im Salz-Aggregationstest und im DEAE-Sephacel-Adhärenztest. B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, wuchsen in flüssigem Medium überwiegend als Sediment mit ansonsten klarem Überstand sowie längerer Kettenformation, zeigten kompakte Kolonien in Soft-Agar, wiesen vermehrt das Oberflächenproteinantigen X auf und zeigten hydrophobe Oberflächeneigenschaften im Salz-Aggregationstest sowie im DEAE-Sephacel-Adhärenztest. Vergleichbare Unterschiede zwischen B-Streptokokken von Rind und Mensch wurden bereits beschrieben (LÄMMLER und BLOBEL 1987a, WIBAWAN et al. 1992, WIBAWAN et al. 1993, WIBAWAN 1993b). Die genannten Eigenschaften wiesen erneut darauf hin, dass B-Streptokokkenkulturen, insbesondere isoliert von Hund und Katze, aber auch von anderen Tierarten, eher Eigenschaften von „humanen“ B-Streptokokkenkulturen aufwiesen.

Bei Streptokokken der serologischen Gruppe B schien ein zur Hämagglutination führendes Oberflächenprotein eine Bedeutung für die Adhärenz dieses Bakteriums zu haben (WIBAWAN et al 1993). Ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenhydrophobizität, dem Hämagglutinationsvermögen der Bakterienkulturen und ihrer Adhärenz an Makrophagen wurde ebenso für *Streptococcus suis* (WIBAWAN und LÄMMLER 1994, SALASIA et al. 1995), *Rhodococcus equi* (FUHRMANN und LÄMMLER 1996) und für *Bordetella pertussis* (RELMAN et al. 1990) beschrieben.

Innerhalb der 101 untersuchten B-Streptokokkenkulturen der vorliegenden Arbeit konnten bei sieben der 10 Kulturen, isoliert vom Rind, Hämagglutinationsreaktionen mit Erythrozytensuspensionen von Kaninchen und Schaf und bei fünf Kulturen mit Erythrozytensuspensionen vom Menschen festgestellt werden. Auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Proteinantigens X, mikroaerophiler Anzucht und hämagglutinierenden Eigenschaften von „bovinen“ B-Streptokokken wurde bereits hingewiesen (WIBAWAN et al 1993a, WIBAWAN 1993b). Bei allen übrigen Kulturen von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch waren mit Erythrozyten von

Kaninchen, Schaf und Mensch keine Hämagglutinationsreaktionen feststellbar. Erneut zeigten Kulturen, insbesondere von Hund und Katze, aber auch der anderen Tierarten, Eigenschaften von „humanen“ B-Streptokokkenkulturen.

Die Untersuchung der Antibiotikaempfindlichkeit der B-Streptokokkenkulturen ergab für alle Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Oxacillin und für die Mehrzahl der Kulturen eine Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin, Cefoxitin, Clindamycin, Erythromycin sowie Penicillin G und eine Resistenz gegenüber Gentamicin und Polymyxin B. Dies entsprach im wesentlichen den Angaben von KIM (1987), BERKOWITZ et al. (1990), BUU-HOI (1990), WIBAWAN et al. (1991) und KO et al. (2001). Hieraus ergaben sich keine Beziehungen zur Herkunft der Kulturen. Eine Resistenz oder ein intermediäres Verhalten gegenüber Minocyclin war bei der Mehrzahl der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Schwein und Mensch, nicht aber bei Isolaten von Nutria und Rind festzustellen. Resistenz oder ein intermediäres Verhalten gegenüber Tetracyclin zeigten im weiteren die Mehrzahl der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch, nicht aber die Isolate vom Rind. Vergleichbare Unterschiede in der Minocyclin bzw. Tetracyclinresistenz zwischen B-Streptokokken, isoliert von Rind und Mensch, wurden bereits beschrieben (WIBAWAN et al. 1991, LÄMMLER et al. 1993a und SCHWARZ et al. 1994). Diese Resistenzen gegenüber Minocyclin und Tetracyclin korrelierten nach Angaben von BROWN und ROBERTS (1991) sowie SCHWARZ et al. (1992) mit dem Vorkommen der Tetracyclinresistenzgene *tet(M)* und *tet(O)*. SOEDARMANTO et al. (1995) konnten auch bei Minocyclin- und Tetracyclinresistenz Streptokokken der serologischen Gruppen G und L diese *tet(M)*- und *tet(O)*-Resistenzgene nachweisen. Die Gene kodieren ribosomale Schutzproteine und bedingen somit eine Resistenz gegenüber Minocyclin und Tetracyclin (SCHWARZ et al. 1992). Auch hinsichtlich der Resistenzen gegenüber Minocyclin und Tetracyclin wiesen somit B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund und Katze und überwiegend auch Kulturen der anderen Tierarten, Eigenschaften von „humanen“ nicht aber von „bovinen“ B-Streptokokken auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem zum Nachweis des Enzyms Hyaluronidase der B-Streptokokkenkulturen ein Dekapsulationstest mit einer mukoid wachsenden *S. equi* subsp. *zooepidemicus*-Kultur durchgeführt.

Dabei wurde eine positive Reaktion für alle B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Meerschweinchen, Affe, Nutria, Schwein und Rind festgestellt. Bei den anderen B-Streptokokkenkulturen traten sowohl positive als auch negative Reaktionen auf.

Eine phänotypisch-positive Hyaluronidaseaktivität ging in den vorliegenden Untersuchungen im allgemeinen mit einem PCR-vermittelten *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb einher, phänotypisch hyaluronidasenegative Isolate wiesen ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb auf. Das Insertionselement *1548* mit einer Größe von 0,98 Kb konnte bei den meisten phänotypisch hyaluronidasenegativen Kulturen, die ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb zeigten, nachgewiesen werden. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen einer fehlenden Hyaluronidaseaktivität, dem Auftreten eines *hylB*-Amplikons von 4,6 Kb und dem Insertionselement *1548* konnten bereits bei humanpathogenen B-Streptokokkenkulturen, überwiegend vom Serotyp III, nachgewiesen werden (GRANLUND et al. 1998, ROLLAND et al. 1999). Das Insertionselement *1548* war nach Angabe dieser Autoren innerhalb des *hylB*-Gens lokalisiert und schien das *hylB*-Gen zu inaktivieren. hyaluronidasenegative Kulturen mit einem *hylB*-Amplikon einer Größe von 4,6 Kb und das Insertionselement *1548* waren in den vorliegenden Untersuchungen ebenso vermehrt bei B-Streptokokkenkulturen mit Serotyp III und III/Rib nachweisbar.

Eine phänotypisch hyaluronidasepositive Kultur der vorliegenden Untersuchung, isoliert vom Hund, wies ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb und ein entsprechendes Insertionselement *1548* auf. Diese ungewöhnliche Kombination könnte durch eine zukünftige *hylB*-Gen-Sequenzierung dieser Kultur weitergehend analysiert werden. Die positive Reaktion dieser Kultur im Dekapsulationstest kann möglicherweise auch auf andere extrazelluläre Substanzen zurückzuführen sein.

Bei einer Kultur der vorliegenden Untersuchung, isoliert vom Kaninchen, war ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 4,6 Kb jedoch kein entsprechendes Insertionselement *1548* nachzuweisen. Dies könnte auf eine Variation der Gensequenz

der Primeranlagerungsstelle der Oligonukleotidprimer, verantwortlich für die Amplifizierung des Insertionselements 1548, hinweisen. Andererseits könnte diese Kultur auch ein weiteres, bislang noch nicht bekanntes Insertionselement enthalten, das in das *hylB*-Gen eingefügt ist und zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Zukünftige Sequenzierungen könnten Sequenzvariationen des *hylB*-Gens bzw. die Sequenz dieses möglicherweise neuen Insertionselements aufzeigen.

Eine weitere Kultur der vorliegenden Untersuchungen, isoliert vom Menschen, erwies sich phänotypisch als hyaluronidasen negativ. Diese Kultur hatte ein *hylB*-Amplikon mit einer Größe von 3,3 Kb. Der fehlende Nachweis des Enzyms Hyaluronidase bei dieser Kultur könnte auf eine verminderte Produktion des Enzyms oder auf eine eingeschränkte Empfindlichkeit des Dekapsulationstests zurückzuführen sein. Eine vergleichbare geringere Bildung dieses Enzyms wurde für B-Streptokokken des Serotyps Ib beschrieben (LIN et al. 1994, GRANLUND et al. 1998).

Das Insertionselement IS1548 war nach GRANLUND et al. (1998) auch bei hyaluronidasepositiven B-Streptokokkenkulturen vom Serotyp II und bei einigen A-Streptokokkenkulturen nachweisbar. Die Sequenz des Insertionselements 1548 zeigte Homologien mit sich wiederholenden Sequenzen von *Streptococcus pneumoniae* und mit sogenannten „H-repeats“ von *Escherichia coli*. Bei phänotypisch hyaluronidasenegativen Isolaten konnte darüber hinaus eine Kopie des Insertionselements 1548 in der Nähe des C5a Peptidase-Gens *scpB* beobachtet werden (GRANLUND et al. 1998).

Nach GRANLUND et al. (1998) schien das *hylB*-Gen-Insertionselement 1548 typisch für *S. agalactiae* Kulturen von bei Endocarditisfällen des Menschen zu sein. Das Auftreten des Insertionselements 1548 innerhalb des *hylB*-Gens von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen und Pferd, der vorliegenden Untersuchung zeigte eine Beziehung zu dem bei diesen Kulturen vorkommenden Typenantigenen III und III/Rib und wies somit erneut auf eine Ähnlichkeit dieser Kulturen mit „humanen“ B-Streptokokkenkulturen hin.

Weitere mutmaßliche Virulenzgene, die in dieser Arbeit auch untersucht wurden, waren das B-Streptokokken-C5a-Peptidase-Gen *scpB* und das Laminin-bindendes Protein-Gen *lmb* sowie zusätzlich das Insertionselement ISSag2, dies durch

PCR-vermittelte Amplifizierung der entsprechenden Gene bzw. des Insertionselements *ISSag2*.

Die C5a-Peptidase ließ sich nach BOHNSACK et al. (1991) enzymatisch von der B-Streptokokkenoberfläche ablösen, wies ein Molekulargewicht von 120.000 Da auf und spaltete den Komplementfaktor C5a zwischen den C-terminal gelegenen Aminosäuren Histidin und Lysin. Die Aktivität der Peptidase hatte keinen Einfluss auf den Infektionsausbruch, sie griff aber in das Entzündungsgeschehen ein und verzögerte die Anhäufung von Granulozyten am Ort der Infektion. Laminin-bindendes Protein zeigte strukturelle Gemeinsamkeiten mit der Streptokokken-Lipoprotein-Rezeptor-(LraI)-Familie. Das Laminin-bindende Protein vermittelt die Adhäsion von *S. agalactiae* an Laminin (SPELLERBERG et al. 1999).

Die B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferd und Mensch der vorliegenden Untersuchungen, wiesen in der Mehrzahl positive Reaktionen für die Gene *scpB* und *lmb* auf. B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Affe, Nutria, Schwein und Rind zeigten überwiegend negative Ergebnisse für diese beiden Gene. Das Insertionselement *ISSag* mit einer Größe von 0,98 Kb konnte bei den meisten *lmb*-positiven Kulturen nachgewiesen werden.

Nach den Untersuchungen DMITRIEV et al. (1999) wurden die Gene *scpB* bei allen B-Streptokokkenkulturen vom Menschen, aber nur bei neun von 39 B-Streptokokkenkulturen vom Rind nachgewiesen. Dieses Gen hat nach DMITRIEV et al. (1999) eine Bedeutung zur Unterscheidung von B-Streptokokkenkulturen von Mensch und Rind. Nach FRANKEN et. al (2001) schienen die Gene *scpB* und *lmb* weit verbreitet bei „humanen“ B-Streptokokkenkulturen zu sein, nicht aber bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind. Beide Gene und die Kopienzahl des Insertionselements *ISSag2* haben nach FRANKEN et. al (2001) eine Bedeutung als molekulare Marker zur Unterscheidung von „humanen“ und „bovinen“ B-Streptokokkenkulturen.

B-Streptokokkenkulturen, isoliert, insbesondere von Hund, Katze aber auch Kulturen von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe und Pferd zeigten sowohl phänotypisch mit dem fehlenden Lactoseabbau, dem Typenantigenmuster mit überwiegend Polysaccharidantigenen, der deutlichen Pigmentbildung, der Kettenlänge,

den Wachstumseigenschaften in Flüssigmedium und Soft-Agar, der geringeren Oberflächenhydrophobizität, dem fehlenden Hämagglutinationsvermögen und der Resistenz gegenüber Minocyclin und Tetracyclin als auch genotypisch mit dem Vorkommen der Gene *scpB* und *lmb* zahlreiche Ähnlichkeiten mit B-Streptokokken-Isolaten vom Menschen. Die B-Streptokokkenkulturen dieser Herkunft unterschieden sich in diesen Merkmalen von B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind. Nachweisbar bei Kulturen vom Rind waren phänotypisch ein positiver Lactoseabbau, ein Typenantigenmuster mit häufig vorkommendem Proteinantigen X, eine vereinzelt auftretende und auch verminderte Pigmentbildung, eine vermehrte Kettenlänge, Wachstumseigenschaften als Sediment mit klarem Überstand in Flüssigmedium und mit kompakten Kolonien in Soft-Agar, eine vermehrte Oberflächenhydrophobizität, ein Hämagglutinationsvermögen und eine Empfindlichkeit gegenüber Minocyclin und Tetracyclin. Die Gene *scpB* und *lmb* waren bei diesen Kulturen nur vereinzelt nachweisbar. Wie bereits von WIBAWAN et al (1993) beschrieben, schienen B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Nutria und Schwein eine intermediäre Rolle einzunehmen. Bei diesen Kulturen waren phänotypisch ein fehlender Lactoseabbau, Typenantigenmuster mit überwiegend Polysaccharidantigenen, eine deutliche Pigmentbildung, eine geringere Kettenlänge, ein Wachstum in Flüssigmedium unter gleichmäßiger Trübung des Anzüchtungsmediums und mit diffusen Kolonien in Soft-Agar, eine geringere Oberflächenhydrophobizität und ein fehlendes Hämagglutinations-vermögen festzustellen. Kulturen, isoliert vom Nutria erwiesen sich als empfindlich bzw. als intermediär gegenüber Minocyclin und Tetracyclin. Dagegen zeigten Kulturen vom Schwein eine Resistenz gegenüber Minocyclin und Tetracyclin. Die Gene *scpB* und *lmb* konnten bei den untersuchten B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Nutria und Schwein nicht nachgewiesen werden.

