

# Validierung der DNase-Reaktion zur Identifizierung von *Staphylococcus aureus* Stämmen im Rahmen der Mastitisdiagnostik

K. Fantelli, R. Stephan

Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich

## Zusammenfassung

Von verschiedenen möglichen Verfahren für die Identifizierung von *S. aureus* Stämmen wird in der Routinemastitisdiagnostik mehrheitlich der Nachweis der DNase-Bildung als Kriterium herangezogen. Das DNase-Bildungsvermögen beschränkt sich jedoch nicht nur auf *S. aureus* Stämme. Zudem variiert die Stärke der DNase-Reaktion zwischen einzelnen Stämmen stark. Aufgrund dieser Faktoren sind die Ergebnisse verschiedener Laboratorien oft nicht untereinander vergleichbar. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die DNase-Reaktion für die Identifizierung von *S. aureus* Stämmen zu validieren und Kriterien für die Auswertung der DNase-Reaktion festzulegen. Die Ergebnisse von 189 in der DNase-Reaktion positiven Feldstämmen (Gram- und Katalase-positive Kokken) aus Mastitisproben der Routinediagnostik zeigen, dass Kolonien unter Einbezug einer  $\beta\delta$ - oder  $\delta$ -Hämolyse und von DNase-Reaktionen  $\geq 2$  mm zuverlässig (Sensitivität 91,2%, Spezifität 96,9%) als *S. aureus* identifiziert werden können.

**Schlüsselwörter:** Mastitisdiagnostik – *S. aureus* – DNase-Reaktion – Identifizierung

## Validation of DNase reaction for identification of *Staphylococcus aureus* strains in routine mastitis diagnostic

In routine mastitis diagnostic *S. aureus* strains are often identified using DNase reaction. However, this enzyme activity is not limited only to *S. aureus* strains. Furthermore, the strength of the DNase reaction between different strains varies strongly. These factors lead to the fact that the results are often not comparable between laboratories. The aim of these investigations was to validate the DNase reaction for routine identification of *S. aureus* in mastitis diagnostic and to set a critical limit for interpretation of DNase reaction.

The results of 189 strains isolated from bovine mastitis milk samples show that colonies with  $\beta\delta$  or  $\delta$ -haemolysis and DNase reactions of  $\geq 2$  mm can reliably be identified (sensitivity 91,2%, specificity 96,9%) as *S. aureus*.

**Key words:** mastitis diagnostic – *S. aureus* – DNase reaction – identification

## Einleitung

Die DNase, eine hitzeempfindliche Nuklease, ist ein extrazelluläres Enzym, das bei *S. aureus* Stämmen vorkommt (Kloos und Schleifer, 1996). In der Routinemastitisdiagnostik dient bei Gram-positiven, Katalase-positiven Kokken neben der Beurteilung der Hämolyse das DNase-Bildungsvermögen der Kolonien der Identifizierung von *S. aureus* und gleichzeitig auch der Abgrenzung von «anderen Staphylokokken». Der Nachweis der DNase erfolgt durch die Beimpfung einer mit DNA supplementierten Agarplatte. Die bakterielle DNase spaltet während der Inkubation die im Nährmedium enthaltene DNA. Durch die anschliessende Überschichtung der Agarplatte mit 1N Salzsäure trübt sich das Nährmedium infolge einer

Säurefällung der DNA. DNA-Spaltprodukte (bei vorhandener DNase eines Stammes) werden hingegen nicht ausgefällt, das Medium bleibt klar (Abb. 1). Diese DNase-Bildungsfähigkeit ist jedoch nicht auf *S. aureus* Stämme beschränkt. Mehrere weitere auch im Zusammenhang mit bovinen Mastitiden vorkommende Staphylokokken-Spezies, wie *S. chromogenes*, *S. hyicus* und *S. intermedius* produzieren ebenfalls DNase (Kloos und Schleifer, 1986). Andere Identifizierungsverfahren wie der Nachweis der Koagulase (ein Enzym, welches in Gegenwart eines Plasmafaktors Fibrinogen zu Fibrin ausfällt) oder des Clumpingfactors (hitze stabiles Zellwandprotein, welches Fibrinogen ausfällt) sind einerseits zu teuer