B-Streptokokkenkulturen, isoliert, insbesondere von Hund und Katze aber auch Kulturen, isoliert von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria und Schwein, schienen nach den vorliegenden Untersuchungen keine Bedeutung als Infektionsquelle für die Mastitis des Rindes zu haben. Die Bedeutung von B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund und Katze, oder auch von anderen Tierarten, für Infektionen des Menschen ist bislang noch unklar. Aufgrund des vermehrten Vorkommens von

B-Streptokokkenkulturen aus Untersuchungsproben, häufig auch klinisch unauffälliger Hunde und Katze und den zahlreichen Gemeinsamkeiten der Hunde- und Katzen-Isolate mit B-Streptokokken-Isolaten vom Menschen erscheinen Kreuzinfektionen zwischen Hund und Katze, möglicherweise auch anderer Tierarten, und dem Mensch, als wahrscheinlich. Zukünftige epidemiologische Untersuchungen von Tierbesitzern und den entsprechenden Haustieren könnten Auskunft über die Bedeutung dieser Tiere als Infektionsquelle für den Menschen geben.

6. Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen wurden 101 Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein, Rind und Mensch, mit konventionellen und molekularen Verfahren als *Streptococcus agalactiae* bzw. als Streptokokken der serologischen Gruppe B identifiziert und weitergehend charakterisiert. Dies beinhaltete eine biochemische Differenzierung, die serologische Gruppenbestimmung und, vermittelt durch Polymerasekettenreaktion, den Nachweis von speziesspezifischen Genabschnitten im Bereich der 16S ribosomalen DNA, der 16S-23S rDNA „intergenic spacer“-Region und des CAMP-Faktor-Gens *cfb*.

Die untersuchten B-Streptokokkenkulturen ließen sich desweiteren aufgrund spezifischer Polysaccharid- und Proteinantigene, teilweise bestätigt durch PCR-vermittelte Gennachweise, in verschiedene Serotypen unterteilen. Bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd, Nutria, Schwein und Mensch, waren insbesondere die Typenantigenmuster III/Rib, Ia und Ia/c α nachweisbar. Bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, waren dagegen das Proteinantigen X allein, oder in Verbindung mit dem Polysaccharidantigen Ia feststellbar.

B-Streptokokkenkulturen, isoliert, insbesondere von Hund und Katze, aber auch B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe, Pferd und Mensch, sowie einige Isolate von Nutria und Schwein, zeigten im Vergleich zu B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, überwiegend eine negative Lactosereaktion, eine deutliche Pigmentbildung und eine etwas kürzere streptokokkentypische Kettenlänge. Die Kulturen zeigten desweiteren eine überwiegend gleichmäßige Trübung des Anzüchtungsmediums bzw. ein diffuses Wachstum der Kolonien in Soft-Agar, eine geringere Oberflächenhydrophobizität, ein fehlendes Hämagglutinationsvermögen und überwiegend eine Resistenz gegenüber Minocyclin und Tetracyclin. B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Rind, erwiesen sich demgegenüber als lactosepositiv, schwach- bzw. unpigmentiert, zeigten ein Wachstum mit relativ langer Kettenformation, ferner ein Wachstum in Flüssigmedium als Sediment mit klarem

Überstand bzw. in Soft-Agar mit kompakten Kolonien. Diese Kulturen wiesen im weiteren eine vermehrte Oberflächenhydrophobizität auf, führten überwiegend zu einer Hämagglutinationsreaktion mit Kaninchenerythrozyten und waren empfindlich gegenüber Minocyclin und Tetracyclin.

Der Nachweis des Enzyms Hyaluronidase mittels Dekapsulationstest bzw. des Hyaluronidase-Gens *hylB* und des Insertionselements *IS1548* durch PCR ergab eine positive Hyaluronidasereaktion und ein *hylB*-Gen mit einer Größe von 3,3 Kb bei der überwiegenden Zahl der Kulturen unterschiedlicher Herkunft. Eine negative Hyaluronidasereaktion bzw. ein *hylB*-Gen mit einer Größe von 4,6 Kb und das Insertionselement *IS1548* waren, unabhängig von der Herkunft, bei Kulturen von Serotyp III und III/Rib feststellbar.

Durch PCR-vermittelten Nachweis des B-Streptokokken-C5a-Peptidase-Gens *scpB* und des Laminin-bindenden Protein-Gens *lmb* ließen sich bei der Mehrzahl der B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferd und Mensch, nur vereinzelt dagegen bei B-Streptokokkenkulturen, isoliert von Affe, Nutria, Schwein und Rind, beide Gene feststellen.

Die B-Streptokokkenkulturen, isoliert, insbesondere von Hund und Katze, aber auch Kulturen, isoliert von Kaninchen, Meerschweinchen, Affe und Pferd, weniger ausgeprägt bei Isolaten von Nutria und Schwein, schienen nach den vorliegenden Untersuchungen zahlreiche Ähnlichkeiten mit B-Streptokokkenkulturen, isoliert vom Menschen, zu haben. Die B-Streptokokkenkulturen dieser Herkunft unterschieden sich in diesen Merkmalen von B-Streptokokkenkulturen vom Rind. B-Streptokokkenkulturen, vorkommend insbesondere bei Hund und Katze, aber auch bei anderen Tierarten, scheinen somit keine epidemiologische Beziehung für die *S. agalactiae*-Mastitis des Rindes zu haben, könnten aber eine Infektionsquelle für den Menschen darstellen.

7. Summary

In the present investigation 101 streptococcal cultures isolated from dogs, cats, rabbits, guinea pigs, monkeys, horses, nutria, pigs, cattle and humans were identified and further characterized as *Streptococcus agalactiae*, belonging to Lancefield's serological group B by using conventional and molecular methods. The isolated cultures were differentiated biochemically, serologically and by amplification of species-specific parts of the gene encoding the 16S ribosomal RNA, the 16S-23S rDNA intergenic spacer region and by amplification of the CAMP factor gene *cfb* by polymerase chain reaction (PCR).

The investigated group B streptococci were further characterized serologically for specific polysaccharide and protein antigens, partly supported by PCR-amplification of the respective genes. The type antigen patterns mainly observed for group B streptococci isolated from dog, cat, rabbit, guinea pig, monkey, horse, nutria, pig and human origin were III/Rib, Ia and Ia/c α . The group B streptococci isolated from cattle mostly displayed protein antigen X, alone or in combination with polysaccharide antigen Ia.

The group B streptococci, particularly those isolated from dogs and cats but also those isolated from rabbits, guinea pigs, monkeys, horses and humans, less pronounced for isolates from nutria and pigs were predominantly negative in the lactose reaction, orange-red pigmented, showed bacterial growth by formation of short chains and growth in fluid media with a uniform turbidity of the growth media and with diffuse colonies in soft agar. In addition, the isolates displayed a low surface hydrophobicity, an inability to hemagglutinate rabbit erythrocytes and were resistant to minocyclin and tetracycline. In contrast group B streptococci from cattle were lactose positive, weakly or not-pigmented, displayed bacterial growth with relatively long chain formation, growth in fluid media as sediment with clear supernatant and with compact colonies in soft agar. In addition the cattle isolates generally showed an increased surface hydrophobicity, a hemagglutination reaction with rabbit erythrocytes and were sensitive to minocyclin and tetracycline.

Most of the group B streptococci of various origins were hyaluronidase positive demonstrated with a decapsulation test and had a *hylB*-gene amplicon with a size of

3.3 kb. Phenotypically-hyaluronidase-negative strains, generally displayed a *hylB*-gene amplicon of 4.6 kb and an insertion element *I548*. The latter seemed to be independent to the origin of the isolates but related to the occurrence of serotype III and III/Rib.

For the majority of the group B streptococci isolated from dogs, cats, rabbits, guinea pigs, horses and humans the gene *scpB* encoding C5a-peptidase and the gene *lmb* encoding laminin binding protein could specifically be amplified. Only few of the isolates from monkeys, nutria, pigs and cattle had comparable gene patterns.

In the present study group B streptococci, particularly those isolated from dogs and cats as well as cultures isolated from rabbits, guinea pigs, monkeys and horses, less pronounced for group B streptococci from nutria and pigs had similar properties as group B streptococci isolated from humans. The group B streptococci from these various origins differed clearly from group B streptococci from cattle. According to the present observations group B streptococci isolated from dogs and cats as well as from other animal species seem to have no epidemiological relationship with the *S. agalactiae* mastitis of cattle but might be a potential source for infections of humans.

8. Türkçe Özet

Bu sunulan çalışmada köpek, kedi, tavsan, kobay, maymun, at, bataklık kunduzu, domuz, sigir ve insandan izole edilen 101 streptokok kültürü, konvensiyonel ve molekülerbiyolojik metodlar yardımıyla *Streptococcus agalactiae* yani streptokokların serolojik grubu B olarak teshis edildi ve geniş kapsamlı olarak karakterize edildi. Bu konvensiyonel ve moleküler biyolojik metodlar biokimyasal metodlar yardımıyla ayırimsal tani, serolojik grup tayini ve türe özgü 16S ribozomal DNA gen kesitinin, 16S-23S rDNA “intergenic spacer“-bölgesinin ve CAMP-Faktor-Gen *cfb* amplifikasyonun polimerize zincir reaksiyonu (PZR) yardımıyla teshisini içermektedir.

İncelenen bu B-Streptokok kültürleri, kısmen PCR yöntemiyle de teshis edilen, spesifik polisakarid ve protein antijenlerine dayanarak çeşitli serotipler altında gruplandırıldı.

Köpek, kedi, tavsan, kobay, maymun, at, bataklık kunduzu, domuz ve insandan izole edilen bu B-Streptokok kültürleri özellikle III/Rib, Ia/c α und Ia/c β tipantigen örneklerini gösterildiler. Buna karşın sigirlardan izole edilen B-Streptokok kültürlerinde Proteinantigen X tek başına veya Polisakarid antijeni Ia ile birlikte tespit edildi.

Özellikle köpek ve kediden, ama aynı zamanda tavsan, kobay, maymun, at ve insandan ve daha az olarakta bataklık kunduzu ve domuzdan izole edilen B-Streptokoklar, sigirdan izole edilen B-Streptokoklarla karşılaştırılmasında ağırlıklı olarak negatif laktoz reaksiyonu, belirgin bir pigment üretimi, biraz daha kısa tipik streptokok zincir uzunluğu, sıvı besi yerinde genellikle homojen bulanıklık veya Soft Agarda bakteri kolonilerinin diffüz üremesi, bakteri yüzeyinde düşük oranda hydrophobi, Hemagglutinasyon yeteneğinin eksikliği ve ağırlıklı olarak Minocyclin ve Tetracycline karşı rezistans özellikleri gösterdiler. Buna karşın sigirdan izole edilen B-Streptokok kültürleri pozitif laktoz reaksiyonu, zayıf pigment oluşumu veya pigmentsizlik, oldukça uzun zincir formasyonu, ayrıca sıvı besi yerinde sedimentasyon sonucu saydamlık veya Soft Agar’da kompakt koloni oluşumu, yüksek düzeyde

hidrofobi, ağırlıklı oranda tavşan eritrositlerinde Hemagglutinasyon reaksiyonu ve Minocyclin ve Tetracycline karsi duyarlılık özellikleri saptandı.

Hyaluronidase enziminin teşhisinde kültürlerin çoğunluğunda orijinlerine bağımlı olmaksızın, dekapsulation testi yoluyla pozitif hyaluronidase reaksiyonu; Hyaluronidase-Gen *hylB* ve Insertion Elementi'nin (IS1548) PZR metoduyla tespitiyle de 3,3 Kb büyüklüğünde *hylB*-Geni ispat edildi. Orijinlerinden bağımsız olarak negatif Hyaluronidase reaksiyonu 4,6 Kb büyüklüğünde *hylB*-Geni ve Insertion elementi (IS1548) B-Streptokok kültürlerinin III ve III/Rib serotipleriyle birlikte saptandı.

Maymun, bataklık kunduzu, domuz ve sigirdan izole edilen B-Streptokok kültürlerinin aksine köpek, kedi, tavşan, kobay, at ve insandan izole edilen B-Streptokok kültürlerinin cogunlugunda ve PZR metoduyla C5a-Peptidase-geni *scpB* ve Laminin-baglayıcı protein-geni *lmb* tespit edildi.

Yapılan bu calismada özellikle köpek ve kedi ve bunun yanında tavşan, kobay, maymun ve attan ama daha az belirgin olarakta bataklık kunduzu ve domuzdan izole edilen B-Streptokok kültürleri insandan izole edilen B-Streptokok kültürlerine benzerlikler gösterdiler. Yukarıda belirtilen kaynaklardan izole edilen B-Streptokok kültürleri gösterdikleri bu karakteristik özellikler bakımından sigirlardan izole edilen B-Streptokok kültürlerinden farklıdır. Özellikle köpek ve kediden ve bunula beraber diğer hayvan türlerinde izole B-Streptokok kültürleri, sigirlardaki *S. agalactiae*-mastitis ile epidemiyolojik bir ilişkisi olmamasına karsin insanlar için enfeksiyon kaynagi olusturabilirler.

9. Literaturverzeichnis

- ABDULMAWJOOD, A., WEIß, R., und LÄMMLER, CH., 1998:
Species identification of *Streptococcus porcinus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA.
Res. Vet. Sci. 65: 85-86
- ABDULMAWJOOD, A., und LÄMMLER, CH., 1999:
Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B.
Res. Vet. Sci. 67: 159-162
- ABRAHAM, S. N., BEACHEY, E. H., und SIMPSON, W. A., 1983:
Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells.
Infect. Immun. 41: 1261-1268
- ADDERSON, E. E., TAKAHASHI, S., und BOHNSACK, J.F., 2000:
Bacterial genetics and human immunity to group B streptococci.
Mol. Genet. Metab. 71: 451-454
- AHMET, Z., STANIER, P., HARVEY, D., und HOLT, D., 1999:
New PCR primers for the sensitive detection and specific identification of group B beta-hemolytic streptococci in cerebrospinal fluid.
Mol. Cell. Probes. 13 : 349-357
- AMBORSKI, R. L., SNIDER III, T. G., THUNE, R. L., und CULLER, D. D. 1983:
A non-hemolytic, group B *Streptococcus* infection in cultured Bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil.
J. Wildlife Dis. 19: 180-184
- ARESCHOU, T., STALHAMMAR-CARLEMALM, M., LARSSON, C., und LINDAHL, G., 1999:
Group B streptococci surface proteins as targets for protective antibodies: Identification of two novel proteins in strains of serotype V.
Infect. Immun. 67: 6350-6357
- ARNOLD, R. R., BREWER, M., und GAUTHIER, J. J., 1980:
Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms.
Infect. Immun. 28: 893-898
- BACK, S. A., O'NEILL, T., FISHBEIN, G., und GWINUP, G., 1990:
A case of group B streptococcal pyomyositis.
Rev. Infect. Dis. 12: 784-787
- BAGG, J. POXTON, I. R., WEIR, D. M., und ROSS, P. W., 1982:
Binding of type III group B streptococci to buccal epithelial cells.
J. Med. Microbiol. 15: 363-372

- BAKER, C. J., und BARETT, F. F., 1974:
Group B streptococcal infections in infants. The importance of the various serotypes.
J. Am. Med. Assoc. 230: 1158-1160
- BAKER, C. J., KASPER, D. L., und DAVID, C. E., 1976:
Immunochemical characterization of the "native" type III polysaccharide of group B *Streptococcus*.
J. Exp. Med. 143: 258-270
- BAKER, C. J., und KASPER, D. L., 1976a:
Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection.
N. Engl. J. Med. 294: 753-756
- BAKER, C. J., EDWARDS, M. S., und KASPER, D. L., 1978:
Immunogenicity of polysaccharides from type III group B *Streptococcus*.
J. Clin. Invest. 61: 1107-1110
- BAKER, C. J., 1980:
Group B streptococcal infections.
In: STOLLERMAN, G. H., (Hrsg.):
Advances in Internal Medicine.
Year Book Medical Publishers Inc., Chicago, USA. 25: 475-501
- BAKER, C. J., KASPER, D. L., WEBB, B. J., und EDWARDS, M. S., 1986:
The role of complement and antibody in opsonophagocytosis of type II group B streptococci.
J. Infect. Dis. 154: 47-54
- BAKER, C. J., 1990:
Immunization to prevent group B streptococcal disease: victories and vexations.
J. Infect. Dis. 161: 917-921
- BAKER, C. J., und EDWARDS, M. S., 1995:
Group B streptococcal infections.
In: REMINGTON, J. S., und KLEIN, J. O., (4th Hrsg.)
Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Lee and Philadelphia, USA.
- BAKER, C. J., 1997:
Group B streptococcal infections.
Clin. Perinatol. 24: 59-70
- BARY, G. T., 1958:
Colominic acid, a polymer of N-acetylneuraminic acid.
J. Exp. Med. 107: 507-512

- BARRY, A. A., und THORNSBERRY, C., 1991:
Susceptibility tests: diffusion test procedures.
In: BALOWS, A., HAUSLER, W. H., HERRMANN, K. L., ISENBERG, H. D., und SHADOMY, H. J. (5th Hrsg.): Manual of Clinical Microbiology,
Am. Soc. Microbiol., Washington D. C., USA. 1117-1125
- BARTFIELD, A. A., 2001:
Bacterial meningitis.
Prim. Care. Update. Ob. Gyns. 7 : 49-54
- BASEGGIO, N., MANSELL, P. D., BROWNING, J. W., und BROWNING, G. F., 1997:
Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis.
Mol. Cel. Prob. 11: 349-354
- BAUER, T. M., PIPPERT, H., und ZIMMERLI, W., 1997:
Vertebral osteomyelitis caused by group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*) secondary to urinary tract infection.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16 : 244-246
- BECKER, H., 1994:
Streptococcus agalactiae (Group B streptococci).
In: The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk.
Published by International Dairy Federation. Brussels, Belgium. 43-54
- BENTLEY, R. W., LEIGH, J. A., und COLLINS, M. D., 1991:
Intragenetic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences.
Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 487-494
- BENTLEY, R. W., LEIGH, J. A., und COLLINS, M. D., 1993:
Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*.
J. Clin. Microbiol. 31: 57-60.
- BENTLEY, R. W., und LEIGH, J. A., 1995:
Development of PCR-based hybridisation protocol for identification of streptococcal species.
J. Clin. Microbiol. 33: 1296-1302
- BERGGARD, I., und BEARN, A. G., 1968:
Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -microglobulin occurring in human biological fluids.
J. Biol. Chem. 243: 4095-4103
- BERGNER-RABINOWITZ, S., FERNE, M., und HALFON, S. T., 1980:
Group B streptococci: different serotypes associated with clinical infections.
Lab. Pract. 29: 733-734

- BERGNER-RABINOWITZ, S., FERNE, M., FLEIDERMAN, S., ZIV, G., SARAN, A., und WINKLER, M., 1981:
Group G type X: a new antigenic combination in streptococci isolated from cases of bovine mastitis in Israel.
Vet. Microbiol. 6: 383-387
- BERKOWITZ, K., REGAN, J. A., und GREENBERG, E., 1990:
Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in pregnant women.
J. Clin. Microbiol. 27: 5-7
- BERNER, R., BENDER, A., RENSING, C., FORSTER, J., und BRANDIS, M., 1999:
Low prevalence of the immunoglobulin-A-binding β antigen of the c protein among *Streptococcus agalactiae* isolates causing neonatal sepsis.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18: 545-550
- BERNER, R., RUESS, M., BERESWILL, S., und BRANDIS, M., 2002:
Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein beta-antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences.
Pediatr. Res. 51: 106-111
- BERNHEIMER, A. W., LINDER, R. und AVIGAD, L. S., 1979:
Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci.
Infect. Immun. 23: 838-844
- BERRIDGE, B. R., BERCOVIER, H., und FRELIER P. F., 2001:
Streptococcus agalactiae and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR.
Vet. Microbiol. 78 : 165-173
- BEVANGER, L., und MAELAND, J. A., 1979:
Complete and incomplete Ibc protein fractions of group B streptococci.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 87: 51-54
- BEVANGER, L., 1983:
Ibc proteins as serotype markers of group B streptococci.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 91: 231-234
- BEVANGER, L., und IVERSEN, O., 1983:
The Ibc protein fraction of group B streptococci.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 89: 205-209
- BEVANGER L., IVERSEN, O., und NAESS, A. L., 1992:
Characterization of the α antigen of the c proteins of a group B streptococci (GBS) using a murine monoclonal antibody.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 100: 57-62

- BILLINGS, D. E., COONEY, E. W., und GRAY, B. M., 1994:
Binding of human proteins to the capsular surface of group B streptococci.
Pathogenic Streptococci: Present and Future
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and
Streptococcal Diseases, 6.-10.9.1993 St. Petersburg, Russia. Proceedings:
339-340
- BHUTTA, Z. A., und YUSUF, K., 1997:
Early-onset neonatal sepsis in Pakistan: a case control study of risk factors
in a birth cohort.
Am. J. Perinatol. 14: 577-581
- BLOBEL, H., und SCHLIEßER, T., (Hrsg.) 1991:
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.
Band I. 2. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Jena.
- BÖGLI, C., HOFER, A., und FURLAN, M., 1988:
Isolation of fibrinogen α -chain by affinity chromatography on
concanavalin α -Sephadex.
Thromb. Haemost. 60: 308-310
- BOHNSACK, J. F., ZHOU, X., WILLIAMS, P. A., CLEARY, P. P., PARKER,
C. J., und HILL, H. R., 1991:
Purification of the protease from group B streptococci that inactivates
human C5a.
Biochim. Biophys. Acta 1079: 222-228
- BOHNSACK, J. F., CHANG, J. K., und HILL, H. R., 1993:
Restricted ability of group B streptococcal C5a-ase to inactivate C5a
prepared from different animal species.
Infect. Immun. 61: 1421-1426
- BOHNSACK, J. F., TAKAHASHI, S., HAMMITT, L., MILLER D. V., ALY, A.
A., und ADDERSON, E. E., 2000:
Genetic polymorphisms of group B *Streptococcus* scpB alter functional
activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a.
Infect. Immun. 68: 5018-5025
- BOHNSACK, J. F., TAKAHASHI, S., DETRICK, S. R., PELINKA, L. R.,
HAMMITT, L. L., ALY, A. A., WHITING, A. A., und ADDERSON, E.
E., 2001:
Phylogenetic classification of serotype III group B streptococci on the
basis of hylB gene analysis and DNA sequences specific to restriction
digest pattern type III-3.
J. Infect. Dis. 183: 1694-1697
- BOPP, V., 1994:
Vergleichende Untersuchung von Streptokokken der serologischen
Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*) isoliert von Rindern in Thüringen
und Hessen. Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen.

- BOPP, V., und LÄMMLER, C., 1994:
Comparative studies on novel protein antigens of streptococci of the serological group B.
Med. Microbiol. Lett. 3: 291-299
- BOULNOIS, G. J., und JANN, K., 1989:
Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 150: 1-18
- BRADY, L. J., DAPHTARY, U. D., AYOUB, E. M., und BOYLE, M. D. P., 1988:
Two novel antigens associated with group B streptococci identified by a rapid two-stage radioimmunoassay.
J. Infect. Dis. 158: 965-972
- BRANDIS, H., EGGERS, H. J., KÖHLER, W., und PULVERER, G., 1994:
Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Unterabschnitt
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.
- BRGLEZ, I., 1981:
A contribution to the research of infection of cows and humans with *Streptococcus agalactiae*.
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. Ser. B 172: 434-439
- BRGLEZ, I., 1983:
Pigment production in human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains.
Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. Ser. B 177: 533-538.
- BRIDGE, P. D., und SNEATH, P. H. A., 1983:
Numerical taxonomy of *Streptococcus*.
J. Gen. Microbiol. 129: 565-597
- BROWN, J., FARNSWORTH, R., WANNAMAKER, L. W., und JOHNSON, D. W., 1974:
CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows.
Infect. Immun. 9:377-383
- BROWN, M. B., und ROBERTS, M. C., 1991:
Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland.
Vet. Microbiol. 29: 173-180
- BRÜCKLER, J., WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1990:
CAMP-reaction among skin isolates obtained from a dog with acute squamous eczema.
J. Vet. Med. B 37: 767-769

- BULGAKOVA, T. N., GOLUBKOV, V., und TOTOLIAN, A., 1992:
Transposon mutagenesis of type-specific antigen Ia in group B streptococci.
In: OREFICI, G., (Hrsg.):
New Perspectives on Streptococci and Streptococcal Infections.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
Zbl. Bakt. Suppl. 22: 371-373
- BUTLER, K. M., BAKER, C. J., und EDWARDS, M. S., 1987:
Interaction of soluble fibronectin with group B streptococci.
Infect. Immun. 55: 2404-2408
- BUTTER, M. N. W., und De MOOR, C. E., 1967:
Streptococcus agalactiae as a cause of meningitis in the newborn and bacteremia in adult. *Antonie van Leeuwenhoek*,
J. Microbiol. 33: 439-450
- BUU-HOI, A., BOUGUENEC, C. L. E., und HORAUD, T., 1990:
High-level chromosomal gentamicin resistance in *Streptococcus agalactiae* (group B).
Antimicrob. Agents Chemother. 34: 985-988
- CAMPBELL, J. R., HILLIER, S. L., KROHN, M. A., FERRIERI, P., ZALEZNIK, D. F., und BAKER, C. J., 2000:
Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery.
Obstet. Gynecol. 96: 498-503
- CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION 1996:
Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 45, RR-7: 1-24
- CHAFFIN, D. O., BERES, S. B., YIM, H. H., und RUBENS, C. E., 2000:
The serotype of type Ia and III group B streptococci is determined by the polymerase gene within the polycistronic capsule operon.
J. Bacteriol. 182: 4466-4477
- CHEN, C. C., und CLEARY, P. P., 1989:
Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: Linkage to the type 12 M protein gene.
Infect. Immun. 57: 1740-1745
- CHEN, C. C., und CLEARY, P. P., 1990:
Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*.
J. Biol. Chem. 265: 3161-3167
- CHHATWAL, G. S., LÄMMLER, CH., und BLOBEL, H., 1984:
Guanidine extraction enhances the binding of human fibrinogen to group B streptococci.
Med. Microbiol. Immunol. 173: 19-27

- CHHATWAL, G. S., DUTRA, I. S., und BLOBEL, H., 1985:
Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A, B, C and G streptococci.
Microbiol. Immunol. 30: 155-164
- CHHATWAL, G. S., LÄMMLER, CH., DUTRA, I. S., und BLOBEL, H., 1985b:
Specific binding of human immunoglobulin G to group L and U streptococci.
In: KIMURA, Y., KATAMI, S., und SHIOKAVA, Y., (Hrsg.): Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases. Reedbooks Ltd., Chertsey, Surrey. UK. 98-100
- CHHATWAL, G. S., DUTRA, I. S., und BLOBEL, H., 1986:
Specific binding sites for monomeric and aggregated β_2 -microglobulin on surface of groups A, B, C and G streptococci.
Microbiol. Immunol. 30: 155-164
- CHHATWAL, G. S., und BLOBEL, H., 1987:
Heterogeneity of fibronectin reactivity among streptococci as revealed by binding of fibronectin fragments.
Comp. Immun. Infect. Dis. 10: 99-108
- CHMOURYGUINA, I., SUVOROV, A., FERRIERI, P., und CLEARY, P., 1996:
Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci.
Infect. Immun. 64: 2387-2390
- CHRISTIE, R., ATKINS, N. E., und MUNCH-PETERSEN, E., 1944:
A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.
Aust. J. Exp. Biol. 22: 197-200.
- CHUN, C. Y. S., BRADY, L. J., BOYLE, M. D. P., DILLON, H. C., und AYOUB, E. M., 1991:
Group B streptococcal c protein-associated antigens: association with neonatal sepsis.
J. Infect. Dis. 163: 786-791
- CIESLEWICZ, M. J., KASPER, D. L., WANG, Y., und WESSELS, M. R., 2001:
Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci.
J. Biol. Chem. 276: 139-146
- CLEARY, P., HANDLEY, J., SUVOROV, A., PODBIELSKI, A., und FERRIERI, P., 1992:
Similarity between the group B and A streptococcal C5a peptidase genes.
Infect. Immun. 60: 4239-4244