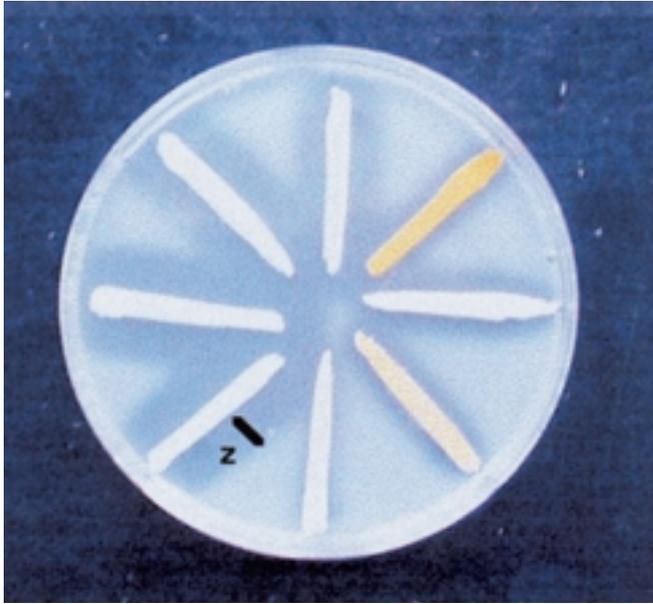


Abbildung 1: Stämme mit unterschiedlich positiver DNase-Reaktion (z = Zone der DNase-Reaktion).

oder andererseits für die Identifizierung boviner *S. aureus* Stämme (im Falle des Clumpingfactors) nicht geeignet (Stephan et al., 2001).

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass sich die Ergebnisse verschiedener Laboratorien bezüglich *S. aureus* Diagnostik aufgrund unterschiedlicher Interpretationen der DNase-Reaktion nicht vergleichen liessen. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die DNase-Reaktion für die Identifizierung von *S. aureus* Stämmen zu validieren und Kriterien für die Auswertung der DNase-Reaktion festzulegen.

## Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden 189 in der DNase-Reaktion positive Feldstämme (Gram- und Katalase positive Kokken) aus Mastitisproben der Routinediagnostik verwendet. Von jedem Stamm wurde die Breite der durch die DNase hervorgerufene Aufhellungszone auf DNase Test Agar (Difco Nr. 0632-17-7) bestimmt. Als Kontrollstamm diente *S. aureus* ATCC 25923. Die Auswertung der Reaktion erfolgte nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C. Die weitere Stammcharakterisierung erfolgte über das Hämolyseverhalten sowie die Koagulasereaktion. Die Hämolyseform wurde auf Blutagar (Trypticase-Soy-Agar, BBL mit 5% Schlafblut) nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C beurteilt. Die Bestimmung der Koagulase-Reaktion erfolgte auf RPF (Rabbit-Plasma-Fibrinogen)-Medium (Baird-Parker Medium, Oxoid Nr. CM 275, R.P.F. Supplement, Sedia 2000-0100) nach 48 stündiger Inkubation bei 37°C. Stämme mit einer positiven DNase- und einer positiven Koagulase-Reaktion wurden mittels PCR und

dem Primerpaar Staur4 (5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3') und Staur6 (5'-AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC-3') auf das *S. aureus* spezifische 23S rRNA-Gen getestet (Straub et al., 1999). Die dazu notwendige DNA-Extraktion erfolgte nach der von Hesselbarth und Schwarz (1995) beschriebenen Methode. Ausgewählte DNase-positive ( $\geq 3$ mm) und gleichzeitig Koagulase-negative Stämme wurden zudem biochemisch mittels API ID 32 Staph (bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, F) nach Angaben des Herstellers identifiziert.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der DNase-Reaktionen aller 189 untersuchten Stämme sind in Abbildung 2 dargestellt. 26 Stämme (13.7%) wiesen eine DNase-Reaktion von 1mm, 46 Stämme (24.3%) eine solche von 2mm auf. Die restlichen 117 Stämme (62.0%) zeigten Reaktionen von 3mm bis 9mm. Von den 189 DNase-positiven Stämmen waren 91 Stämme (48%) in der Koagulase-Reaktion positiv, 98 Stämme (52%) negativ. Alle 91 Koagulase-positiven Stämme erwiesen sich gleichzeitig in der 23S rRNA PCR als positiv (Abb. 3) und wurden damit eindeutig als *S. aureus* identifiziert. Die biochemische Identifizierung von 30 ausgewählten Koagulase-negativen Stämmen (DNase-Reaktion 3mm und mehr) ergab drei verschiedene Staphylokokken-Spezies (zehn Stämme *S. chromogenes*, neun Stämme *S. hyicus*, vier Stämme *S. capitis*) sowie *Kokuria rosea*, ebenfalls ein Vertreter aus dem Genus *Micrococcaceae*. 91% der *S. aureus* Stämme (82 von 91 Stämmen) zeigten eine DNase-Reaktion zwischen 3mm und 7mm. Dagegen zeigte der Grossteil der Koagulase-negativen Stämme (86%) eine DNase-Reaktion von 1mm resp. 2mm. 47 *S. aureus* Stämme (51.6%) wiesen eine  $\beta\delta$ -Hämolyse, 36 Stämme (39.6%) eine  $\delta$ -Hämolyse, sieben Stämme eine  $\gamma$ -Hämolyse und ein Stamm eine  $\alpha$ -Hämolyse auf. Als Parameter für die Zuverlässigkeit der Iden-