- CLEAT, P. T., und TIMMIS, K. N., 1987:
Cloning and expression in *Escherichia coli* of the Ibc protein genes of group B streptococci: binding of human immunoglobulin A to the beta antigen.
Infect. Immun. 55: 1151-1155
- COLMAN, G., 1988:
Typing of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B).
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7: 226-231
- CONDRADS, G., PODBIELSKI, A., und LÜTTICKEN, R., 1991:
Molecular cloning and nucleotide sequence of the group B streptococcal hemolysin.
Zbl. Bakt. 275: 179-184
- COOPER, B. W., und MORGANELLI, E., 1998:
Group B streptococcal bacteremia in adults at Hartford Hospital 1991-1996.
Conn. Med. 62: 515-517
- CORNACCHIONE, P., BISTONI, F., TISSI, L., MOSCI, P., OREFICI, G., und MARCONI, P., 1992:
Septic arthritis induced in mice by systemic infection with different serotypes of group B streptococci.
In: OREFICI, G., (Hrsg.)
New Perspektive on Streptococci and Streptococcal Infections.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
Zbl. Bakt. Suppl. 22: 446-450
- CURTIS, S. N., und KRAUSE, R. M., 1964:
Identification of rhamnose as an antigenic determinant of group B streptococcal carbohydrate.
Fed. Proc. 23: 191-193
- DAL, M. C., und MONTEIL, H., 1983:
Hemolysin produced by group B *Streptococcus agalactiae*.
FEMS Microbiol. Lett. 16: 89-94
- DEBRA, S. H., MICHEL, J. L., AUSUBEL, F. M., KASPER, D. L., und MADOFF, L. C., 1993:
Constructs of group B streptococcal alpha c protein containing variable numbers of tandem repeats express immunoreactive protein products.
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6.-10.9.1993 St. Petersburg, Russia. Proceedings: 335-362
- DEVRIESE, L. A., 1991:
Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes.
J. Appl. Bacteriol. 71: 478-483

- DINSMORE, R. P., ENGLISCH, P. B., GONZALEZ, R. N., SEARS, P. M., und SCHULTE, H. F., 1991:
Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 74: 1521-1526
- DMITRIEV, A., SUVOROV, A. N., und TOTOLIAN, A. A., 1997:
Heterogeneity of the group B streptococci genome.
Folia Vet. 41: 77-80
- DMITRIEV, A., TKACIKOVA, L., SUVOROV, A., KANTIKOVA, M., MIKULA, I., und TOTOLIAN, A. A., 1999:
Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin.
Folia. Microbiol. (Praha) 44: 449-453
- DORAN, T. I., STRAUSS, D. C., und MATTINGLY, S. J., 1981:
Factors influencing release of type III antigens by group B streptococci.
Infect. Immun. 30: 890-893
- DOW, S. W., JONES, R. L., THOMAS, T. N., LINN, K. A., und HAMILTON H. B., 1987:
Group B streptococcal infection in two cats.
J. Vet. Med. Assoc. 190: 71-72
- DURHAM, D. L., MATTINGLY, S. J., DORAN, T. I., MILLIGAN, T. W., und STRAUSS, D. C., 1981:
Correlation between the production of extracellular substances by type III group B streptococcal strains and virulence in a mouse model.
Infect. Immun. 34: 448-454
- DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (DVG), 1994:
Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Sachverständigenausschuss „Subklinische Mastitis“. Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft-Kiel, im Nov. 3 Auflage. 6-22
- EASMON, C. S. F., COX, S. E., und HOWARD, A., 1980:
Grouping of beta-hemolytic streptococci by agglutination.
J. Clin. Pathol. 33: 386-389
- EASMON, C. S. F., 1986:
The carrier state: group B *Streptococcus*
J. Antimicrobiol. Chemother. 18: 59-65
- EDELSTEIN, R. M., und PEGRAM, R. G., 1974:
Contagious skin necrosis of Somali camels associated with *Streptococcus agalactiae*.
Trop. Anim. Health Prog. 6: 255-256
- EDERER, G. M., HERRMANN, M. M., BRUCE, R., MATSEN, J. M., und CHAPMAN, S. S., 1972:
Rapid extraction method with pronase B for grouping beta-hemolytic streptococci.
Appl. Microbiol. 26: 285-288

- EDWARDS, E. A., und LARSON, G. A., 1974:
New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination specifically sensitized protein A-containing staphylococci.
Appl. Microbiol. 28: 972-976
- EDWARDS, E. A., NICHOLSON-WELLER, A., BAKER, C. J., und KASPER, D. L., 1980:
The role of specific antibody in alternative complement pathway mediated opsonophagocytosis of type III, group B *Streptococcus*.
J. Exp. Med. 151: 1275-1287
- EDWARDS, M. S., KASPER, D. L., JENNINGS, H. J., BAKER, C. J., und NICHOLSON-WELLER, A., 1982:
Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci.
J. Immunol. 128: 1278-1283
- EGAN, M. L., PRITCHARD, D. G., DILLON, H. C., und GRAY, B. M., 1983:
Protection of mice from experimental infection with type III group B *Streptococcus* using monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 158: 1006-1011
- EL KOHYL, A., WANNAMAKER, L. W., und KRAUSE, R. M., 1978:
Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci.
Appl. Microbiol. 28: 836-839
- ELLIOTT, J. A., FACKLAM, R. R., und RICHTER, C. B., 1990:
Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish.
J. Clin. Microbiol. 28: 627-630
- ELLIOTT, J. A., FARMER, K. D., und FACKLAM, R. R., 1998:
Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type.
J. Clin. Microbiol. 36: 2115-2116
- ESTUNINGSIH, S., SOEDARMANTO, I., FINK, K., LÄMMLER, CH., und WIBAWAN, I. W. T., 2002:
Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia.
J. Vet. Med. (in press).
- FACKLAM, R. R., 1976:
A review of the microbiological techniques for the isolation and identification of streptococci.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 6: 287-317

- FACKLAM, R. R., und CAREY, A. B., 1985:
Streptococci.
In: LENNETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER, W. J., und SHADOMY, H. J., (4th Hrsg.):
Manual of Clinical Microbiology.
Am. Soc. Microbiol., WASHINGTON, D. C. USA.
- FARLEY, M. M., HARVEY, R. C., STULL, T., SMITH, J. D., SCHUCHAT, A., WEGNER, J. D., und STEPHENS, D. S., 1993:
A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults.
N. Engl. J. Med. 328: 1807-1811
- FARLEY, M. M., 2001:
Group B streptococcal disease in nonpregnant adults.
Clin. Infect. Dis. 33: 556-561
- FERRIERI, P., 1988:
Surface-localized protein antigens of group B streptococci.
Rev. Infect. Dis. 10: 363-365
- FERRIERI, P., FLORES, A. E., CONCEPCION, N. F., und ANTHONY, B. F., 1992:
Bacterial surface expression and recognition of the IgA binding protein of group B streptococci.
In OREFICI, G., (Hrsg.):
New Perspective on Streptococci and Streptococcal Infections.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
Zbl. Bakt. Suppl. 22: 186-188
- FINCH, L. A. und MARTIN D. R., 1984:
Human and bovine group B streptococci: two distinct populations.
J. Appl. Bacteriol. 57: 273-278
- FINK, K., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, CH., und ZSCHÖCK, M., 2000:
Genotypisierung von *Streptococcus agalactiae*-Kulturen, isoliert von subklinischen Rindermastitiden.
41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft vom 25 bis 28 September, 2000 in Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 177-182
- FINK, K., LÄMMLER, CH., und YOUNAN, M., 2000a:
Identifizierung und weitergehende Charakterisierung von *Streptococcus agalactiae* isoliert von Mastitiden und von weiteren Infektionen des Kamels (*Camelus dromedarius*). 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft vom 25 bis 28 September, 2000 in Garmisch-Partenkirchen, Tagungsbericht, 713-718

- FLORES, A. E., und FERRIERI, P., 1989:
Molecular species of R-protein antigens produced by clinical isolates of group B streptococci.
J. Clin. Microbiol. 27: 1050-1054
- FLORES, A. E., und FERRIERI, P., 1993:
Characterization of trypsin resistant proteins of group B streptococci (GBS).
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6.-10. 9. 1993 St. Petersburg, Russia. Proceedings: 39-45
- FORNINI, Q., 1958:
Streptococcus agalactiae, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis* in Rinder- und Schweine tonsillen.
Veterinaria Ital. 2: 201-206
- FORSGRÉN, A., und SJÖQUIST, J., 1966:
"Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human γ -globulin.
J. Immunol. 97: 822-827
- FORSMAN, P., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., und ALATOSSAVA, T., 1997:
Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions.
Microbiol. 143: 3491-3500
- FOX, L. K., GAY, J. M., 1993:
Contagious mastitis.
Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 9: 475-487
- FRANKEN, C., BRANDT, C., WEBER-HEYNEMANN, J., MARTIN, S., LÄMMLER, CH., PODBIELSKI, A., LÜTTICKEN, R., und SPELLERBERG, B., 2001:
Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*.
Mol. Microbiol. 41: 925-935
- FROST, A. J., WANASINGHE, D. D., und WOOLCOCK, J. B., 1977:
Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland.
Infect. Immun. 15: 245-253
- FUHRMANN, C., und LÄMMLER, CH., 1996:
Adherence of haemagglutinating *Rhodococcus equi* to murine macrophages.
Med. Sci. Res. 24: 291-293
- FULLER, A. T., 1938:
The formamide method for the extraction of polysaccharide from haemolytic streptococci B.
J. Exp. Pathol. 19: 130-139

- FUNK, D. A., FREEMAN, A. E., und BERGER, P. J., 1982:
Environmental and physiological factors affecting mastitis at drying off and postcalving.
J. Dairy. Sci. 65: 1258-1268
- GANTEN, D., und RUCKPAUL, K., 2000:
In: Monogen bedingte Erbkrankheiten - Teil 1.
GANTEN, D., und RUCKPAUL, K., (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- GARCIA, S., COMBALIA, A., und SEGUR, J. M., 1996:
Septic arthritis of the shoulder due to *Streptococcus agalactiae*.
Acta Orthop. Belg. 62: 66-68
- GARCÍA-MARTÍNEZ, J., ACINAS, S. G., ANTÓN, A. S., und RODRÍGUEZ-VALERA, F., 1999:
Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity.
J. Microbiol. Methods. 36: 55-64
- GASE, K., OZEGOWSKI, J., und MALKE, H., 1998:
The *Streptococcus agalactiae* *hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis.
Biochim. Biophys. Acta 1398: 86-98
- GASE, K., FERRETTI, J. J., PRIMEAUX, C., und MCSHAN, W. M., 1999:
Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci.
Infect. Immun. 9: 4725-4731
- GEORGE, C. S., 1954:
Streptococcus agalactiae begleitet von multipler Abszessbildung bei einem kürzlich eingefangenen Elefanten.
Ceylon Vet. J. 2: 95
- GERLACH, D., und KÖHLER, W., 1972:
Die Bildung und Isolierung von Streptokokken Hyaluronidase.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 211: 166-172
- GOODRUM, K. J., und POULSON-DUNLAP, J., 2002:
Cytokine responses to group B streptococci induce nitric oxide production in respiratory epithelial cells.
Infect. Immun. 70: 49-54
- GRANLUND, M., ÖBERG, L., SELLIN, M., und NORGRÉN, M., 1998:
Identification of a novel insertion element, IS 1548, in group B streptococci, predominantly in strains causing endocarditis.
J. Infect. Dis. 177: 967-976
- GRAY, B. M., DILLON Jr., H. C., und PRITCHARD, D. G., 1985:
Seroepidemiologic studies of group B *Streptococcus* type II.
J. Infect. Dis. 151: 1973-1980

- GRAY, B. M., DILLON Jr., H. C., und PRITCHARD, D. G., 1988:
Specificity of monoclonal antibodies against group B *Streptococcus* type II and inhibition of their binding by human secretions.
Ped. Res. 24: 68-72
- GROSSENBACHER, E., 1951:
Zur Frage des Vorkommens und der Lebensfähigkeit der Galtstreptokokken außerhalb des Kuheuters.
Vet. Med. Diss., Universität Bern.
- GUPTA, N., und STARK, D. M., 1973:
Lancefield grouping of streptococci isolated from guinea pig mammary gland and milk.
Am. J. Vet. Res. 34: 1111
- GUTTEBERG, T. J., DALAKER, K., und VORLAND, L. H., 1990:
Early response in neonatal septicemia. The effect of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and tumor necrosis factor on the generation of lactoferrin.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 98. 1027-1032
- HAHN, H., 1980:
Streptokokken.
In: BLOBEL, H., und SCHLIEßER, T., (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II: VEB Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart
- HAHN, H., 1981:
Ergebnisse aus der Streptokokken-Zentrale in Kiel von 1965 bis 1978—Mastitis-Streptokokken
Zbl. Bakt. 249: 323-340
- HAHN, H., FALKE, D., KAUFMANN, S. H. E., und ULLMANN, U., 1999:
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Dritte, komplett überarbeitete und aktualisierte Auflage.
Springer-Verlag, Berlin.
- HARDIE, J. M., und WHILEY, R. A., 1997:
Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*.
Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 26: 1-11
- HARRISON, L. H., DWYER, D. M., und JOHNSON, J. A., 1995:
Emergence of serotype V group B streptococcal infection among infants and adults.
J. Infect. Dis. 171: 513
- HARRISON, L. H., ELLIOTT, J. A., DWYER, D. M., LIBONATI, J. P., FERRIERI, P., BILLMANN, L., und SCHUCHAT, A., 1999:
Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program.
J. Infect. Dis. 177: 998-1002

- HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., YILDIRIM, A. Ö., FINK, K., LÄMMLER, C., und SCHLENSTEDT, R., 2000:
Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes.
Can. J. Microbiol. 46: 946-951
- HASSAN, A. A., KHAN, I. U., ABDULMAWJOOD, A., und LÄMMLER, C., 2001:
Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*.
J. Clin. Microbiol. 39: 1618-1621
- HASTY, D. L., JONES, K. R., TOBIAN, J. A., LEBLANC, D. J., und MARCINA, F. L., 1992:
Multiple adhesins of streptococci.
Infect. Immun. 45: 13-17
- HEDÉN, L. O., FRITHZ, E., und LINDAHL, G., 1991:
Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragment with IgA-binding capacity.
Eur. J. Immunol. 21: 1481-1490
- HEIDELBERGER, M., DAVIE, J. M., und KRAUSE, R. M., 1967:
Crossreactions of the group-specific polysaccharides of streptococcal groups B and G in anti-pneumococcal sera with especial reference to type XIV and its determinants.
J. Immunol. 99: 794-796
- HEJLICEK, K., 1994:
In: Euter- und Gesäugekrankheiten.
Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H. und Fuchs, H.-W. (Hrsg);
Gustav Fischer Verlag, Jena - Stuttgart: 332-346
- HENRICHSEN, J., FERRIERI, P., JELINKOVA, J., KÖHLER, W., und MAXTED, W. R., 1984:
Nomenclature of antigens of group B streptococci.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 500
- HICKMAN, M. E., RENCH, M. A., FERRIERI, P., und BAKER, C. J., 1999.
Changing epidemiology of group B streptococcal colonization.
Pediatrics. 104: 203-209
- HILL, H. R., BOHNSACK, J. F., MORRIS, E. Z., AUGUSTINE, N. H., PARKER, C. J., CLEARY, P. P., und WU, J. T., 1988:
Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement.
J. Immunol. 141: 3551-3556