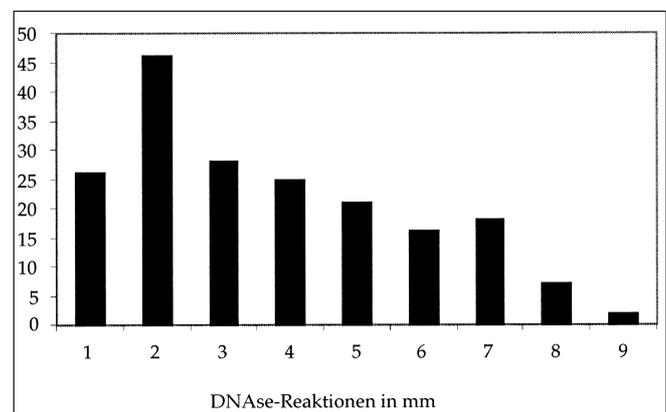


Abbildung 2: DNase-Reaktionen der 189 untersuchten Stämme.

Tabelle 1: DNase-Reaktion einer Kolonie als Kriterium zur Identifizierung von *S. aureus*.

DNase-Reaktion	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv prädiktiver Wert (%)	negativ prädiktiver Wert (%)
≥ 2 mm	98.9	25.5	55.2	96.0
≥ 3 mm	95.6	69.3	74.3	94.4
≥ 4 mm	83.5	86.7	85.3	85.0

Tabelle 2:  $\beta\delta$ - oder  $\delta$ -Hämolyse und DNase-Reaktion einer Kolonie als Kriterien zur Identifizierung von *S. aureus*.

DNase-Reaktion	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv prädiktiver Wert (%)	negativ prädiktiver Wert (%)
≥ 1 mm	91.2	82.6	83.0	91.0
≥ 2 mm	91.2	96.9	96.5	95.0
≥ 3 mm	90.1	98.9	98.7	91.5
≥ 4 mm	79.7	99.0	98.6	84.6

tifizierung einer Kolonie als *S. aureus* wurde die Sensitivität, die Spezifität, der positiv prädiktive und der negativ prädiktive Wert ermittelt. In einem ersten Schritt wurden diese Parameter für eine Identifizierung nur über die DNase-Reaktion (Tab. 1) und in einem zweiten Schritt unter zusätzlicher Einbe-

ziehung der  $\beta\delta$ - oder  $\delta$ -Hämolyse einer Kolonie berechnet (Tab. 2).

Der Vergleich der positiv prädiktiven Werte beider Vorgehen zeigt, dass *S. aureus* mit grösserer Treffsicherheit identifiziert wird, wenn sowohl die DNase-Reaktion als auch das Hämolyseverhalten der Kolonien als Identifizierungskriterien herangezogen werden. Dabei werden für die Sensitivität, die Spezifität, den positiv prädiktiven und den negativ prädiktiven Wert die besten Ergebnisse erreicht, wenn Kolonien mit DNase-Reaktionen von  $\geq 2$  mm berücksichtigt werden. Die Ergebnisse der 189 in der DNase-Reaktion positiven Feldstämme (Gram- und Katalase-positive Kokken) aus Mastitisproben der Routinediagnostik zeigen, dass Kolonien unter Einbezug einer  $\beta\delta$ - oder  $\delta$ -Hämolyse und von DNase-Reaktionen  $\geq 2$  mm zumeist zuverlässig (Sensitivität 91.2%, Spezifität 96.9%) als *S. aureus* identifiziert werden können. Es muss aber dennoch darauf hingewiesen werden, dass auch mit diesem Vorgehen 8.8% der *S. aureus* Stämme nicht als solche erkannt und andererseits 3.1% falsch-positiv als *S. aureus* angesprochen wurden.

Für die Routinemastitisdiagnostik mag die Sicherheit dieses Vorgehens (Beurteilung der DNase-Reaktion und Einbezug einer  $\beta\delta$ - oder  $\delta$ -Hämolyse) ausreichend sein. Für Sanierungsverfahren mit dem Ausmerzen von Tieren wie auch für wissenschaftliche Untersuchungen stellt sich aber die Frage, ob nicht ein sichereres Kriterium der Identifizierung wie z.B. die Koagulase-Reaktion gefordert werden müsste.