- HILL, H. R., AUGUSTINE, N. H., WILLIAMS, P. A., BROWN, E. J., und BOHNSACK, J. F., 1993:
Mechanism of fibronectin enhancement of group B streptococcal phagocytosis by human neutrophils and culture-derived macrophages.
Infect. Immun. 61: 2334-2339
- HOFFMANN, H., 1991:
Impfstoffe und Impfstoffherstellung (*Streptococcus agalactiae*).
In: BLOBEL, H., und SCHIEßER, T., (Hrsg.)
Bakterielle Infektionen bei Tieren.
Band I; 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 484-486
- HOFFMANN, R., 1972:
Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung von Streptokokken unterschiedlicher serologischer Gruppen in Milch.
Monatsh. Vet. Med. 27: 472-474
- HOMMEZ, J., DEVRIESE, L. A., CASTRYCK, F., und MIRY, C., 1991:
Beta-hemolytic streptococci from pigs: Bacteriological diagnosis.
J. Vet. Med. B 37: 441-444
- HOSHINA, K., KADOI, N., NISHIDA, H., KANEKO, K., und MATSUDA, S., 1994:
Recent status of group B streptococcal (GBS) infection of newborn in Japan. Nippon Sanka Fujinka Gakkai.
Zasshi. 46: 497-502
- HWANG, M.-N., und EDERER, G. M., 1975:
Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci.
J. Clin. Microbiol. 1: 114-115
- HYNES, R., 1985:
Molecular biology of fibronectin.
Annu. Rev. Cell Biol. 1: 67-90
- JAIN, N. C., 1979:
Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis.
J. Dairy Sci. 62: 128-134
- JAYARAO, B. M., DORÉ, J. J. E., und OLIVER, S. P., 1992:
Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin.
J. Clin. Microbiol. 30: 2235-2240
- JELINKOVA, J., 1977:
Group B streptococci in the human population.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 76: 127-165
- JELINKOVA, J., und HEESCHEN, W., 1969:
B-Streptokokken bei Menschen und Rind. I. Mitt.: Ergebnisse der serologischen Typisierung.
Zbl. Bakt. 209: 315-324

- JELINKOVA, J., und MOTLOVA, J., 1985:
Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V.
J. Clin. Microbiol. 21: 361-362
- JENSEN, N. E., 1980:
Distrubution of serotypes of group B streptococci in herds and cows within an aera of Denmark.
Acta. Vet. Scand. 21: 354-366
- JENNINGS, H. J., ROSELL, K. G., und KASPER, D. L., 1980:
Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type III group B *Streptococcus*.
Can. J. Biochem. 58: 112-120
- JENNINGS, H. J., KATZENELLENBOGEN, E., LUGOWSKI, C., und KASPER, D. L., 1983:
Structure of native polysaccharide antigens of type Ia and Ib group B *Streptococcus*.
Biochemistry. 22: 1258-1264
- JENNINGS, H. J., ROSELL, K. G., KATZENELLENBOGEN, E., und KASPER, D. L., 1983a:
Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II group B *Streptococcus*.
J. Biol. Chem. 258: 1293-1298
- JENSEN, N. E., 1982:
Experimental bovine group B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin.
Nord. Vet. Med. 34: 441-450
- JENSEN, N., und AARESTRUP, F. 1996:
Epidemiologic aspects of group B streptococci of bovine and human origin.
Epidemiol. Infect. 117: 417-422
- JERLSTRÖM, P. G., CHHATWAL, G. S., und TIMMIS, K. N., 1991:
The IgA-binding β antigen of the c protein complex of group B streptococci: Sequence determination of its gene and detection of two binding regions.
Mol. Microbiol. 5: 843-849
- JERLSTRÖM, P. G., TALAY, S. R., VALENTIN-WEIGAND, P., TIMMIS, K. N., und CHHATWAL, G. S., 1996:
Identification of an immunoglobulin A binding motif located in the beta-antigen of the c protein complex of group B streptococci.
Infect. Immun. 64: 2787-2793
- JIANG, M., BABIUK, L. A., und POTTER, A. A., 1996:
Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene *Streptococcus uberis*.
Microb. Pathog. 20: 297-307

- JONSSON, P. und WADSTRÖM, T., 1984:
Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT).
Curr. Microbiol. 10: 203-210
- JOHNSON, P., und FERRIERI, P., 1984:
Group B streptococcal Ibc protein antigen: Distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes.
J. Clin. Microbiol. 19: 506-510
- JÜRGENS, D., FOUAD, Y. Y., SHALABY, I., und FEHRENBACH, F. J., 1985:
Purification and characterization of CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* by hydrophobic interactions chromatography and chromatofocusing.
J. Chromatogr. 348: 363-370
- JÜRGENS, D., STERZIK, B., und FEHRENBACH, F. J., 1987:
Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenity.
J. Exp. Med. 165: 720-732
- KABIR, S., und ALI, S., 1983:
Characterization of surface properties of *Vibrio cholerae*.
Infect. Immun. 39: 1048-1058
- KANTOR, F. S., 1965:
Fibrinogen precipitation by streptococcal M protein. I. Identity of the reactants, and stoichiometry of the reaction.
J. Exp. Med. 121: 848-859
- KASPER, D. L., BAKER, C. J., GALDES, B., KATZENELLENBOGEN, E., und JENNINGS, H. J., 1983:
Immunochemical analysis of immunogenicity of the type II group B streptococcal capsular polysaccharide.
J. Clin. Invest. 7: 260-269
- KE, D., MÉNARD, CH., PICARD, F. J., BOISSINOT, M., OUELLETTE, M., ROY, P. H., und BERGERON, M. G., 2000:
Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci.
Clin. Chemistry 46: 324-331
- KEEFE, G. P., 1997:
Streptococcus agalactiae mastitis: a review.
Can. Vet. J. 38: 429-437
- KIRKEGAARD, M. K., und FIELD, C. R., 1977:
Rapid slide coagulation test for identifying and typing group B streptococci.
J. Clin. Microbiol. 6: 266-270

- KIM, K. S., 1987:
Efficacy of human immunoglobulin and penicillin G in treatment of experimental group B streptococcal infection.
Pediatr. Res. 21: 289-292
- KJEMS, E., PERCH, B., und HENRICHSEN, J., 1980:
Serotypes of group B streptococci and their relation to hyaluronidase production and hydrolysis of salicin.
J. Clin. Microbiol. 11: 111-113
- KLEGERMAN, M. E., BOYER, K. M., PAPIERNIAK, C. K., LEVINE, L., und GOTOFF, S. P., 1984:
Type-specific capsular antigen is associated with virulence in late-onset group B streptococcal type III disease.
Infect. Immun. 44: 124-129
- KLOPPERT, B., WOLTER, W., RIBE, K., und ZSCHÖCK, M., 1999:
Erregerspektrum bei boviner subklinischer Mastitis des Rindes in hessischen Milcherzeugerbetrieben.
Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. in Bad Nauheim vom 13.-16.04.1999: 350-355
- KO, W. C., LEE, H. C., WANG, L. R., LEE, C. T., LIU, A. J., und WU, J. J., 2001:
Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B streptococcal over an eight-year period in Southern Taiwan.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 334-339
- KOGAN, G., UHRÍN, D., BRISSON, J. R., PAOLETTI, L. C., BLODGETT, A. E., KASPER, D. L., und JENNINGS, H. J., 1996:
Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide.
Am. Soc. Biochem. and Mol. Biol. 271: 8786-8790
- KONG, F., GOWAN, S., MARTIN, D., JAMES, G., und GILBERT, G. L., 2002:
Serotype identification of group B streptococci by PCR and sequencing.
J. Clin. Microbiol. 40: 216-226
- KORNBLATT, A. N., ADAMS, R. L., BARTHOLD, S. W. und CAMERON, G. A., 1983:
Canine neonatal deaths associated with group B streptococcal septicemia.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 183: 700-701
- KREIKEMEYER, B., und JERLSTROM, P. G., 1999:
An *Escherichia coli*-*Enterococcus faecalis* shuttle vector as a tool for the construction of a group B *Streptococcus* heterologous mutant expressing the beta antigen (Bac) of the C protein complex.
FEMS Microbiol. Lett. 180: 255-262

- KRONVALL, G., 1973:
A surface component in group A, C, and G streptococci with nonimmune reactivity for immunoglobulin G.
J. Immunol. 111: 1401-1406
- KRONVALL, G., BJÖRCK, L., MYHRE, E. B., und WANNAMAKER, L. W., 1979:
Binding of aggregated β_2 -microglobulin, IgG, IgA and fibrinogen to group-A, -C, and -G streptococci, with special reference to streptococcal M protein. In: PARKER, M. (Hrsg.):
Pathogenic Streptococci. Reedbooks Ltd. Chertsey, Surrey. UK. 74-76
- KUMMENEJE, K., NESBAKKEN, T., und MIKKELSEN, T., 1985:
Streptococcus agalactiae infection in a hamster.
Acta Vet. Scand. 16: 554-556
- KUUSELA, P., 1978:
Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*.
Nature 276: 718-720
- KUUSELA, P., VARTIO, T., VUENTO, M., und MYHRE, E. B., 1984:
Binding sites for streptococci and staphylococci in fibronectin.
Infect. Immun. 45: 433-436
- KWAM, A. I., IVERSEN, O. J., und BEVANGER, L., 1992:
Binding of human IgA to HCl-extracted protein from group B streptococci (GBS).
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 100: 1129-1132
- KWAM, A. I., BEVANGER, L., und IVERSEN, O. J., 1993:
Characterization of a surface protein of group B streptococci resembling the α antigen of the c protein.
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6.-10.9.1993 St. Petersburg, Russia. Proceedings: 525-532
- KWAM, A. I., BEVANGER, L., und MAELAND, J. A., 1999:
Properties and distribution of the putative R3 protein of *Streptococcus agalactiae*.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. 107: 869-874
- LACHENAUER, C. S., MADOFF, L. C., 1997:
Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective surface protein from type V group B streptococci.
Adv. Exp. Med. Biol. 418: 615-618
- LACHENAUER, C. S., KASPER, D. L., SHIMADA, J., ICHIMAN, Y., OHTSUKA, H., KAKU, M., PAOLETTI, L. C., FERRIERI, P., und MADOFF, L. C., 1999:
Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women.
J. Infect. Dis. 179: 1030-1033

- LACHENAUER, C. S., CRETI, R., MICHEL, J. L., und MADOFF, L. C., 2000:
Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci.
Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9630-9635
- LÄMMLER, CH., CHHATWAL, G. S., und BLOBEL, H., 1983a:
Binding of human fibrinogen and its polypeptide chains to group B streptococci.
Med. Microbiol. Immunol. 172: 149-153
- LÄMMLER, CH., CHHATWAL, G. S., und BLOBEL, H., 1983b:
Variations in the binding of mammalian fibrinogen to streptococci of different animal origin.
Med. Microbiol. Immunol. 172: 191-196
- LÄMMLER, CH., PASARIBU, F. H., und BLOBEL, H., 1984
Early recognition of the CAMP-reactivity in group B streptococci.
Zbl. Bakt. Hyg. A258: 183-186
- LÄMMLER, CH., SCHWARZ, S., WIBAWAN, I. W. T., OTT, E., BOPP, V., und MARTINEZ-TAGLE, A., 1985:
Comparison of streptococci of serological group B isolated from healthy carriers and active disease in Chile.
J. Med. Microbiol. 42: 161-164
- LÄMMLER, CH., FREDE, C., und BLOBEL, H., 1986:
Effective murolytic solubilization of streptococcal-group-specific antigen.
J. Clin. Microbiol. 24: 903-904
- LÄMMLER, CH., GÜRTÜRK, K., und BLOBEL, H., 1987:
Streptococcal group B type antigen X in group L streptococci.
J. Clin. Microbiol. 25: 1803-1804
- LÄMMLER, CH., und BLOBEL, H., 1987a:
Streptokokken der serologischen Gruppen B von Mensch und Rind.
Tierärztl. Umschau, 2: 148-152
- LÄMMLER, CH., und BLOBEL, H., 1987b:
Synergistische und antagonistische Hämolytische Reaktionen bakterieller Proteine.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 100: 95-99
- LÄMMLER, CH., und WIBAWAN, I. W. T., 1990:
Solubilization of group-and type-specific streptococcal antigens with a murolytic enzyme from *Staphylococcus hyicus*.
J. Vet. Med. B 37: 173-176
- LÄMMLER, CH., WIBAWAN, I. W. T., PASARIBU, F. H., und WARSA, U. CH., 1993a:
Vergleichende Untersuchung von Streptokokken der serologischen Gruppe B, isoliert aus Untersuchungsmaterialien von Rind und Mensch in Deutschland und Indonesien.
Tierärztl. Umschau, 48: 171-175

- LÄMMLER, CH., WIBAWAN, I. W. T., SCHÖTT, S., und KIELWEIN, G., 1993b:
Serotypisierung und weitergehende Charakterisierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B (*Streptococcus agalactiae*), isoliert von Rindermastitiden in Thüringen und Hessen.
Mh. Vet. Med. 48: 645-650
- LÄMMLER, CH., und HAHN, G., 1994:
Streptokokken.
In: BLOBEL, H., und SCHLIESSER, T., (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II/2: Streptokokken-Infektionen und Rotlauf. 2. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart. 27-79
- LÄMMLER, CH., ABDULMAWJOOD, A., und WEIß, R., 1998:
Properties of serological group B streptococci of dog, cat and monkey origin.
J. Vet. Med. B 45: 561-566
- LANCEFIELD, R. C., 1933:
A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.
J. Exp. Med. 57: 571-595
- LANCEFIELD, R. C., 1934:
Serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B).
J. Exp. Med. 59: 441-458
- LANCEFIELD, R. C., 1938:
A micro-precipitin-technique for classifying hemolytic streptococci, improved methods for producing antisera.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38: 473-478
- LANCEFIELD, R. C., und PERLMON, G. R., 1952:
Preparation and properties of the typespecific M antigen isolated from a group A, type 1 haemolytic *Streptococcus*.
J. Exp. Med. 96: 83-97
- LANCEFIELD, R. C., und FREIMER, E. H., 1966:
Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci.
J. Hyg. 64: 191-203
- LANCEFIELD, R. C., McCARTY, M., und EVERLY, W. N., 1975:
Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci.
J. Exp. Med. 142: 165-179
- LAUTROU, Y., RAINARD, P., POUTREL, B., ZYGMUNT, M. S., VENIEN, A., und DUFRENOY, J., 1991:
Purification of the protein X of *Streptococcus agalactiae* with a monoclonal antibody.
FEMS Microbiol. Lett. 80: 141-146