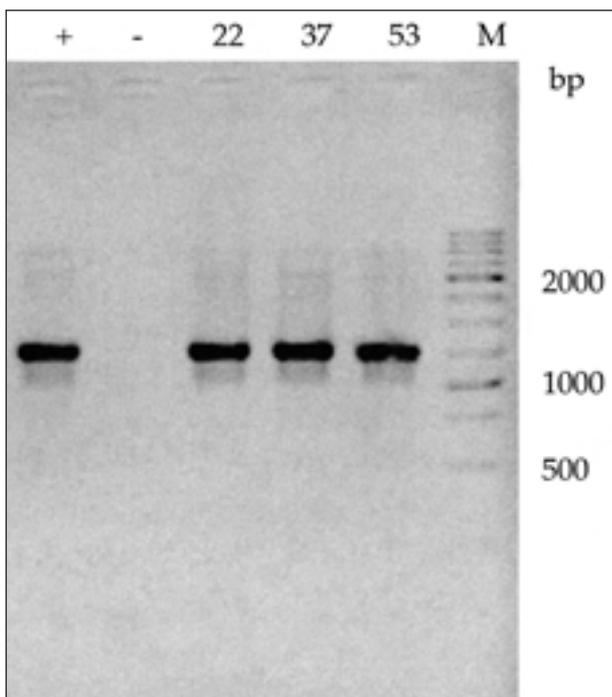


Abbildung 3: Amplifikationsprodukte (1250 bp) des *S. aureus*-spezifischen PCR Nachweises: M = 250bp Längenstandard (Roche Diagnostics); + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle.

### Validité de la réaction DNase pour l'identification des souches *Staphylococcus aureus* en cadre de la diagnostic mastitis

Entre les plusieurs procédés possibles, dans la diagnostic par routine mastitis on se sert en majorité de la preuve de la formation DNase, comme critère de l'identification de souches *S. aureus*. Mais, la formation DNase ne se restreint pas seulement aux souches *S. aureus*. En plus, la force de la réaction DNase varie fortement même entre les particulières souches. C'est pourquoi les résultats entre différents laboratoires ne sont pas toujours comparables. Le but de ces examens était donc de valider la réaction DNase pour l'identification des souches *S. aureus* et d'établir des critères pour l'exploitation de la réaction DNase.

Les résultats de 189 souches (Gram-et catalase-positive cocci) isolées des échantillons mastitis de la diagnostic par routine montrent, que des colonies avec une  $\beta\delta$ - ou  $\delta$ -hémolyse et les réactions de DNase de  $\geq 2$  mm peuvent être exactement (sensitivité 91,2%, spécificité 96,9%) identifiées comme *S. aureus*.

### Validità della reazione DNase per l'identificazione di ceppi *Staphylococcus aureus* nel quadro della diagnostica mastitis

Tra i diversi procedimenti possibili nella diagnostica usuale mastitis, si prende spesso la prova della formazione DNase come criterio d'identificazione di ceppi *S. aureus*. La formazione DNase però non è ristretta ai ceppi *S. aureus*. In oltre, la forza della reazione DNase varia molto tra i ceppi particolari. E per quello, che i risultati tra i laboratori non sono sempre comparabili. Lo scopo di questi esami era di validare la reazione DNase per identificare i ceppi *S. aureus* e di fissare i criteri per la valorizzazione della reazione DNase.

I risultati di 189 ceppi delle prove mastitis usuali indicano, che colonie con  $\beta\delta$  o  $\delta$ -emolisi e reazioni di DNase di  $\geq 2$  mm possono essere identificati attendibilmente (sensibilità 91,2%, specificità 96,9%) come *S. aureus*.

## Literatur

Blobel H., Schliesser T.: Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine. In: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Hrsg. H. Blobel, T. Schliesser, J. Brückler, S. Schwarz und F. Untermann, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1994, 73–130.

Hesselbarth J., Schwarz S.: Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet. Microbiol.* 1995, 45:11–17.

Kloos W.E., Schleifer K.H.: *Staphylococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.

Stephan R., Annemüller C., Hassan A.A., Lämmli Ch.: Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 2001, 78: 373–382.

Straub J.A., Hertel C., Hammes W.P.: A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 1999, 62: 1150–1156.

## Korrespondenzadresse

PD Dr. R. Stephan, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Winterthurerstrasse 270–72, CH-8057 Zürich, Fax 01 635 89 08, stephanr@fsafety.unizh.ch

Manuskripteingang: 8. Februar 2002

In vorliegender Form angenommen: 9. April 2002