- LEIB, S. L., und TAUBER, M. G., 1999:
Meningitis (II)- acute bacterial meningitis.
Ther. Umsch. 56: 640-646
- LEVINE, E. M., GHAI, V., BARTON, J. J., und STROM, C. M., 1999:
Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis.
Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 7: 210-213.
- LI, J., KASPER, D. L., AUSUBEL, F. M., ROSNER, B., und MICHEL, J. L., 1997:
Inactivation of the α C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*.
Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 13251-13256
- LIN, B., HOLLINGSHEAD, S. K., COLIGAN, J. E., EGAN, M. L., BAKER, J. R., und PRITCHARD, D. G., 1994:
Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase.
J. Biol. Chem. 269: 30113-30116
- LIN, F. Y. C., CLEMENS, J. D., AZIMI, P. H., REGAN, J. A., WEISMAN, L. E., PHILIPS, J. B. 3rd, RHOADS, G. G., CLARK, P., BRENNER, R. A., und FERRIERI, P., 1998:
Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection.
J. Infect. Dis. 177: 790-792
- LINDAHL, M., FARIS, A., WADSTRÖM, T., und HJERTEN, S., 1981:
A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells.
Biochim. Biophys. Acta 677: 471-476
- LINDBERG, J. A., 1998:
Endocarditis and normal cell meningitis caused by group B streptococci.
Ugeskr. Laeger. 160: 6354-6355
- LINDEN, V., CHRISTENSEN, K. K., und CHRISTENSEN, P., 1982:
Low levels of antibodies to surface antigens of group B streptococci in commercial IgG preparations.
Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 68: 193-195
- LINDEN, V., 1983:
Mouse-protective effect of rabbit anti-R-protein antibodies against group B streptococci type II carrying R-protein.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 91: 145-151
- LINDEN, V., CHRISTENSEN, K. K., und CHRISTENSEN, P., 1983:
The occurrence of R-protein among isolates of group B streptococci from human sources.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 91: 153-156

- LIU, T. Y., GOTSCHLICH, E. C., DUNNE, F. T., und JONSSSEN, E. K., 1971:
Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group B and C polysaccharide.
J. Biol. Chem. 246: 4703-4712
- LÖGERING, H. J., 1981:
Vergleichende Untersuchung fünf verschiedener Methoden zur Gruppenbestimmung von β -hämolsysierenden Streptokokken.
Zbl. Bakt. 248: 437-445
- LOTZ-NOLAN, L., AMATO, T., ILTIS, J., WALLEN, W., und PACKER, B., 1989:
Evaluation of a rapid latex agglutination test for detection of group B streptococci in vaginal specimens.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 289-293
- LUDOWIEG, J., VENNESLAND, B., und DORFMAN, A., 1961:
The mechanism of action of hyaluronidases.
J. Biol. Chem. 236: 333-339
- LÜTTICKEN, R., STERN SCHULTE, W., GÜNTHER, H., EIBACH, H. W., und BOLTE, A., 1983:
Neugeborenen-Sepsis und -Meningitis durch Gruppe-B-Streptokokken.
Dtsch. Ärztebl. 18: 1-5
- LÜTTICKEN, R., SCHNEEWIND, O., SCHMIDT, A., und MÜHLENBROCK, E., 1988:
Cloning of the genetic determinant of the group B streptococcal hemolysin in *E. coli*.
In: FEHRENBACH et al. (Hrsg.), Bacterial protein toxins,
Zbl. Bakt. Suppl. 17, Gustav Fischer, Stuttgart, New York
- MADOFF, L. C., MICHEL, J. L., HORI, S., AUSUBEL, F. M., und KASPER, D. L., 1992:
The cloning and native beta antigens of group B streptococcal c protein: role in protective immunity. In: OREFICI, G., (Hrsg.)
New perspective on Streptococci and Streptococcal Infections.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
Zbl. Bakt. Suppl. 22: 363-365
- MAELAND, J. A., BRAKSTAD, O. G., BEVANGER, L., und KVAM, A. I., 1997:
Streptococcus agalactiae β gene and gene product variations.
J. Med. Microbiol. 46: 999-1005
- MAELAND, J. A., BEVANGER, L., IVERSEN, G., und LYNNG, R. V., 1999:
bca, beta gene, and gene product divergency in reference and prototype strains of *Streptococcus agalactiae*.
Clin. Diag. Lab. Immunol. 6: 986-988

- MAELAND, J. A., BRAKSTAD, O. G., BEVANGER, L., und KROKSTAD, S., 2000:
Distribution and expression of bca, the gene encoding the c alpha protein,
by *Streptococcus agalactiae*.
J. Med. Microbiol. 49: 193-198
- MARCHLEWICZ, B., und DUNCAN, J. L., 1980:
Properties of a hemolysin produced by group B streptococci.
Infect. Immun. 135: 805-813
- MARTINEZ, G., HAREL, J., HIGGINS, R., LACOUTURE, S., DAIGNAULT, D., und GOTTSCHALK, M. 2000:
Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by random amplified polymorphic DNA analysis.
J. Clin. Microbiol. 27: 1352-1356
- MATORRAS, R., GARCIA-PEREA, A., USANIZAGA, J. A., und OMENACA, F., 1989:
Natural transmission of group B *Streptococcus* during delivery.
Int. J. Gynecol. Obstet. 30: 99-103
- MATTINGLY, S. J., MAURER, J. J., ESKEW, E. K., und COX, F., 1990:
Identification of a high-virulence clone of serotype III *Streptococcus agalactiae* by growth characteristics at 40°C.
J. Clin. Microbiol. 28: 1676-1677
- MAXTED, W. R., 1948:
Occurrence of the M substance of type 28 group A streptococci of Lancefield groups B, C and G.
J. Gen. Microbiol. 2: 1-6
- McCLEAN, D., 1941:
The capsulation of streptococci and its relation to diffusion factor (hyaluronidase)
J. Pathol. Bacteriol. 53: 13-27
- McDONALD, J. S., 1977:
Streptococcal and staphylococcal mastitis.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 1157-1159
- McKINNON, K., CHAFFIN, D. O., und RUBENS, C. E., 2001:
Streptococcus agalactiae type V polysaccharide synthesis operon, complete sequence. Gendatenbank-Zugangnummer: AF337958.
- MEHL, M., STARKE, R., MÖCKEL, C., und PRESBER, W., 1988:
Einsatz der Phenol-Wasser-Extraktion zur Isolierung des gruppenspezifischen Polysaccharidkomplexes aus B-Streptokokken.
J. Basic Microbiol. 28: 437-444
- MERRITT, K., und JACOBS, N., J., 1976:
Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci.
J. Clin. Microbiol. 4: 379-380

- MERRITT, K., und JACOBS, N. J., 1978:
Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B streptococci.
J. Clin. Microbiol. 8: 105-107
- MESSIER, S., DAMINET, S., und LEMARCHAND, T., 1995:
Streptococcus agalactiae endocarditis with embolization in a dog.
Can. Vet. J. 36: 703-704
- MICHEL, J. L., MADOFF, L. C., KLING, D. E., KASPER, D. L., und AUSUBEL, F. M., 1991:
Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity.
Infect. Immun. 59: 2023-2028
- MICHEL, J. L., MADOFF, L. C., OLSON, K., KLING, D. E., KASPER, D. L., und AUSUBEL, F. M., 1992:
Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of group B streptococci.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10060-10064
- MICHON, F., BRISSON, J. R., DELL, A., KASPER, D. L., und JENNINGS, H. J., 1988:
Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*.
Biochem. 27: 5341-5351
- MIYAKE, K., WATANABE, M., und IJIMA, S., 2001:
CpsJ of *Streptococcus agalactiae* type Ib shows beta-1,3-galactosyltransferase activity. Gendatenbank-Zugangsnummer: AB050723.
- MOLINARI, A. von HUNOLSTEIN, C., DONELLI, G., PARADISI, S., ARANCIA, G., und OREFICI, G., 1987:
Effects of some capsular components on pathogenicity of type IV and provisional type V group B streptococci.
FEMS Microbiol. Lett. 41: 69-72
- MORRISON, J. R. A., und WRIGHT, C. L., 1984:
Streptococcus agalactiae serotypes in the south west of Scotland.
Vet. Rec. 115: 439
- MOSABI, J. M., ARIMI, S. M., und KANG'ETHE, E. K., 1997:
Isolation and characterization of group B streptococci from human and bovine sources within and around Nairobi.
Epidemiol. Infect. 118: 215-220
- MOSHER, D. F., und PROCTOR, R. A., 1980:
Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*.
Science. 209: 927-929
- MUCH, H., 1908:
Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*.
Biochem. Z. 14: 143-155

- MÜLLER, G., 1967:
Die Typisierung der Streptokokken der Gruppe B. II. Mitteilung:
Methoden und Ergebnisse der Typisierung von humanen und bovinen
Streptokokken der Gruppe B.
Arch. Exp. Vet. Med. 21: 55-64
- MÜLLER, G., 1968:
Die Typisierung der Streptokokken der Gruppe B. V. Mitteilung:
Biologische, biochemische und kulturelle Variabilität der B-
Streptokokken.
Arch. Exp. Vet. Med. 22: 521-534
- MURAI, T., INAZUMI, Y., SUGIYAMA, M., und NISHIYAMA, Y., 1990:
Antigenicity and prevalence of group B *Streptococcus*, type "M9", in
Japan.
XI. Lancefield International Symposium on Streptococci and
Streptococcal Diseases, 10.-14. 9. 1990 Siena, Italy
- MURAI, T., INAZUMI, Y., SUGIYAMA, M., und NISHIYAMA, Y., 1992:
Antigenicity and prevalence of group B *Streptococcus*, type "M9", in
Japan.
In: OREFICI, G., (Hrsg.)
New Perspective on Streptococci and Streptococcal Infections.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
Zbl. Bakt. Suppl. 22: 467-469
- MURAI, T., und MOCHIDA, T., 1993:
Further study on prevalence of group B *Streptococcus*, strain JM9, in
Japan.
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and
Streptococcal Diseases, 6.-10. 9. 1993 St. Petersburg, Russia. Proceedings:
101-113
- MURRA, D., 1957:
Über eine neue Form von Mastitis infectiosa et contagiosa der Schafe
durch *Sc. agalactiae*.
Veterinaria Ital. 8: 417-430
- MUSSER, J. M., MATTINGLY, S. J., QUENTIN, R., und GOUDEAU, A.,
1989:
Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus*
agalactiae (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 4731-4735
- MYHRE, E. B., und KUUSELA, P., 1983:
Binding of human fibronectin to group A, C, and G streptococci.
Infect. Immun. 40: 29-34
- NAESS, A., I., BEVANGER, L., IVERSEN, O. J., und MAELAND, J. A., 1991:
Evaluation of monoclonal antibodies in serovar classification of group B
streptococci (GBS).
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 99: 1058-1060

- NAGANO, Y., NAGANO, N., TAKAHASHI, S., SUZUKI, A., und OKUWAKI, Y., 1989:
Screening of type Ia and Ib *Streptococcus agalactiae* strains with high sialic levels by determination of susceptibility to tetracyclines.
J. Clin. Microbiol. 27: 2767-2771
- NAGANO, Y., NAGANO, N., TAKAHASHI, S., MURUNO, K., FUJITA, K., TAGUCHI, F., und OKUWAKI, Y., 1991:
Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B β -haemolytic streptococci.
J. Med. Microbiol. 35: 297-303
- NEALON, T. J., und MATTINGLY, S. J., 1983:
Association of elevated levels of cellular lipoteichoic acid of group B streptococci with human neonatal disease.
Infect. Immun. 39: 1243-1251
- NEALON, T. J., und MATTINGLY, S. J., 1984:
Role of cellular lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III strains of group B streptococci to human embryonic, fetal, and adult epithelial cells.
Infect. Immun. 43: 523-530
- NIZET, V., GIBSON, R., CHI, E., FRAMSON, P., HULSE, M., und RUBENS, C., 1996:
Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells.
Infect. Immun. 64: 3818-3826
- NOCARD, E., MOLLEREAU, A., 1887:
Sur une mammite contagieuse des vaches laitières.
Ann. Inst. Pasteur 1: 109-126
- OUCHTERLONY, O., 1949:
Antigen-antibody reactions in gel.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26: 507
- OZEGOWSKI, J. H., GÜNTHER, E., und REICHARDT, W., 1994:
Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*.
Zbl. Bakt. 280: 497-506
- PAINTER, R. H., YASMEEN, D., ASSIMEH, S. N., und POULIK, M. D., 1974:
Complement fixing and macrophage opsonizing activities associated with β_2 -microglobulin.
Immunol. Commun. 3: 19-34
- PASARIBU, F. H., LÄMMLER, CH., und BLOBEL, H., 1985:
Serotyping of bovine and human group B streptococci by coagglutination.
IRCS Med. Sci. 13: 24-25

- PAOLETTI, L. C., PINEL, J., JOHNSON, K. D., REINAP, B., ROSS, R. A., und KASPER, D. L., 1999:
Synthesis and preclinical evaluation of glycoconjugate vaccines against group B *Streptococcus* types VI and VIII.
J. Infect. Dis. 180: 892-895
- PATTISON, I. H., MATTHEWS, P. R. J., und MAXTED, W. R., 1955:
Type classification by Lancefield precipitin method of human and bovine group B streptococci isolated in Britain.
J. Pathol. Bacteriol. 69: 43-50
- PATTISON, I. H., und HOWELL, D. G., 1955:
The type classification of group B streptococci, with special reference to bovine strains apparently lacking in type polysaccharide.
J. Pathol. Bacteriol. 69: 51-60
- PAYNE, N. R., und FERRIERI, P., 1985:
The relation of the Ibc protein antigen to the opsonization differences between strains of type II group B streptococci.
J. Infect. Dis. 151: 672-681
- PAYNE, N. R., KIM, Y., und FERRIERI, P., 1987:
Effect of differences in antibody and complement requirements on phagocytic uptake and intracellular killing of "c" protein-positive and-negative strains of type II group B streptococci.
Infect. Immun. 55: 1243-1251
- PERCH, B., KJEMS, E., und HENRICHSEN, J., 1979:
New serotypes of group B streptococci isolated from human sources.
J. Clin. Microbiol. 10: 109-110
- PERSSON, K., BJERRE, B., ELFSTRÖM, L., und FORSGREN, A., 1987:
Longitudinal study of group B streptococci carriage during late pregnancy.
Scand. J. Infect. Dis. 19: 325-329
- PETERSON, P. A., CUNNINGHAM, B. A., BERGGARD, I., und EDELMAN, G. M., 1972:
 β_2 -microglobulin: a free immunoglobulin domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 1697-1701
- PHILIPS, E. A., TAPSALL, J. W., und SMITH, D. D., 1980:
Rapid tube CAMP-test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B).
J. Clin. Microbiol. 12: 135-137
- PHUEKTES, P., MANSELL, P. D., und BROWING, G. F., 2001:
Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis.
J. Dairy Sci. 84: 1140-1148
- PLEASS, R. J., ARESCHOUG, T., LINDAHL, G., und WOOF, J. M., 2001:
Streptococcal IgA-binding proteins bind in the c alpha 2- c alpha 3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89.
J. Biol. Chem. 276: 8197-8204

- PODBIELSKI, A., BLANKENSTEIN, O., und LÜTTICKEN, R., 1994:
Molecular characterization of the *cfb* gene encoding group B streptococcal CAMP-factor.
Med. Microbiol. Immunol. 183: 239-256
- POUTREL, B., 1983:
Comparative evaluation of commercial latex agglutination and coagglutination reagents for group B, C and D mastitis.
Am. J. Vet. Res. 44: 490-492
- PRITCHARD, D. G., GRAY, B. M., und DILLON, Jr. H. C., 1984:
Characterization of the group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*.
Arch. Biochem. Biophys. 235: 385-392
- PRITCHARD, D. G., EGAN, M. L., GRAY, B. M., und DILLON, Jr. H. C., 1988:
Immunochemical characterization of the polysaccharide antigens of group B streptococci.
Rev. Infect. Dis. 10: 367-371
- PROCTOR, R. A., 1987:
Fibronectin: A brief overview of its structure, function and physiology.
Rev. Infect. Dis. 9: 317-321
- PUOPOLO, K. M., HOLLINGSHEAD, S. K., CAREY, V. J., und MADOFF, L. C., 2001:
Tandem repeat deletion in the alpha C protein of group B *Streptococcus* is recA independent.
Infect. Immun. 69: 5037-5045
- RADOSZ-KOMONIEWSKA, H., ROGALA-ZAWADA, D., ZIENTARA, M., RUDY, M., und NOWAKOWSKA, M., 1998:
Bacterial flora in pharyngitis and tonsillitis.
Med. Dosw. Mikrobiol. 50: 63-68
- RAINARD, P., 1986:
Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferrin and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgM) acting alone or in combination.
Vet. Microbiol. 11: 103-115
- RAINARD, P., LAUTROU, Y., SARRADIN, P., COULIBALY, A., und POUTREL, B., 1991a:
The kinetics of inflammation and phagocytosis during bovine mastitis induced by *Streptococcus agalactiae* bearing the protein X.
Vet. Res. Comm. 15: 163-176
- RAINARD, P., LAUTROU, Y., SARRADIN, P., COULIBALY, A., und POUTREL, B., 1991b:
Protein X of *Streptococcus agalactiae* induces opsonic antibodies in cows.
J. Clin. Microbiol. 29: 1842-1846

- RAINARD, P., 1992:
Binding of lactoferrin to *Streptococcus agalactiae*.
FEMS Microbiol. Lett. 98: 235-240
- RAINARD, P., 1993a:
Binding of bovine fibronectin to mastitis-causing *Streptococcus agalactiae* induces adherence to solid substrate but not phagocytosis by polymorphonuclear cells.
Microbiol. Pathog. 14: 239-248
- RAINARD, P., 1993b:
Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*.
Immun. 79: 648-652
- RANTZ, L. A., und RANDALL, E., 1955:
Use of autoclaved extracts of haemolytic streptococci for serological grouping.
Stanford Med. Bull. 13: 290-291
- REAGAN, J. A., KLEBANOFF, M. A., und NUGENT, R. P., 1991:
The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy.
Obstet. Gynecol. 77: 604-610
- REIS, K. J., AYOUB, E. M., und BOYLE, M. D. P., 1984:
Streptococcal Fc receptors. I. Isolation and partial characterization of the receptor from a group C *Streptococcus*.
J. Immunol. 132: 3091-3097
- RELMAN, D., TUOMANEN, E., FALKOW, S., GOLDENBOCK, D., SAUKKONEN, K., und WRIGHT, S., 1990:
Recognition of a bacterial adhesin by an intergrin: Macrophage CR3 $\alpha_m\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertusis*.
Cell 61: 1375-1382
- RENCH, M. A., und BAKER, C. J., 1989:
Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant.
Obstet. Gynecol. 73: 875-877
- RENCH, M. A., und BAKER, C. J., 1993:
Neonatal sepsis caused by a new group B streptococcal serotype.
J. Pediatr. 122: 638-640
- REUTERSWÄRD, A., MIÖRNER, H., WAGNER, M., und KRONVALL, G., 1985:
Variations in binding of mammalian fibrinogens to streptococci groups A, B, C, E, G and *Staphylococcus aureus*.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 93: 77-82

- RIFFON, R., SAYASITY, K., KHALIL, H., DUBREUIL, P., DROLET, M., und LAGACE, J., 2001:
Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR.
J. Clin. Microbiol. 39: 2584-2589
- ROBINSON, A., und MEYER, F. P., 1966:
Streptococcal fish pathogen.
J. Bacteriol. 92: 512
- ROLLAND, K., MAROIS, C., SIQUIER, V., CATTIER, B., und QUENTIN, R., 1999:
Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and *hylB* gene analysis.
J. Clin. Microbiol. 37: 1892-1898
- ROSS, P. W., 1984:
Group-B *Streptococcus*-profile of an organism.
J. Med. Microbiol. 18: 139-166
- ROTTA, J., 1986:
Pyogenic hemolytic streptococci.
In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE, und J. G. HOLT, (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1047-1051.
- ROTTSCHIEDT, W., und WINKELMANN, J., 1991:
Untersuchung der Viertelgemelke von Erstkalbinnen auf B-Streptokokken auf Zuchtvieh-Absatzveranstaltung des Rheinischen Verbandes für Schwarzbuntrinderzucht (RVS).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98: 410-411
- RUBENS, C. E., HEGGEN, L. M., HAFT, R. F., und WESSELS, M. R., 1993:
Identification of *cpsD*, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci.
Mol. Microbiol. 8: 843-855
- RÜHLMANN, J., KRUFT, V., WITTMANN-LIEBOLD, B., und FEHRENBACH, F. J., 1989:
Sequence similarity between protein B and human apolipoprotein A-IV.
FEMS Lett. 249: 151-154
- RUSSELL-JONES, G. J. GOTSCHLICH, E. C., und BLAKE, M. S., 1984:
A surface receptor specific for human IgA on group B streptococci possessing the Ibc protein antigen.
J. Exp. Med. 160: 1467-1475
- SALASIA, S. I. O., 1994:
Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus suis*.
Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen

- SALASIA, S. I. O., WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., und SELLIN, M., 1994:
Phase variation in streptococci of serological group B. Characteristic properties of isolates from human and bovine infection.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. 102: 925-930
- SALASIA, S. I. O., LÄMMLER, CH., und HERRMAN, G., 1995:
Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants.
Vet. Microbiol. 45: 151-156
- SARMIENTO, R., WILSON, F. M., und KHATIB, R., 1993:
Group B streptococcal meningitis in adults: case report and review of the literature.
Scand. J. Infect. Dis. 25: 1-6
- SCHALEN, C., 1993:
Prevalence of IgA receptors in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: serologic distinction between the receptors by blocking antibodies.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 7: 39-45
- SCHAUFUSS, P., 1986:
Vergleichende Untersuchungen an pathogenen Streptokokken unter besonderer Berücksichtigung der serologischen Gruppe L.
Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen
- SCHIFFERLE, R. E., JENNINGS, H. J., WESSELS, M. R., KATZENELLENBOGEN, E., ROY, R., und KASPER, D. L., 1985:
Immunochemical analysis of the types Ia and Ib group B streptococcal polysaccharides.
J. Immunol. 135: 4164-4170
- SCHLEIFER, K. H., und KILPPER-BÄLZ, R., 1984:
Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 31-34
- SCHLEIFER, K. H., 1986:
Gram positive cocci.
In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., und HOLGT, J. G., (Hrsg.):
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins Baltimore, USA.
- SCHLEIFER, K. H., und KILPPER-BÄLZ, R., 1987:
Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review.
Syst. Appl. Microbiol. 10: 1-19

- SCHÖNBECK, C., BJÖRCK, L., und KRONVALL, G., 1981:
Receptors for fibrinogen and aggregated β_2 -microglobulin detected in strains of group B streptococci.
Infect. Immun. 31: 856-861
- SCHRAG, S. J., ZYWICKI, S., FARLEY, M. M., REINGOLD, A. L., HARRISON, L. H., LEFKOWITZ, L. B., HADLER, J. L., DANILA, R., CIESLAK, P. R., und SCHUCHAT, A., 2000:
Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis.
N. Engl. J. Med. 342: 15-20
- SCHNEEWIND, O., FRIEDRICH, K., und LÜTTICKEN, R., 1988:
Cloning and expression of the CAMP factor of group B streptococci in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 56: 2174-2179
- SCHUCHAT, A., 1998:
Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms.
Clin. Microbiol. Rev. 11: 497-513
- SCHUCHAT, A., 1999:
Group B *Streptococcus*.
Lancet. 353: 51-56
- SCHWARTZ, B., SCHUCHAT, A., OXTOBY, M. J., COCHI, S., HIGHTOWER, A., und BROOME, C. V., 1991:
Invasive group B streptococcal disease in adults
J. Am. Med. Assoc. 266: 1112-1114
- SCHWARZ, S., CARDOSO, M., und WEGENER H. C., 1992:
Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*.
Antimicrob. Agents Chemother. 36: 580-588
- SCHWARZ, S., WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1994:
Distribution of genes conferring combined resistance to tetracycline and minocycline among group B streptococcal isolates from humans and various animals.
Zbl. Bakt. 281: 526-533
- SEELEMANN, M., 1963:
Biologie der Streptokokken.
2. Aufl., Verlag Hans Carl, Nürnberg.
- SELBITZ, H. J., 1992:
Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie.
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart
- SERHIR, B., HIGGINS, R., FOIRY, B., und JACQUES, M., 1993:
Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*.
J. Gen. Microbiol. 139: 2953-2958

- SHERMAN, J. M., und OBIGER, G., 1938:
The hemolytic streptococci of milk.
J. Infect. Dis. 62: 190-201
- SHIMZU, K., 1958:
Bacteriological studies on streptococci from bovine udder.
I. Serological and biochemical observations on group B streptococci and a general description of streptococci from bovine milk in Hokkaido.
Jpn. J. Vet. Res. 6: 209-225
- SHYUR, S. D., RAFF, H. V., BOHNSACK, J. F., KELSEY, D. K., und HILL, H. R., 1992:
Comparison of the opsonic and complement triggering activity of human monoclonal IgG1 and IgM antibody against group B streptococci.
J. Immunol. 148: 1879-1884
- SIMPSON, W. A., und BEACHEY, E. H., 1983:
Adherence of group A streptococci to fibronectin on oral epithelial cells.
Infect. Immun. 39: 275-279
- SIPPEL, K., und LÄMMLER, CH., 1995:
Further studies on immunoglobulin G- and albumin-binding properties of streptococci of serological group L.
J. Vet. Med. B 42: 421-426
- SKALKA, B., und SMOLA, J., 1981:
Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor- a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 249: 190-194
- SMITH, K. L., und SCHANBACHER, F. L., 1977:
Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 1224-1227
- SMOLA, J., 1993:
Some characteristics of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from man, cattle, pig and nutria.
XII. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 6. –10. 9. 1993 St. Petersburg, Russia.
Proceedings: 253-258
- SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE, und J. G. HOLT, 1986:
Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- SOBIRAJ, A., ILLING, C., FRIEBEL, H., BARTEL, K., und RICHTER, A., 2000:
Heilungsrate bei Kühen mit subklinischer und unspezifischer Mastitis durch den Einsatz von antibiotikahaltigen Langzeitpräparaten zum Zeitpunkt des Trockenstellens, gleichzeitig eine Vergleichsstudie.
Tierärztl. Umschau 6: 315-320

- SOEDARMANTO, I., SCHWARZ, S., LIEBISCH, B., und LÄMMLER, CH., 1995:
Tetracyclin resistance determinants among streptococci of serological group G and L.
Vet. Microbiol. 45: 331-337
- SOEDARMANTO, I., PASARIBU, F. H., WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1996:
Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia.
J. Clin. Microbiol. 34: 2201-2204
- SPELLERBERG, B., ROZDZINSKI, E., MARTIN, S., WEBER-HEYNE-MANN, J., SCHNITZLER, N., und LÜTTICKEN, R., 1999:
Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin.
Infect. Immun. 67: 871-878
- SPELLERBERG, B., 2000:
Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections.
Microbes Infect. 2: 1733-1742
- SPEZIALE, P., HÖÖK, M., SWITALSKI, L. M., und WADSTRÖM, T., 1984:
Fironrectin binding to a *Streptococcus pyogenes* strain.
J. Bacteriol. 157: 420-427
- STALHAMMAR-CARLEMALM, M., STENBERG, L., und LINDAHL, G., 1993:
Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections.
J. Exp. Med. 177: 1593-1603
- STALHAMMAR-CARLEMALM, M., ARESCHOUG, T., LARSSON, C., und LINDAHL, G., 1999:
The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells.
Mol. Microbiol. 33: 208-219
- STALHAMMAR-CARLEMALM, M., ARESCHOUG, T., LARSSON, C., und LINDAHL, G., 2000:
Cross-protection between group A and B streptococci due to cross-reacting surface proteins.
J. Infect. Dis. 182: 142-149
- STROM, W., 1983:
Diagnostik neonataler B-Streptokokken-Infektionen schon in der Geburtsklinik?
Geburtsch. u. Frauenheilk. 43: 147-150

- SUVOROV, A. N., FLORES, A. E., und FERRIERI, P., 1997:
Cloning of the glutamine synthetase gene from group B streptococci.
Infect. Immun. 65: 191-196
- TAI, J. Y., GOTSCHLICH, E. C., und LANCEFIELD, R. C., 1979:
Isolation of type-specific polysaccharide antigen from group B type Ib streptococci.
J. Exp. Med. 149: 58-66
- TAKAHASHI, S., ADDERSON, E. E., NAGANO, Y., NAGANO, N., BRIESACHER, M. R., und BOHNSACK, J. F., 1998:
Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci.
J. Infect. Dis. 177: 1116-1119
- TAKAHASHI, S., AOYAGI, Y., ADDERSON, E. E., OKUWAKI, Y., und BOHNSACK, J. F., 1999
Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci
Infect. Immun. 67: 1866-1870
- TAMURA, G. S., und NITTAYAJARN, A., 2000:
Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8.
Infect. Immun. 68: 2129-2134
- TAPSALL, J. W., und PHILLIPS, E. A., 1987:
Presumptive identification of group B streptococci by rapid detection of CAMP factor and pigment production.
Diagn. Microbiol. Infect. 7: 225-228
- TARANTA, A., WOOD, H. F., FEINSTEIN, A. R., SIMPSON, R., und KLEINBERG, E., 1960:
Rheumatic fever recurrence rate and antibody response to streptococcal infection.
Clin. Res. 8: 225
- TEIXEIRA, L. A., FERREIRA, B. T., ALVES, V. M. L., NAGAO, P. E., FIGUEIREDO, A. M. S., und BENCHETRIT, L. C., 1990:
The sialic acid content and surface hydrophobicity of group B streptococci.
XI. Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 10.-14. 9. 1990, Siena, Italy. Proceedings:450-462
- TILSALA-TIMISJÄRVI, A., FORSMAN, P., und ALATOSSAVA, T., 2000:
Bovine mastitis diagnosis from milk by a polymerase chain reaction-based method.
J. Nutri. Res. Food Sci. 55: 488-492

- TISSI, L., MARCONI, P., MOSCI, P., MERLETTI, L., CORNACCHIONE, P., ROSATI, E., RECCHIA, S., von HUNOLSTEIN, C., und ORIFICI, G., 1990:
Experimental model of type IV *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) infection in mice with early development of septic arthritis.
Infect. Immun. 58: 3093-3100
- TOLLE, A., HEESCHEN, W., und HAMMANN, J., 1977:
Grundlagen einer systematischen Bekämpfung subklinischen Mastitis des Rindes.
Kieler Milchw. Forsch. Ber. 29: 103-107
- TSAIHONG, J. C., und WENNERSTROM, D. E., 1983:
Effect of carrier molecules on production and properties of extracellular hemolysin produced by *Streptococcus agalactiae*.
Curr. Microbiol. 9: 333-338
- UHLENBRUCK, G., LÜTTICKEN, R., BOHMER, G., JANSSEN, E., und PULVERER, G., 1985:
Group B *Streptococcus* type II antisera have anti-galactan specificities.
Zbl. Bakt. Hyg. A 259: 179-187
- USTINOVITCH, I., VLASOV, G., TOTOLYAN, A., und SUVOROV, A., 1999:
Cloning and expression of gene fragment IgA-binding protein of group B streptococci.
Folia Microbiol. (Praha) 44: 726-728
- VESIKARI, T., ISOLAURI, E., TUPPURAINEN, N., RENLUND, M., KOIVISTA, M., JANAS, M., IKONEN, R. S., KERO, P., HEINONEN, K., NYMAN, R., und KUNNAS, M., 1989:
Neonatal septicaemia in Finland 1981-85.
Acta Paediatr. Scand. 78: 44-50
- von HERVÁS, J. A., ALOMAR, A., REINA, J., SALVA, F., und BENEDI, V. J., 1993:
Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain 1977-1991.
Clin. Infect. Dis. 16: 719-724
- von HUNOLSTEIN, C., RICCI, M. L., VALENTI, P., und OREFICI, G., 1992:
Lack of activity of transferrins towards *Streptococcus* spp.
Med. Microbiol. Immunol. 181: 351-357
- von HUNOLSTEIN, C., D'ASCENZI, S., WAGNER, B., JELINKOVA, J., ALFARONE, G., RECCHIA, S., WAGNER, M., und OREFICI, G., 1993:
Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci)
Infect. Immun. 61: 1272-1280

- von HUNOLSTEIN, C., PARISI, L., TISSI, L., RECCHIA, S., ALFARONE, G., NICOLINI, L., VOLPE, C., WAGNER, B., MOTLOVA, J., und OREFICI, G., 1999:
Virulence properties of type VII *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) and immunochemical analysis of capsular type polysaccharide.
J. Med. Microbiol. 48: 983-990
- VOTAVA, M., TEJKALOVÁ, M., DRÁBKOVÁ, M., UNZEITIG, V., und BRAVENY, I., 2001:
Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labour.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 120-122
- WÄSTFELD, M., STALHAMMER-CARLEMALM, M., DELISSE, A. M., CABEZON, T., und LINDAHL, G., 1996:
Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure.
J. Biol. Chem. 271: 18892-18897
- WAGNER, B., KUBIN, V., WAGNER, M., und GÜNTHER, E., 1980:
Immunelectron microscopic analysis of polysaccharide and protein surface antigens in wild strains of group B streptococci.
Zbl. Bakt. 253: 331-343
- WAGNER, B., MURAI, T., WAGNER, M., GÜNTHER, E., und JELINKOVA, J., 1994:
JM9 strains, a new type of group B streptococci from Japan.
Zbl. Bakt. 280: 488-496
- WANG, Q. M., VASEY, F. B., MAHFOOD, J. P., VALERIANO, J., KANIK, K. S., ANDERSON, B. E., und BRIDGEFORD, P. H., 1999:
V2 regions of 16S ribosomal RNA used as a molecular marker for the species identification of streptococci in peripheral blood and synovial fluid from patients with psoriatic arthritis.
Arthritis Rheum. 42: 2055-2059
- WATSON, B. K., MOELLERING, R. C. Jr., und KUNZ, L. J., 1975:
Identification of streptococci: Use of lysozyme and *Streptomyces albus* filtrate in the preparation of extracts for Lancefield grouping.
J. Clin. Microbiol. 1: 274-278
- WAYNE, L. H., und WALTON S. L., 2000:
Hyaluronidases of gram-positive bacteria.
FEMS Microbiol. Lett. 183: 201-207
- WEISER, J. N., und RUBENS, C. E., 1987:
Transposon mutagenesis of group B *Streptococcus* beta-hemolysis biosynthesis.
Infect. Immun. 55: 2314-2316

- WENNERSTRÖM, D. E., TSAIHONG, J. C., und CRAWFORD, J. T., 1985:
Evaluation of the role of hemolysin and pigment in pathogenesis of early onset group B streptococcal infection.
In: KIMURA, Y., KOTAMI, S. und SHIOKAWA, Y., (Hrsg.):
Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases.
Reedbooks Ltd., Bracknell, Berkshire, S. 155-156
- WERNER, A. H., GIBSON, M. D., und JAQUEST, R., 1951:
Specificities of hyaluronidase formed by several groups of streptococci.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76: 585-587
- WESSELS, M. R., POZSGAY, V., KASPER, D. L., und JENNINGS, H. J., 1987:
Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B streptococci.
J. Biol. Chem. 262: 8262-8267
- WESSELS, M. R., BENEDI, V. J., JENNINGS, H. J., MICHON, F., Di FABIO, J. L., und KASPER, D. L., 1989:
Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus* capsular polysaccharide.
Infect. Immun. 57: 1089-1094
- WESSELS, M. R., Di FABIO, J. L., BENEDI, V. J., KASPER, D. L., MICHON, F., BRISSON, J. R., JELINKOVA, J., und JENNINGS, H. J., 1991:
Structural determination and immunochemical characterization of type V group B *Streptococcus* polysaccharide.
J. Biol. Chem. 266: 6714-6719
- WESSELS, M. R., HAFT, R. F., HEGGEN, L. M., und RUBENS, C. E., 1992:
Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B *Streptococcus*.
Infect. Immun. 60: 1042-1045
- WESSELS, M. R., und KASPER, D. L., 1993:
The changing spectrum of group B streptococcal disease.
New. Engl. J. Med. 328: 1843-1844
- WHILEY, R. A., DUKE, B., HARDIE, J. M., und HALL, L. M. C., 1995:
Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the "*Streptococcus milleri* group".
Microbiol. 141: 1461-1467
- WHITNACK, E., und BEACHEY, E. H., 1982:
Antipsonic activity of fibrinogen bound to M protein on the surface of group A streptococci.
J. Clin. Invest. 69: 1042-1045
- WHITNACK, E., DALE, J. B., und BEACHEY, E. H., 1984:
Common protective antigens of group A streptococcal M proteins masked by fibrinogen.
J. Exp. Med. 159: 1201-1212

- WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1990a:
Distribution of B streptococcal type antigens among streptococci of serological groups B, G and L.
Zbl. Bakt. 273: 471-477
- WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1990b:
Properties of group B streptococci with protein surface antigens X and R.
J. Gen. Microbiol. 28: 2834-2836
- WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1990c:
Demonstration of α and β components of group B streptococcal protein antigen c in serum soft-agar.
J. Vet. Med. 37: 680-683
- WIBAWAN, I. W. T., LAUTROU, Y. und LÄMMLER, CH., 1991:
Antibiotic resistance patterns and pigment production of streptococci of serological group B isolated from bovines and humans.
J. Vet. Med. B 38: 731-736
- WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1991a:
Influence of capsular neuraminic acid on properties of streptococci of serological group B.
J. Gen. Microbiol. 137: 2721-2725
- WIBAWAN, I. W. T., und LÄMMLER, CH., 1991b:
Isolation and characterization of group B streptococcal type antigens X and R.
Zbl. Bakt. 275: 327-334
- WIBAWAN, I. W. T., GRÖLZ-KRUG, S., und LÄMMLER, CH., 1991c:
Immuno-electronmicroscopic demonstration of α and β components of group B streptococcal protein antigen c.
Zbl. Bakt. 274: 475-480
- WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., und PASARIBU, F. H., 1992:
Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells.
J. Gen. Microbiol. 138: 1237-1242
- WIBAWAN, I.W.T., LÄMMLER CH., und SMOLA J., 1993:
Properties and type antigen patterns of group B streptococcal isolates from pigs and nutrias.
J. Clin. Microbiol. 31: 762-764
- WIBAWAN, I. W. T., LÄMMLER, CH., SELEIM, R. S., und PASARIBU, F. H., 1993a:
A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells.
J. Gen. Microbiol. 139: 2173-2178
- WIBAWAN, I. W. T., 1993b:
Typenantigene von Streptokokken der serologischen Gruppe B und deren Bedeutung als Virulenzfaktoren.
Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen

- WIBAWAN, I.W.T., und LÄMMLER, CH., 1994:
Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*.
J. Vet. Med. B 41: 453-459
- WILKINSON, H. W., 1972:
Comparison of streptococcal R antigen.
Appl. Microbiol. 24: 669-670
- WILKINSON, H. W., und EAGON, R. G., 1971:
Type-specific antigens of group B type Ic streptococci.
Infect. Immun. 4: 596-604
- WILKINSON, H. W., FACKLAM, R. R., und WORTHAM, E. C., 1973:
Distribution of serological type of group B streptococci isolated from a variety of clinical material over a five-year period.
Infect. Immun. 8: 228-235
- WILKINSON, H. W., 1975:
Immunochemistry of purified polysaccharide type antigens of group B streptococcal types Ia, Ib, and Ic.
Infect. Immun. 11: 845-852
- WILKINSON, H. W., 1977:
Nontypable group B streptococci isolated from human sources.
J. Clin. Microbiol. 6: 183-184
- WILKINSON, H. W., 1978:
Group B streptococcal infection in humans.
Annu. Rev. Microbiol. 32: 41-57
- WILLE, L., 1982:
Neonatale B-Streptokokken-Kolonisation: Ein Dilemma. Ergebnis einer Umfrage.
Mschr. Kinderheilk. 130: 173
- WILLIAM, R. G., 1955:
The effects of continuous local injection of hyaluronidase on skin and subcutaneous tissue in rats.
Anat. Rec. 122: 349-361
- WINKLE, S., 1979:
Mikrobiologische und serologische Diagnostik.
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/New York.
- WOLTER, W., KLOPPERT, B. und ZSCHÖCK, M., 1999:
Verbreitung und Bekämpfung von *S. agalactiae* in Hessen.
Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. vom 13.-16.04.1999 in Bad Nauheim: 640-648
- WRIGHT, S. D., und MEYER, B. C., 1985:
Fibronectin receptor of human macrophages recognized the sequence Arg-Gly-Asp-Ser.
J. Exp. Med. 162: 762-767

- YAMADA, K. M., und OLDEN, K., 1978:
Fibronectin-adhesive glycoproteins of cell surface on blood.
Nature 275: 179-184
- YAMAGATA, M., GOODGER, W. J., WEAVER, L., und FRANTI, C., 1987:
The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 191: 1556-1561
- YAMAMOTO, T., NAGASAWA, I., NOJIMA, M., YOSHIDA, K., und KUWABARA, Y., 1999:
Sexual transmission and reinfection of group B streptococci between spouses.
J. Obstet. Gynaecol. Res. 25: 215-219
- YAMAMOTO, S., MIYAKE, K., KOIKE, Y., WATANABE, M., MACHIDA, Y., OHTA, M., und IJIMA, S., 1999a:
Molecular characterization of type-specific capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* type Ia.
J. Bacteriol. 181: 5176-5184
- YOSHIDA, K., 1971:
Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by serum-soft agar technique.
Infect. Immun. 3: 535-539
- YOUNAN, M., ALI, Z., BORNSTEIN, S., und MULLER, W., 2001:
Application of the California mastitis test in intramammary *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* infections of camels (*Camelus dromedarius*) in Kenya.
Prev. Vet. Med. 51: 307-316
- ZABEL, L. T., NEUER, A., und MANNCKE, B., 1996:
Fibronectin binding and cell surface hydrophobicity contribute to adherence properties of group B streptococci.
Zbl. Bakt. 285: 35-43
- ZOU, W., LAFERRIERA, C. A., und JENNINGS, H. J., 1998:
Oligosaccharide fragments of the type III group B streptococcal polysaccharide derived from *S. pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide by a chemoenzymatic method.
Carbohydr. Res. 309: 297-301

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lämmle danke ich herzlich für sein nicht ermüdendes Interesse, für seine jederzeit gewährte Hilfe, geduldige Unterstützung und stete Gesprächsbereitschaft, die die Entstehung der vorliegenden Arbeit begleiteten.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. R. Weiß für die endloser Geduld und für die Zusammenarbeit.

Meinen Kolleginnen K. Fink und M. Rosenboom sowie meinen Kollegen K. Jendretzke, R. Galang, Dr. A. Yilmaz und Ö. Akinen danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe.

Herrn Dr. J. Brückler, Frau Dr. E. Schneider und Frau Dr. A. Renz-Schauen möchte ich besonders für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes danken.

Mein Dank gilt auch Frau Müller, Frau Kahlenberg und Frau Hillebrecht, die mich im Rahmen dieser Arbeit durch ständige Hilfsbereitschaft bei kleinen und großen Problemen unterstützten.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei Erdal Sönmez, Arife Yildirim, Müslüm Yildirim, Yüksel Yildirim und Erkan Yildirim für ihre freundschaftliche und moralische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und allen Freunden, die mich während dieser Zeit mit vielen Nachsicht und Toleranz begleiteten.

Anschließend danke ich Antje Nee, die mich in dieser oft ruhelosen und anstrengenden Zeit mit unerschöpflicher Geduld und Hilfe unterstützte.